

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO ACADÊMICO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

DANIELA PALHEIRO MENDES DE ALMEIDA

DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *GATA2* EM PACIENTES COM INFECÇÕES
MICOBACTERIANAS NÃO TUBERCULOSAS OU INFECÇÕES FÚNGICAS
DISSEMINADAS SEM IMUNOSSUPRESSÃO CONHECIDA

Rio de Janeiro

2019

DANIELA PALHEIRO MENDES DE ALMEIDA

DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *GATA2* EM PACIENTES COM INFECÇÕES
MICOBACTERIANAS NÃO TUBERCULOSAS OU INFECÇÕES FÚNGICAS
DISSEMINADAS SEM IMUNOSSUPRESSÃO CONHECIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Doenças Infecciosas.

Orientadoras: Prof^a. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira e Prof^a. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Rio de Janeiro

2019

Dedico este trabalho aos meus avós maternos, Carminda Palheiro Mendes e Alberto Mendes (*in memoriam*), que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e, como terra e água, me ajudando a buscar meu equilíbrio pelos mares da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas queridas orientadoras, Rosely Maria Zancopé Oliveira e Maria do Socorro Pombo de Oliveira, por terem acreditado em mim e terem me aberto um universo de possibilidades na Medicina. Vocês sempre me encorajaram a me desafiar, a crescer e enfrentar o desconhecido, são minha referência de pesquisa ética, inovadora e humana. Mais do que orientadoras, vocês se tornaram grandes amigas, muito obrigada.

Agradeço à essencial ajuda dos colaboradores e amigos do PHOP-INCA, com quem aprendi tudo que sei sobre biologia molecular e genética: Dr^a Francianne Gomes Andrade, Filipe Santos-Bueno, Ingrid Sardou-Cezar, Alytchon Junior, Luisa Codeço-Marques, Giselle Brisson, Eugênia Terra-Granado, Elda Noronha, Bruno Aguiar, Gisele Moledo, Carolina Zampier, Rosângela, Ingrid Koster e Paulo Chagas. Agradeço a Dr^a Anna Cláudia Evangelista dos Santos, chefe do Serviço de Aconselhamento Genético do INCA, pelo acompanhamento dos pacientes e familiares.

Agradeço a todos os integrantes do laboratório de Micologia do INI, especialmente ao Dr Mauro de Medeiros Muniz e ao doutorando Marcos de Abreu Almeida pela colaboração e ensinamentos e aos Dr^s Manoel Marques Evangelista de Oliveira e Aline Moreira pelo sequenciamento da Plataforma do IOC. Agradeço também a toda a equipe da genética do INCA pelo pronto sequenciamento e gentileza em ajudar. Agradeço às Dr^{as}. Luciana Pinto e Teresa Fernandez, pela discussão dos casos e realização dos exames histopatológicos no INI e citogenéticos no INCA, respectivamente.

Agradeço à equipe da Agência Transfusional do INI, especialmente ao Dr Alexandre Gomes Vizzoni pela grande ajuda na organização do banco de dados, revisão de literatura e formatação da dissertação, Flávia Regina Medeiros Silva, Antônio Fernando Pascoal pelo acolhimento, convivência e compreensão nas minhas eventuais ausências, ao técnico Caique Vicente de Jesus do setor de Qualidade do INI, pela formatação da dissertação e a toda a equipe do Laboratório de Hematologia do INI, especialmente Edson Beyker, Wagner Rangoni, Ana Paula Pacheco e Lúcia Nunes pela parceria diária e processamento das amostras. Agradeço também a Raul Leal Faria Luiz, Yasmine Vieira, Giselle Barbosa e Simone Silva da Plataforma Multiusuário do INI pela agilização dos resultados de citometria e a toda a equipe do Ambulatório do INI, especialmente Enfa. Rosângela Eiras e Romeu Zufelatto pela ajuda na

organização das agendas, Márcia Farias pela pronta disposição em ajudar e enviar resultados de exames e Viviane Rodrigues, Ediléia Salgado, Ana Paula Marinho e Edjane Monteiro pela coleta de sangue dos pacientes.

Agradeço à Direção do INI e a Vice-direção de Serviços Clínicos pela confiança e apoio desde minha chegada à instituição. Agradeço carinhosamente a todos os amigos médicos que confiaram na minha capacidade e entenderam minhas dúvidas e dificuldades, me apoiando nessa pesquisa, reconhecendo sua importância e eventualmente encaminhando e discutindo pacientes: Iracema Forni, Carolina Arana, Valéria Rolla, Flávia Sant'Anna, Priscila Macedo, Marcelo Lyra, Estevão Portela, Denise Medeiros, Hugo Boechat, Andréa Varon, Rogério Walls, Laura Ferreira, Marcela Ferreira, Renata Lia Viggiano, Marcos Davi Gomes, Luciana Pedro, Marcellus da Costa, Adriana Pinto, Luiza Carneiro, Rodrigo Amâncio, Emersom Mesquita, Mariana Mazzi, Luana Kelly da Rocha, Patrícia Moura, Fernando Sellos, José Marcos Cunha, Amanda Marques e Daniel Schachter.

Agradeço ao Professor de Hematologia da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto Rodrigo Tocantins Calado e seu aluno de mestrado Gustavo Borges pela colaboração no sequenciamento e discussão de casos.

Agradeço aos pesquisadores do *National Institute of Health*, Dr Steven Holland, chefe da divisão de imunopatogênese do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* e Dr^a Elizabeth Sampaio, médica pesquisadora cedida do IOC-Fiocruz, por me receberem gentilmente em breve visita à instituição, disponibilidade para discussão de casos e incentivo em prosseguir a pesquisa.

Agradeço a todos os pacientes e seus familiares, que são a grande fonte motivadora dessa pesquisa que me fez sair da beira do leito e ir até a bancada de experimentos, pela compreensão do trabalho e colaboração na sua participação.

Agradeço especialmente aos membros da banca examinadora que dedicaram parte do seu escasso tempo para ler e contribuir com o trabalho: Maria Clara Gutierrez-Galhardo, Daniella Arêas Mendes-da-Cruz, Rodrigo Doyle Portugal e Dayvison Francis Saraiva Freitas.

Agradeço aos mestres que influenciaram minha formação médica: Prof^a. Alda Torres Bozza, Dr. Mario Roberto de Oliveira, Dr Fernando Borer, Dr^a. Rita Espariz, Prof. Wolmar Pulcheri, Prof. José Carlos de Moraes, Prof^a. Carmen Martins Nogueira, além do primo querido e Dr. Flávio Cure Palheiro.

Agradeço imensamente aos meus pais, Solange Beatriz Palheiro Mendes e Julio Cesar Goeldner de Almeida, meus irmãos, Renata Palheiro Mendes de Almeida e Gustavo Palheiro Mendes de Almeida, minha sobrinha e afilhada Mel Palheiro de Almeida Ferreira, avó Carminda Palheiro Mendes, tios Alberto Palheiro Mendes, Jane Moyses e primo Victor Moyses Palheiro por todo o amor e companheirismo ao longo da minha vida. Agradeço ao meu padrasto Márcio Serôa de Araújo Coriolano, minha madrasta Edijane Ballesteros e meus irmãos de consideração Leonardo Possamai Coriolano, Tatiana Coriolano Lobo e Heric Ballesteros, além do meu cunhado Leonardo Grandmasson e madrinha Beatriz Azeredo pela presença e influência no meu cotidiano.

“É necessário sair da ilha para ver a ilha, que não nos vemos se não nos saímos de nós, se não saímos de nós próprios”.

(José Saramago, Conto da ilha desconhecida)

MENDES-DE-ALMEIDA, Daniela Palheiro. **Detecção de mutações no gene *GATA2* em pacientes com infecções micobacterianas não tuberculosas ou infecções fúngicas disseminadas sem imunossupressão conhecida.** 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

RESUMO

Infecções micobacterianas não tuberculosas (MNT) e fúngicas invasivas (IFI) são consideradas oportunistas em indivíduos imunossuprimidos. Entretanto, em determinadas situações, o tipo de imunossupressão não é evidente e causas de imunodeficiências primárias (PIDs) devem ser consideradas. Imunodeficiências do hospedeiro, especialmente desordens do eixo interleucina 12 (IL-12) –interferon- γ (IFN- γ) estão envolvidas na patogênese dessas infecções e vêm sendo cada vez mais estudadas. Dentre esses genes, destaca-se o *Guanine-adenine-thymine-adenine 2 (GATA2)*, um fator regulador mestre da hematopoiese. Os portadores de defeitos nos alelos de *GATA2* podem evoluir, ao longo da vida, com perda progressiva de células dendríticas, monócitos, linfócitos B e células *Natural Killer*. Mutações esporádicas ou familiares estão relacionadas a um conjunto diverso de doenças. Estas se manifestam por susceptibilidade a infecções, disfunção pulmonar, linfedema, verrugas, surdez, autoimunidade, insuficiência medular e malignidades, incluindo síndrome mielodisplásica (SMD) e leucemia mieloide aguda (LMA), compondo as síndromes MonoMAC e Emberger. O objetivo deste estudo é identificar mutações no gene *GATA2* em pacientes com infecções por MNT e/ou IFI sem imunossupressão conhecida em acompanhamento no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz e estudar os familiares dos indivíduos afetados. Vinte e dois (22) pacientes e 9 familiares foram recrutados no período entre 05 de maio de 2015 e 11 de setembro de 2018. Dentre os pacientes, 17 apresentaram IFI, 4 MNT e 1 ambas. Seis (6) pacientes apresentaram alguma neoplasia, além do quadro infeccioso, foram elas: SMD/LMA, melanoma, linfoma não Hodgkin e câncer de ovário. Após a extração do ácido desoxirribonucleico em sangue periférico, realizamos a reação da polimerase em cadeia seguida do sequenciamento genético direto de 5 exons e 1 intron do gene *GATA2*. As sequências geradas foram analisadas e as variantes genéticas foram comparadas com bancos de dados de referência a fim de avaliar frequência populacional e associação clínica. A prevalência de mutação patogênica T354M foi de 4,5% (1/22) e também foi confirmada em seus dois filhos. O paciente foi submetido a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), porém faleceu 9 meses depois. Nesta coorte, houve também a observação do polimorfismo provavelmente benigno rs2335052 em 18,2% dos casos (4/22) e dois polimorfismos benignos rs11708606 e rs369850507 em regiões intrônicas com prevalência de 27,3% (6/22) e 4,5% (1/22), respectivamente. Do total de pacientes, a mortalidade em 2 anos foi de 27,3% (6/22). A identificação de mutações no gene *GATA2* é importante em pacientes com infecções por MNT e/ou IFI sem imunossupressão conhecida pois pode sugerir um tipo específico de PID, relacionada a uma variedade de sintomas clínicos e ao desenvolvimento de SMD e LMA, além de neoplasias sólidas. Estas doenças possuem alta mortalidade e exigem um tratamento individualizado. A identificação de mutações em *GATA2* requer aconselhamento genético, medidas de prevenção de infecções, monitoramento hematológico, vigilância de neoplasias e, em determinados casos, TCTH, único tratamento curativo até o momento.

Palavras-chave: *GATA2*. Imunodeficiência primária. Síndrome MonoMAC. Micobactérias não tuberculosas. Infecção fúngica invasiva.

MENDES-DE-ALMEIDA, Daniela Palheiro. **Detection of *GATA2* gene mutations in patients with non-tuberculosis mycobacteria or invasive fungal infections without known immunosuppression.** 2019. 99 s. Dissertation (Academic Master in Clinical Research on Infectious Diseases) – Oswaldo Cruz Foundation, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Rio de Janeiro, 2019.

ABSTRACT

Infections caused by non-tuberculosis mycobacteria (NTM) and invasive fungal infections (IFI) are regarded as opportunists in immunocompromised patients. However, in certain conditions, the type of immunosuppression is not evident and primary immunodeficiencies (PIDs) causes should be considered. Primary host immunodeficiencies, especially disorders in the interleukin-12 (IL-12)-interferon- γ (IFN- γ) are involved in the pathogenesis of these infections and have been increasingly studied. Among the genes, *Guanine-adenine-thymine-adenine 2* (*GATA2*), a master hematopoietic regulatory factor stands out. The *GATA2* gene defects carriers can develop progressive loss of dendritic cells, monocytes, B lymphocytes and Natural Killer cells. Sporadic or familiar mutations are related with a diverse range of diseases. These diseases are manifested by infections susceptibility, pulmonary dysfunction, lymphedema, warts, deafness, autoimmunity, aplastic anemia and malignancies, including myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML), that make up the MonoMAC and Emberger syndromes. The aim of this work is to identify *GATA2* mutations in patients with NTM and/or IFI without known immunosuppression in treatment at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, and to study the family members of the affected patients. Twenty-two (22) patients and 9 family members were enrolled between May 05th 2015 and September 11th 2018. Among the patients, 17 presented IFI, 4 MNT and 1 both infections. Six (6) patients developed a neoplastic disease besides the infection, consisted of MDS/AML, melanoma, non-Hodgkin lymphoma and ovarian cancer. After the extraction of the deoxyribonucleic acid from peripheral blood, we did the polymerase chain reaction followed by direct genetic sequencing of 5 exons and 1 intron of *GATA2* gene. The generated sequences were analyzed and the genetic variants were compared with reference database systems to evaluate the population frequency and clinical association. The T354M pathogenic mutation prevalence was 4.5% (1/22) and this mutation was also confirmed in his two sons. This patient was submitted to allogenic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), however he died 9 months later. In this cohort we also observed the probable benign polymorphism rs2335052 in 18.2% of the cases (4/22), and two benign polymorphisms, rs11708606 and rs369850507, in intronic regions had the 27.3% (6/22) and 4.5% (1/22) prevalence, respectively. The total mortality in 2 years study was 27.3% (6/22). The identification of *GATA2* gene mutations is important in patients with NMT and/or IFI without known immunosuppression because it can suggest a specific PID related with a variety of clinical symptoms and the development of MDS and AML in addition to solid malignancies. These diseases have high mortality and require an individualized treatment. The identification of *GATA2* mutations demands genetic counseling, infection prevention measures, hematologic surveillance and, in some cases, HSCT, the unique curative treatment up to now.

Key-words: *GATA2*. Primary Immunodeficiency. MonoMAC Syndrome. Non-tuberculosis mycobacteria. Invasive Fungal Infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Mecanismo imune de defesa contra micobactérias	22
Figura 2.	Vias de sinalização no reconhecimento inato de patógenos fúngicos e diferenciação de linfócitos T <i>helper</i> CD4 ⁺	23
Figura 3.	<i>GATA2</i> e fatores de transcrição relacionados à hematopoiese normal	25
Figura 4.	Mutações germinativas no gene <i>GATA2</i> em crianças e adolescentes com síndrome mielodisplásica	27
Figura 5.	Localizações mais frequentes de mutações em <i>GATA2</i> de acordo com as síndromes relacionadas	30
Figura 6.	Características clínicas da deficiência de <i>GATA2</i> , por órgãos e sistemas	31
Figura 7.	Modelo demonstrando o mecanismo mediado por <i>GATA2</i> de regulação do desenvolvimento linfático-vascular	32
Figura 8.	Representação da função pioneira do fator de transcrição <i>GATA2</i>	34
Figura 9.	Diagrama esquemático demonstrando a evolução da deficiência celular em <i>GATA2</i>	38
Figura 10.	Ilustração da localização da mutação Thr354Met no segundo ZF do gene <i>GATA2</i>	40
Figura 11.	Dominância negativa que a mutação Thr354Met exerce em relação a <i>GATA2-wild type</i>	41
Figura 12.	Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com locais da mutação no gene <i>GATA2</i> em pacientes com LMA de risco intermediário	42
Figura 13.	Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes com LMA estratificados em 3 grupos de acordo com status mutacional de <i>GATA2</i> e <i>CEBPA</i>	42
Figura 14.	Reações da Polimerase em Cadeia do gene <i>GATA2</i>	51
Figura 15.	Fluxograma de recrutamento de pacientes no INI	54
Figura 16.	Gráfico com distribuição de sexo e cor da pele autorreferida dos pacientes	55
Figura 17.	Gráfico com a distribuição de frequência das infecções nos 22 pacientes	56
Figura 18.	Gráfico com a distribuição de frequência das espécies de micobactérias não tuberculose	57

Figura 19.	Eletroferogramas indicando a presença dos polimorfismos no gene <i>GATA2</i> em heterozigose	64
Figura 20.	Linha do tempo de 20 anos com apresentação clínica de sinais, sintomas, alterações tomográficas e histopatológicas do paciente #2	65
Figura 21.	Heredograma mostrando o estudo nas três gerações da família do paciente #2	66
Figura 22.	Eletroferogramas do sequenciamento de <i>GATA2</i> mostrando a mutação c.1061 C>T; p.T354M	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação de síndromes mielodisplásicas segundo a revisão da OMS 2016	37
Tabela 2.	Classificação das neoplasias mieloides com predisposição germinativa segundo a revisão da OMS 2016	38
Tabela 3.	Indicações sugeridas para rastreio de mutações em <i>GATA2</i>	43
Tabela 4	<i>Primers</i> para PCR de <i>GATA2</i>	50
Tabela 5.	Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes	58
Tabela 6.	Dados laboratoriais dos pacientes	59
Tabela 7.	Dados morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e histopatológicos de medula óssea	61
Tabela 8.	Dados moleculares de sequenciamento genético e evolução clínica	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Receptor de androgênio
ASXL1	<i>Additional sex comb-like-1</i>
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRDM	Citopenia refratária com displasia multilinhagem
CTH	Célula-tronco hematopoiética
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCML	Deficiência de células dendríticas, monócitos e linfócitos
EBV	Epstein-Barr vírus
ETV6	<i>Translocation-Ets-leukemia virus</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FLT3	Tirosino-quinase 3 Fms-relacionado
GVHD	Doença do enxerto-versus-hospedeiro
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLH	Histiocitose Hematofagocítica
HPV	Papiloma vírus humano
HSV	Herpes vírus simplex
Inca	Instituto Nacional do Câncer José Alencar

INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IFI	Infecção fúngica invasiva
IFN- γ	Interferon-gama
IL-12	Interleucina-12
IPSS-R	<i>International prognosis scoring system-revisado</i>
JAK2	<i>Janus</i> quinase-2
JC	Vírus John Cunningham
KMT2A	Histone-lysine N-methyltransferase 2A
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LMMC	Leucemia mielomonocítica crônica
LNH	Linfoma não Hodgkin
MO	Medula óssea
MAF	Frequência do alelo menor
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
MNT	Micobactérias não tuberculosas
Mut	Mutado
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCR	Reação da polimerase em cadeia
PHOP	Programa de Hemato-Oncologia Pediátrica
PID	Imunodeficiência Primária
RAEB	Anemia refratária com excesso de blastos
RAEB2	Anemia refratária com excesso de blastos tipo 2
RAS	<i>Rat sarcoma vírus</i>
SF3B1	<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNP	<i>Singular nucleotide polymorphism</i>
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TB	Tuberculose
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	Transplante de célula tronco hematopoiética
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TYK2	Tirosino quinase-2
VZV	Varicela-zoster vírus
WT	<i>Wild-type</i>
WT1	Tumor de Wilms-1
ZF	<i>Zinc-finger</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Infecções micobacterianas não tuberculosas e fúngicas invasivas	18
1.2	Resposta imune a infecções micobacterianas não tuberculosas e fúngicas invasivas.....	20
1.3	O gene GATA2.....	23
1.4	Definição de mutação e polimorfismos genéticos	25
1.5	Mutações do gene GATA2	27
1.6	Epidemiologia das mutações em GATA2	28
1.7	Doenças relacionadas a mutações em GATA2	29
1.8	GATA2 e doenças hematológicas	35
1.9	Importância da detecção das mutações em GATA2 e tratamento	43
2	JUSTIFICATIVA	45
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo geral	46
3.2	Objetivos específicos	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Desenho do estudo.....	47
4.2	Casuística	47
4.2.1	População do estudo.....	47
4.2.2	Critérios de inclusão.....	47
4.2.3	Critérios de exclusão	48
4.2.4	Cálculo amostral.....	48
4.2.5	Análises estatísticas e demografia	48
4.3	Aspectos éticos.....	48
4.4	Materiais, procedimentos e técnicas	49
4.4.1	Procedimento para coleta de amostras biológicas.....	49

4.4.2	Extração de DNA	49
4.4.3	Reação de PCR para amplificação do gene <i>GATA2</i>	49
4.4.4	Reação de sequenciamento direto do gene <i>GATA2</i>	52
4.4.5	Demais exames	52
4.4.6	Dados sociodemográficos, epidemiológicos e clínicos	53
4.4.7	Análise do sequenciamento genético	53
5	RESULTADOS	54
5.1	Perfil demográfico e clínico dos pacientes	55
5.2	Frequência das mutações	62
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	85
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA FAMILIARES ADULTOS	88
	APÊNDICE C - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE).....	91
	APÊNDICE D - Submissão de Relato de caso na revista BMC Medical Genetics.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções micobacterianas não tuberculosas e fúngicas invasivas

Micobactérias não tuberculosas (MNT) estão presentes no solo, água e em diversos ambientes criados pelo homem (WU; HOLLAND, 2015). Infecções causadas por estes organismos, em grande parte não patogênicos, estão crescendo em todo o mundo e em países desenvolvidos são mais prevalentes que *Mycobacterium tuberculosis* (WU; HOLLAND, 2015). Avanços nas técnicas de imagem, microbiológicas e moleculares contribuíram para o aumento no diagnóstico destas infecções (STOUT; KOH; YEW, 2016). Em 2007, utilizando a nona edição da Classificação Internacional de Doenças, a prevalência da infecções por MNT foi de aproximadamente 47 por 100.000 habitantes, em população acima de 65 anos nos Estados Unidos da América, embora tenha havido grande variação na prevalência entre as regiões do país (STOUT; KOH; YEW, 2016). Doenças clínicas causadas por MNT incluem linfadenite, infecção em partes moles e pele, doença pulmonar e disseminada (WU; HOLLAND, 2015). O desfecho da exposição respiratória a MNT depende da interação complexa entre fatores relacionados a exposição (tamanho da partícula, tamanho dos microrganismos e duração da exposição) e fatores relacionados ao hospedeiro (*status* imune, *background* genético e presença de lesão pulmonar localizada ou generalizada) (STOUT; KOH; YEW, 2016). As espécies patogênicas de MNT variam bastante e dividem-se em micobactérias de crescimento lento, como *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. kansasii*, e *M. xenopi* e as de crescimento rápido, como *M. abscessus* (STOUT; KOH; YEW, 2016). *Mycobacterium avium complex* (MAC) é encontrado na maioria dos isolados pulmonares em todo o mundo. A relevância clínica desses isolados respiratórios, no entanto, parece variar dependendo da região geográfica, presumidamente de acordo com a distribuição da microbiota ambiental e de fatores de risco do hospedeiro (STOUT; KOH; YEW, 2016).

Micoses endêmicas são causadas por um grupo diverso de fungos que ocupam nichos ecológicos específicos no meio ambiente. Os grupos de fungos patogênicos incluem *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Talaromyces marneffe* (conhecido como *Penicillium marneffe*) e *Emmonsia* spp., que pertencem ao filo Ascomycota (LEE; LAU, 2017). Eles compartilham a característica em comum de dimorfismo térmico, que na temperatura ambiente crescem como fungos sapróbios na amplitude térmica ambiente entre 25

e 30 °C e mudam sua morfologia para forma de leveduras ou esférulas, no caso de *Coccidioides* spp., na temperatura corporal dos hospedeiros mamíferos (LEE; LAU, 2017) ou a temperaturas de 37°C. Micoses endêmicas ocorrem predominantemente em específicas áreas climáticas. Coccidioidomicose está presente em áreas semi-desérticas, enquanto histoplasmosose e paracoccidioidomicose (PCM) são mais comuns em áreas tropicais (LEE; LAU, 2017). Coccidioidomicose e histoplasmosose são distribuídos amplamente no continente americano e algumas regiões tropicais, enquanto PCM é limitado à América Central e do Sul (LEE; LAU, 2017). *S. schenckii* sensu lato é encontrado mundialmente, sendo mais reportado em zonas temperadas e tropicais com alta umidade e temperaturas amenas (22-27 °C) (LEE; LAU, 2017). A forma leveduriforme permite o crescimento intracelular nos fagócitos do hospedeiro (LEE; LAU, 2017). A maioria desses microrganismos são primariamente patogênicos e podem causar doença em indivíduos saudáveis. No entanto, podem causar formas graves e disseminadas em indivíduos imunocomprometidos (LEE; LAU, 2017). A incidência anual estimada de micoses sistêmicas ainda apresenta lacunas, uma vez que na maioria dos países não são de notificação compulsória. Dentre as mais comuns, com base na experiência de serviços de referência no atendimento de pacientes com PCM no Brasil, acredita-se que sua incidência em zonas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos / milhão até 1 a 3 novos casos / 100.000 habitantes ao ano (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). Em estudo recente nos Estados Unidos da América, as taxas anuais de incidência de *H. capsulatum* foram maiores para Arkansas, Illinois, Indiana, Michigan e Minnesota variando entre 0 a 4,3 casos / 100.000 habitantes, não havendo aumentos ou reduções consistentes ao longo do período de 4 anos (ARMSTRONG et al., 2017). A prevalência de infecções fúngicas causadas por patógenos mais comuns, geralmente agentes de micoses oportunistas, é 72-228 infecções por milhão populacional para *Candida* spp., 30-66 infecções por milhão populacional para *C. neoformans* e 12-34 infecções por milhão populacional para *Aspergillus* spp. As infecções variam desde fungemia relacionada a cateter, infecções localizadas (pulmão, pele ou seios paranasais) a disseminação hematogênica (PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2006). A relação de pacientes de risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas (IFI) inclui os submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), transplante de órgãos sólidos, pós-operatório de grandes cirurgias, portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida, doenças neoplásicas, idade avançada, terapia imunossupressora, prematuridade (PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2006), além das imunodeficiências primárias (PIDs) (LEE; LAU, 2017). Defeitos no desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T, funções fagocíticas e vias envolvidas no

reconhecimento inato de patógenos e sinalização estão associadas a risco aumentado dessas infecções (LEE; LAU, 2017).

1.2 Resposta imune a infecções micobacterianas não tuberculosas e fúngicas invasivas

Os mecanismos de defesa imune são encontrados em diversos seres vivos e podem ser incrivelmente elaborados. No ser humano, envolve a imunidade inata ou nativa, inicialmente responsável por bloquear a entrada de patógenos ou ainda combater rapidamente os que conseguem entrar nos tecidos do hospedeiro, e a imunidade adquirida ou específica, que é um tipo de defesa desenvolvida após entrar em contato com o microrganismo invasor (ABBAS; LICHTMAN, 2004). Participam da resposta inata, barreiras físicas como o epitélio, fagócitos, células *Natural Killer* (NK) e o sistema complemento. Da resposta adaptativa, participam os linfócitos B, T e anticorpos. Além da defesa inicial, a resposta inata também estimula a resposta adaptativa (ABBAS; LICHTMAN, 2004). Esta é composta pela imunidade humoral, que é constituída por anticorpos produzidos pelos linfócitos B que neutralizam os microrganismos e toxinas no sangue e outros tecidos, e imunidade celular, composta por linfócitos B, células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas e macrófagos, além das células efetoras, como os linfócitos T e granulócitos (ABBAS; LICHTMAN, 2004).

Infecções por MNT e IFI são consideradas oportunistas em indivíduos com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) avançada ou em uso de medicações imunossupressoras (LEE; LAU, 2017; WU; HOLLAND, 2015). No entanto, o manejo de casos recorrentes e refratários é um desafio também em outros cenários clínicos. Em determinadas situações, o reconhecimento do defeito imune genético é crucial para o tratamento, prevenção e rastreio familiar (WU; HOLLAND, 2015).

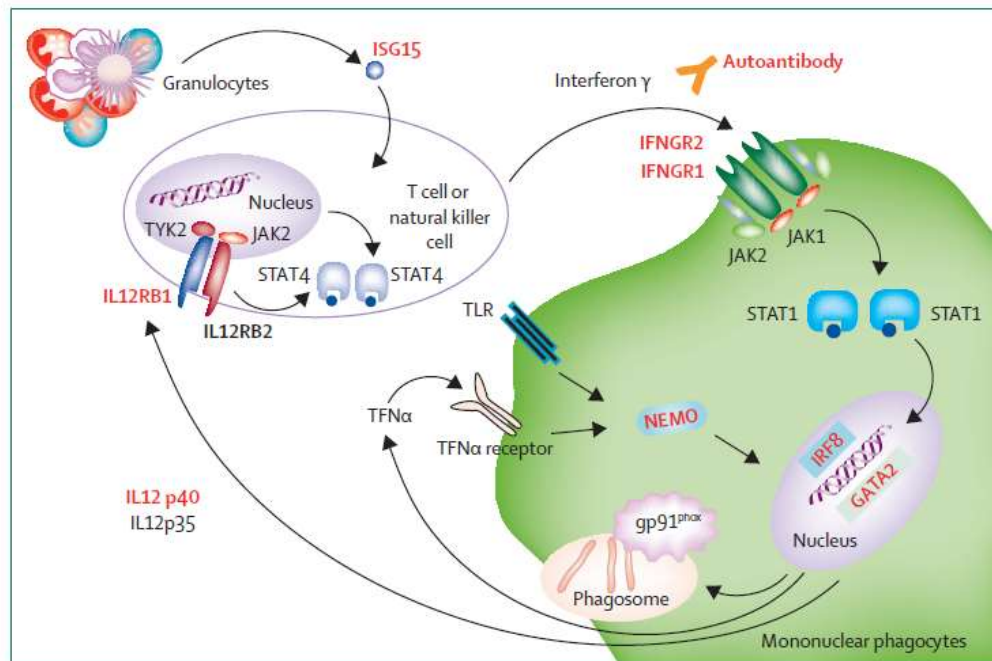
Desde 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a classificação das PIDs, e recentemente, as causas monogênicas de hipogamaglobulinemia e aquelas associadas à desregulação imune foram os grupos que mais sofreram atualizações com o advento das novas tecnologias, como o sequenciamento de próxima geração (PICARD et al., 2018). No momento, existem 354 doenças distintas com 344 defeitos genéticos listados (PICARD et al., 2018).

Defeitos na diferenciação e desenvolvimento de células T, fagocitose e vias envolvidas no reconhecimento inato de patógenos e sinalização estão associados com risco aumentado de IFI (LEE; LAU, 2017). Desordens do eixo interleucina 12 (IL-12)–interferon- γ (IFN- γ) são

relacionadas e estão sendo cada vez mais estudadas em infecções por MNT (WU; HOLLAND, 2015) e fúngicas invasivas (LEE; LAU, 2017; LIONAKIS, 2012).

A imunidade para combater infecções por MNT e fungos exige uma interação eficiente entre os compartimentos mieloide e linfoide (LEE; LAU, 2017; LIONAKIS, 2012; WU; HOLLAND, 2015). Após engolfar a micobactéria ou fungo, o fagócito mononuclear produz IL-12, que estimula a célula T e/ou NK através do receptor de IL-12, um heterodímero de IL12RB1 e IL12RB2 (ver Figura 1). O receptor de IL-12 sinaliza via Tirosino quinase-2 (TYK2) e *Janus* quinase 2 (JAK2), levando à fosforilação da proteína *Signal Transducer and Activator of Transcription 4* (STAT4), sua homodimerização e translocação nuclear para induzir a produção de IFN- γ pela célula T-*helper1* (Th1). Interferon- γ , por sua vez, liga-se ao seu receptor IFNGR, que consiste em heterodímeros IFNGR1 e IFNGR2. A ligação do IFN- γ ao seu receptor leva à fosforilação de JAK2, JAK1 e à homodimerização do STAT1 fosforilado (pSTAT1). O homodímero pSTAT1 então se transloca para o núcleo e se liga aos elementos da sequência de ativação do IFN- γ (GAS) estimulando a transcrição dos genes responsivos a IFN- γ , dentre eles o *Guanine-adenine-thymine-adenine 2* (GATA2) (LIONAKIS, 2012; WU; HOLLAND, 2015). Esses genes de transcrição permitem a ativação macrófágica, diferenciação e posterior estímulo à expressão de IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que é essencial para a formação do granuloma (WU; HOLLAND, 2015). Esses eventos criam macrófagos ativados capazes de debelar microrganismos intracelulares, ajudando a maturação do fagossomo, induzindo a escassez de nutrientes, autofagia, exposição a peptídeos antimicrobianos e espécies de radicais de oxigênio. A via mediada pelo modulador essencial NF κ B (NEMO) e o estresse oxidativo produzido pelo macrófago também são cruciais para o efeito protetor contra a infecção por micobactérias (WU; HOLLAND, 2015), ver Figura 1.

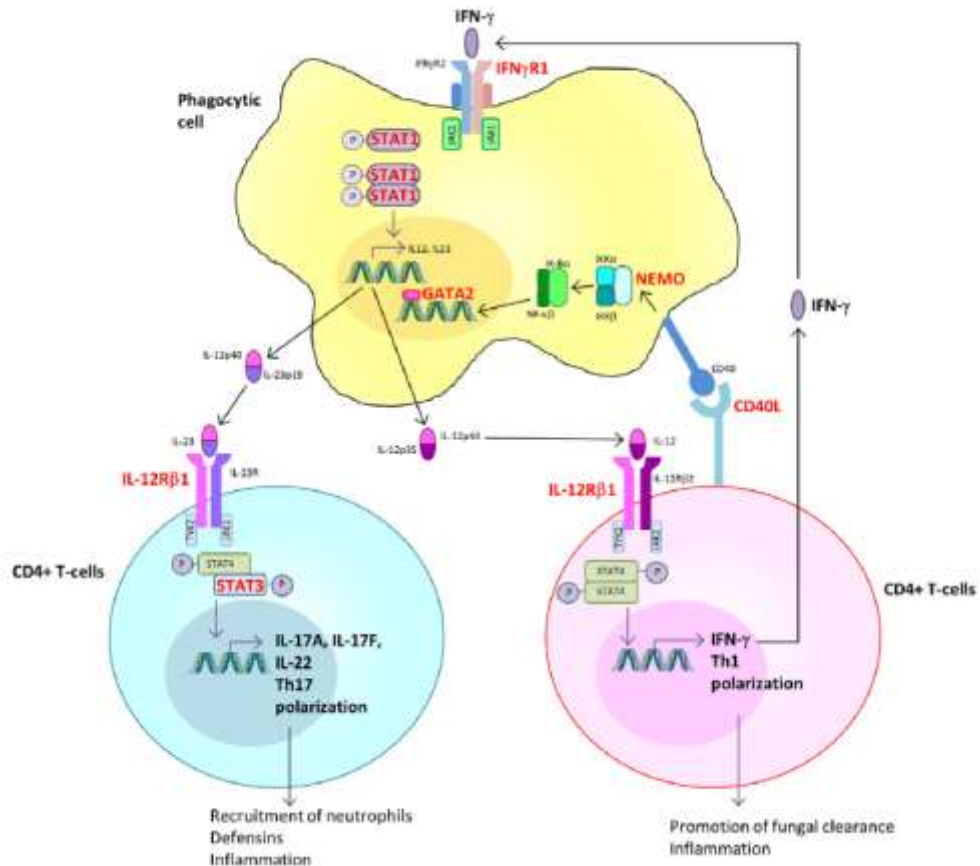
Figura 1 - Mecanismo imune de defesa contra micobactérias



IFN- γ – Interferon gama; IL–12– Interleucina 12. Fonte: Figura adaptada de (WU; HOLLAND, 2015).

No caso da resposta imune a infecções fúngicas, a IL-12 além de estimular a resposta Th1 e consequente produção de IFN- γ , também induz a diferenciação Th17 adaptativa imune através do estímulo IL-1 β , IL-6 e IL-23 (LEE; LAU, 2017), conforme mostra a Figura 2.

Figura 2 - Vias de sinalização no reconhecimento inato de patógenos fúngicos e diferenciação de linfócitos T *helper* CD4⁺.



IFN- γ – Interferon gama; IL–12– Interleucina 12. Fonte: Figura adaptada de (LEE; LAU, 2017).

O reconhecimento de um defeito imune de base nesses indivíduos é imprescindível para o tratamento, prevenção e rastreamento familiar. Mutações genéticas autossômicas nesse eixo podem conferir predisposição a infecções por MNT e IFI, o que torna o diagnóstico molecular mandatório. Essas infecções graves ocorrem frequentemente em crianças pequenas e podem muitas vezes se apresentar concomitante a determinadas síndromes (WU; HOLLAND, 2015). Quando o início das infecções acontece tardiamente, deve-se considerar causas adquiridas de imunodeficiência, como a presença de anticorpos anti-IFN- γ . Nesta condição, no entanto, os valores de monócitos, linfócitos T CD4⁺ e outros linfócitos T estão preservados, o que diferencia as mutações em *GATA2* (WU; HOLLAND, 2015).

1.3 O gene *GATA2*

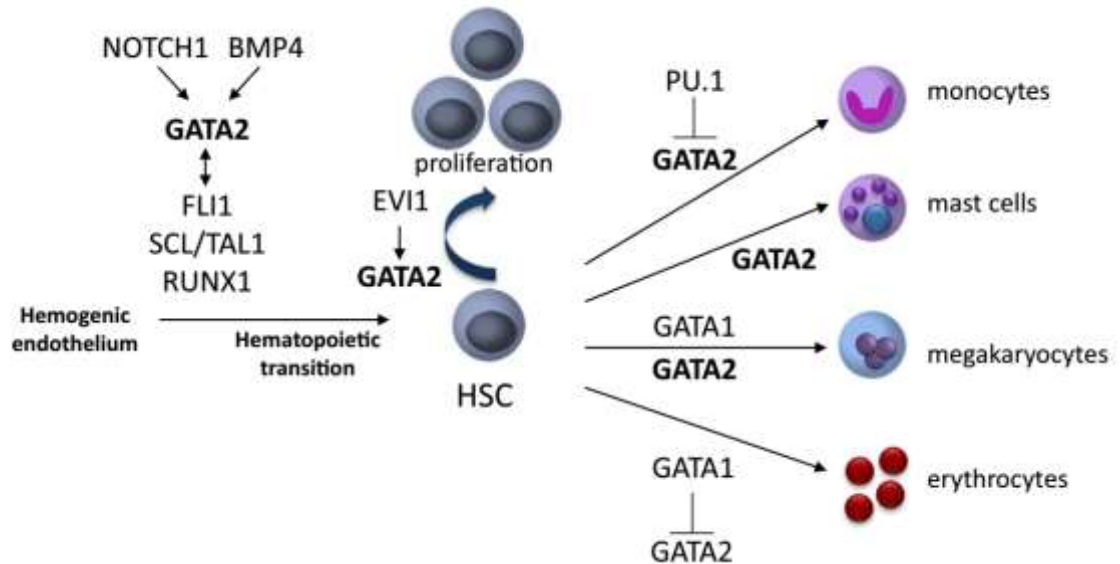
O conjunto de fatores de transcrição da família *GATA* recebeu esse nome devido a sua habilidade de ligar à sequência de DNA contendo (A/T-GATA-A/G) por dois domínios *zinc-*

finger (ZF) altamente conservados (VIGER et al., 2008). Os fatores *GATA* 1, 2 e 3 são essenciais para a hematopoiese normal de em mamíferos e suas mutações podem ser responsáveis por diversas doenças hematológicas. Já os fatores *GATA* 4, 5 e 6 estão principalmente relacionados a doenças cardiológicas (RODRIGUEZ-BRAVO et al., 2017; ZHENG; BLOBEL, 2010). As proteínas da família *GATA* desempenham papéis essenciais no desenvolvimento de vários tipos celulares, incluindo linhagens hematopoiéticas, cardíaca e vascular (ZHENG; BLOBEL, 2010).

O gene *GATA2*, localizado no cromossomo 3q21 tem 3.730 kb, possui 6 exons e um íntron, dois domínios ZF (HSU et al., 2011). É considerado um regulador mestre da hematopoiese e codifica a proteína *GATA2*, que atua como fator de transcrição em diversos tecidos (HSU et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012). *GATA2* é expresso largamente em células hematopoiéticas, principalmente células-tronco e progenitoras, precursores eritroides, megacariócitos e mastócitos (LUESINK et al., 2012).

Conforme ilustrado na Figura 3, *GATA2* tem uma função essencial no surgimento de células-tronco hematopoiéticas (CTH) a partir do endotélio hemogênico no processo chamado transição hematopoiética endotelial. Neste processo, a expressão de *GATA2* é regulada por *NOTCH* e *BMP4*, e sofre interação com outros fatores hematopoiéticos, como *FLII*, *SCL/TALI* e *RUNX1* (HIRABAYASHI et al., 2017; RODRIGUES et al., 2012). Além disso, a proliferação de CTH é controlada por *EVI1*, que se liga à região promotora *GATA2* como potencializador. *GATA2* liga-se a uma complexa rede de fatores de transcrição podendo ele próprio ser ativado ou reprimido ou controlar a expressão deles, dependendo do estágio da hematopoiese. *GATA2* é essencial para a manutenção das CTH, mas também está envolvido na ativação da expressão inicial de *GATA1* nos primeiros passos da diferenciação eritroides/megacariocítica. Este processo é conhecido como “*GATA factor switching*” (SUZUKI et al., 2013). Na hematopoiese de adultos, *GATA2* é necessária para a sobrevivência e auto renovação, interagindo com vários fatores de transcrição que especificam o comprometimento precoce de linhagem, como *SPI1* (PU.1), *FLI1*, *TAL1* (*SCL*), *LMO2* e *RUNX1*, dentre outros (DICKINSON et al., 2014). No desenvolvimento de monócitos e eritrócitos a expressão de *GATA2* é desligada ou deslocada por outros fatores de transcrição. *GATA2* está envolvido especialmente na diferenciação de mastócitos e megacariócitos (HIRABAYASHI et al., 2017). As proteínas *GATA1* e 2 interagem com o fator de transcrição PU.1 de forma a determinar o comprometimento das linhagens eritroide e mieloide durante a hematopoiese (ZHANG et al., 1999).

Figura 3 - *GATA2* e fatores de transcrição relacionados à hematopoiese normal



GATA2 tem função essencial no surgimento de células-tronco hematopoéticas (HSC) a partir do endotélio hemogênico no processo chamado transição hematopoética endotelial. Fonte: Figura adaptada de (HIRABAYASHI et al., 2017)

A ausência completa da expressão do gene *GATA2* em modelos murinos leva a uma anemia grave incompatível com a vida (SPINNER et al., 2014). Em 2011, pela primeira vez um grupo de pacientes com doenças infecciosas foi descrito em associação a mutações em *GATA2* (HSU et al., 2011).

1.4 Definição de mutação e polimorfismos genéticos

Define-se como mutação, a alteração na sequência do DNA cuja frequência na população é menor que 1% e polimorfismo, uma variante do normal com frequência maior que 1%. Essa separação é artificial e por vezes confusa, pois ambas são alterações na sequência do DNA e os mecanismos formadores são similares (CSABA SZALAI, 2013). Podem variar de alterações muito pequenas ou pontuais, como *single nuclear polymorphisms* (SNPs) ou grandes, como mutações cromossômicas estruturais (CSABA SZALAI, 2013). As mutações são classificadas como somáticas, quando ocorrem em células doentes e passadas sucessivamente para as demais células tumorais, caracterizando um clone após as divisões celulares. Já as mutações germinativas ocorrem em todas as células do organismo, podem ser herdadas ou ocorrer durante a gametogênese. Como podem ser passadas para futuras gerações, desperta um

interesse médico peculiar (CSABA SZALAI, 2013). O primeiro indivíduo identificado como portador de uma mutação germinativa em uma família é denominado probando.

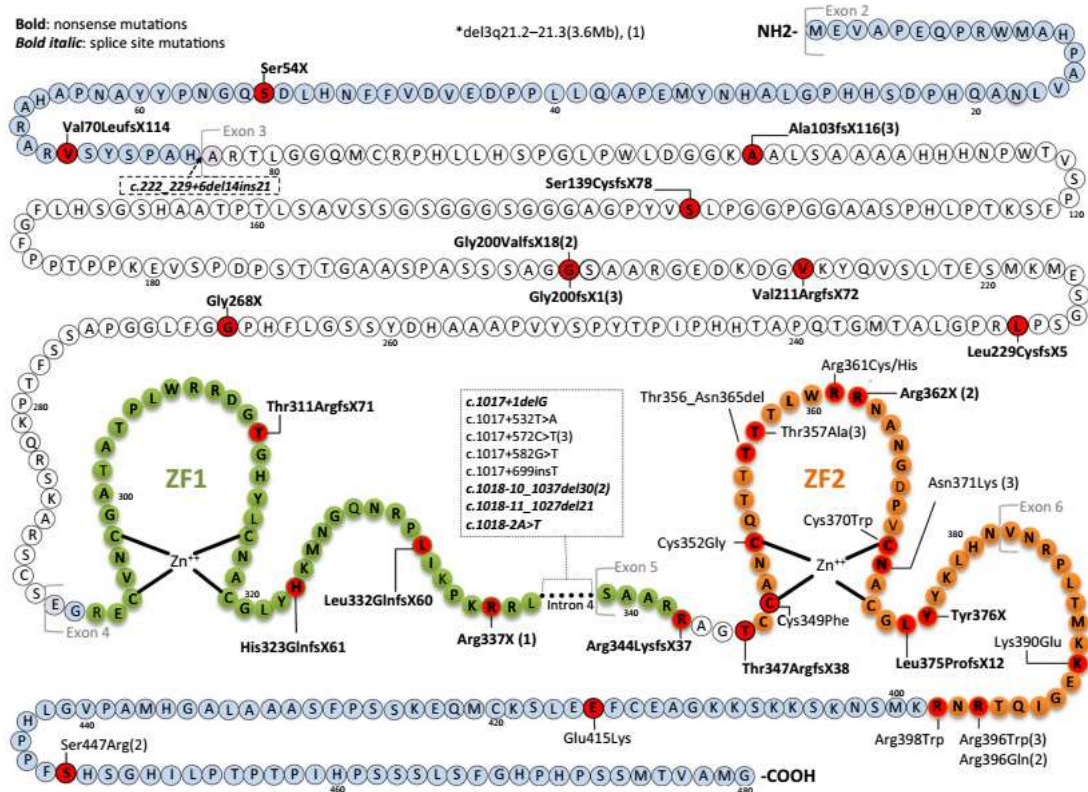
As mutações genéticas podem acontecer em uma única base nitrogenada de um gene, e por isso serem chamadas de pontuais, ou afetar o gene em maior proporção. Na mutação limitada a uma única base nitrogenada, pode ocorrer adição, deleção ou substituição. Se o número de bases adicionadas ou deletadas não for igual a três, ou seu múltiplo, é gerada a mutação *frameshift*. Isto quer dizer que a leitura de transcrição da informação codificada abaixo do sítio de mutação será alterada (CSABA SZALAI, 2013). Se o número de bases nitrogenadas inseridas ou deletadas foi igual ou múltiplo de 3, a mutação *inframe* acontece, afetando apenas a esta seção de informação e preserva o restante do gene. Existem ainda duas outras possibilidades de substituição de bases, a transição e a transversão. Na primeira, uma base purínica é substituída por outra purínica e a pirimidínica substituída por outra pirimidínica, ex. $A \rightarrow G$ ou $C \rightarrow T$. No último caso, uma base purínica é substituída por uma pirimidínica, ou vice-versa. Os efeitos das mutações por substituição são muito variados. Após uma mutação *missense*, o códon muda, e, portanto, um aminoácido diferente é incorporado à proteína. Já após uma mutação *nonsense*, o códon original torna-se um *stop codon*, portanto a cadeia de proteína termina precocemente e resultará numa proteína menor. No caso de uma mutação silenciosa ou *sense*, apesar do códon mudar, o mesmo aminoácido é incorporado à proteína, portanto a mutação não gera consequências (CSABA SZALAI, 2013).

Os fenômenos epigenéticos são capazes de alterar a função e, portanto a expressão de cada gene, sem afetar a sequência de DNA em si (CSABA SZALAI, 2013). Alteram a cromatina, composta de DNA e histonas, estruturas ligadas e enoveladas às fitas de DNA. Podem ocorrer, por exemplo a metilação do DNA ou a modificação de histonas. As histonas modificadas, também atraem outras proteínas diferentes não histonas, gerando cromatinas funcionalmente afetadas e remodeladas (CSABA SZALAI, 2013). As cromatinas podem ser encontradas em dois estágios funcionais: heterocromatina, representando a cromatina fechada em estado não passível de transcrição e a eucromatina, estrutura aberta, solta, acessível para componentes envolvidos na transcrição. Modificações epigenéticas permitem um controle adicional e mais fino do processo de transcrição (CSABA SZALAI, 2013).

1.5 Mutações do gene *GATA2*

O espectro mutacional em *GATA2* é heterogêneo e consiste em mutações *missense*, a maioria localizada nos domínios ZF; mutações nulas, a maioria acima dos domínios ZF; defeitos em *splicing*; mutações na região potencializadora localizada no íntron 4 e mais raramente, deleções exônicas e de todo o gene (DONADIEU et al., 2018; HSU et al., 2013). Mutações germinativas no gene *GATA2* em crianças e adolescentes com síndrome mielodisplásica (SMD) estão representadas na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura da proteína *GATA2* indicando locais de mutações germinativas em crianças e adolescentes com síndrome mielodisplásica



Estrutura da proteína *GATA2* com seus dois domínios *zinc-finger*, marcados de verde (ZF1) e laranja (ZF2) funcionalmente importantes. As 42 mutações estão representadas como bolinhas vermelhas e foram reportadas anteriormente (WLODARSKI et al., 2016). Fonte: Figura adaptada de (HIRABAYASHI et al., 2017)

Indivíduos com mutações germinativas em *GATA2* transmitem a predisposição de maneira autossômica dominante e geralmente apresentam o diagnóstico de malignidades hematológicas em idade mais precoce, com doença mais agressiva e de pior prognóstico quando comparado com casos esporádicos (HAHN et al., 2011). Mutações somáticas em *GATA2* são

encontradas em subtipos específicos de leucemia mieloide, como a leucemia mieloide crônica (LMC) em crise blástica, leucemia mieloide aguda (LMA) monocítica, classificação Franco-Americana-Britânica FAB M5, e LMA com citogenética normal e mutações mono ou bi-alélicas em *CEBPA* (CHONG et al., 2018; MARCEAU-RENAUT et al., 2015). Mutações somáticas *missense* ocorrem predominantemente no ZF1 do gene *GATA2*, com exceção das sL359V (ZHANG et al., 2008) e sR362Q (MARCEAU-RENAUT et al., 2015) no ZF2. Em contraste, nenhuma mutação germinativa *missense* ocorre no ZF1, enquanto todas ocorrem no domínio ZF2 e na região vizinha ao C-terminal (HAHN et al., 2011; HSU et al., 2011; VINH et al., 2010).

1.6 Epidemiologia das mutações em *GATA2*

Apesar das pesquisas, a prevalência da mutação em *GATA2* ainda é pouco estudada (SPINNER et al., 2014). Até 2018, foram relatados cerca de 400 casos de pacientes com mutações patogênicas em *GATA2* em várias séries mundiais (WLODARSKI; SAHOO; NIEMEYER, 2018). Uma revisão realizada pelo *National Institute of Health* (NIH) com 57 pacientes demonstrou que a manifestação clínica inicial dos pacientes com o gene *GATA2* mutado ocorre por volta dos 20 anos de idade, variando de 5 a 78 anos de idade, mais frequentemente por motivo infeccioso viral, micobacteriano e fúngico (SPINNER et al., 2014). Os sintomas impactaram na sobrevida global dos pacientes, com 67% sobrevivendo 20 anos após o diagnóstico (SPINNER et al., 2014). Já outro trabalho acompanhou 79 indivíduos franceses e belgas diagnosticados de 2011 a 2016 (DONADIEU et al., 2018). A mediana de idade da primeira manifestação clínica foi 18,6 anos (variação de 0-61 anos). Infecções graves por micobactérias, fungos ou papiloma vírus humano (HPV) e malignidades hematológicas foram as apresentações mais frequentes (DONADIEU et al., 2018). A probabilidade de não apresentar sintomas foi de 8% aos 40 anos. Foi observado um caso de leucemia aguda de células T associada à monossomia do cromossomo 7 e um caso de neonato com leucemia mielo-monocítica juvenil. Foi observado também um caso de encefalite pelo vírus John Cunningham (JC). O Sistema de escore internacional de prognóstico revisado (IPSS-R) para SMD mais frequentemente encontrado nos pacientes foi o intermediário (51%). Doze pacientes apresentaram infecções por MNT (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. chelonae* e *M. genavense*) e todos eles apresentavam citopenias com monocitopenia, SMD ou ambos. Dezoito pacientes apresentaram infecções fúngicas, sendo 11 por *Aspergillus* spp., 5 por *Candida* spp. e 2 com

mucormicose, sendo 8 durante quimioterapia ou TCTH. Nesta casuística, 27 pacientes (34%) morreram com mediana de idade de 29 anos. Análises de sobrevida demonstraram mortalidade de 6% aos 20 anos, 42% aos 40 e 69% aos 60 anos. As principais causas de morte após os 40 anos foram infecções bacterianas ou virais. A probabilidade de desenvolver SMD ou LMA rapidamente cresceu de 39% aos 20 para 80% aos 40 anos. Foram encontradas mutações principalmente nos exons 4 e 5. Dentre os 53 probandos, foram encontradas em 24 mutações *missense*, incluindo 4 alelos recorrentes, 21 tinham mutações *nonsense* e *frameshift*, 4 tinham deleção de todo o gene, 2 tinham defeitos em *splicing* e 2 pacientes tinham mutações complexas (DONADIEU et al., 2018). Houve significativamente mais casos de leucemia em pacientes com mutações *missense* ($n=14$ de 34) do que pacientes com mutações *nonsense* ou *frameshift* ($n=2$ de 28). Exceto linfedema, que é mais comum em pacientes com mutações regulatórias ou nulas, nenhuma correlação entre o tipo ou localização da mutação do gene *GATA2* e o fenótipo clínico ou biológico foi estabelecida (DONADIEU et al., 2018). Foram ainda observados neste estudo 5 casos de indivíduos assintomáticos, incluindo um paciente de 60 anos, sugerindo uma penetrância incompleta do gene (DONADIEU et al., 2018).

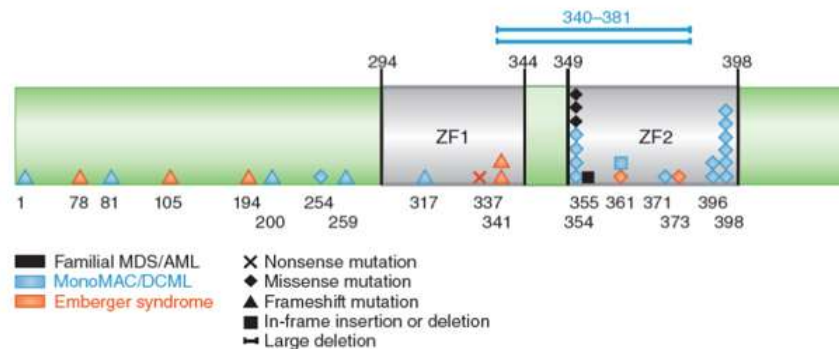
1.7 Doenças relacionadas a mutações em *GATA2*

Haploinsuficiência ou deficiência da proteína *GATA2*, causada por mutações esporádicas e familiares foram atribuídas em 2011 a um fenótipo amplo de doenças que congrega susceptibilidade a infecções, proteinose alveolar pulmonar, linfedema, verrugas, surdez, autoimunidade, insuficiência medular e malignidades, incluindo LMA (HSU et al., 2011). A concomitância de monocitopenia e a susceptibilidade a infecções por MNT, tipicamente *Mycobacterium avium complex*, foi reconhecida como Síndrome MonoMAC em 2010 por Vinh e colaboradores (CALVO et al., 2011; HSU et al., 2011; VINH et al., 2010). Em sua série de 18 casos de pacientes com infecções por MNT ou outras infecções oportunistas, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 31 anos. Ele chamou a atenção para a presença de SMD ou LMA em metade dos pacientes aos 32 anos, e complicações associadas a SMD e LMA que ocorreram em 4 dos 5 casos de morte em sua coorte. Com isso, sugeriu que a mortalidade nessa condição poderia chegar a 28% (VINH et al., 2010).

Em 2011, a Síndrome MonoMAC foi associada a 12 mutações no gene *GATA2* afetando 20 pacientes e familiares e foi mais frequentemente observada no ZF2 (HSU et al., 2011). A Figura 5 ilustra as localizações mais frequentes de mutações em *GATA2* de acordo com as

síndromes relacionadas. Até 2017, 380 pacientes com deficiência do fator de transcrição *GATA2* foram reportados, com uma estimativa aproximada de prevalência de neoplasia mieloide de 75% (HIRABAYASHI et al., 2017).

Figura 5 - Localizações mais frequentes de mutações em *GATA2* de acordo com as síndromes relacionadas

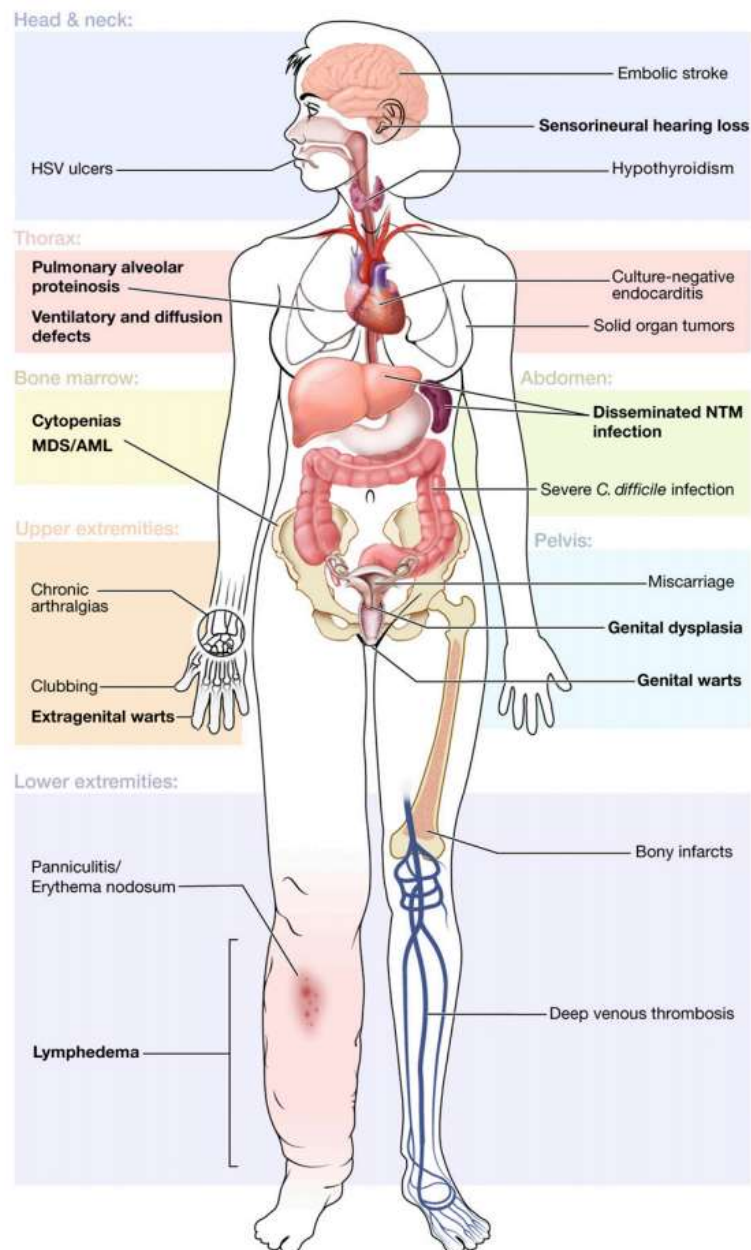


ZF1- *Zinc-finger 1*; ZF2- *Zinc-finger 2*. MDS- Síndrome mielodisplásica; AML- Leucemia mieloide aguda; DCML- Deficiência de células dendríticas, monócitos e linfócitos. Fonte: Figura adaptada de (MIR et al., 2015).

Como o gene *GATA2* está associado também ao desenvolvimento dos sistemas vascular e linfático, pacientes com a mutação podem apresentar linfedema, na infância ou adolescência, tipicamente unilateral. A síndrome genética associada às mutações em *GATA2* e linfedema primário é denominada Síndrome de Emberger e é caracterizada ainda por surdez neurossensorial, verrugas cutâneas, baixa relação $CD4^+/CD8^+$ e predisposição ao desenvolvimento de SMD e LMA (COLLIN et al., 2015; MIR et al., 2015). Outras síndromes associadas a haploinsuficiência *GATA2* são a Deficiência de células dendríticas, monócitos e linfócitos B e NK (DCML) e a SMD/LMA familiar (COLLIN; DICKINSON; BIGLEY, 2015).

Os indivíduos com mutações patogênicas em *GATA2* podem manifestar clinicamente a sobreposição destas síndromes, que são consideradas variações de apresentação de uma única doença genética autossômica dominante. Características clínicas da deficiência de *GATA2*, por órgãos e sistemas, estão representadas na Figura 6. Parâmetros hematológicos podem ser totalmente normais antes do surgimento da SMD ou LMA (MIR et al., 2015). A proteinose alveolar pulmonar pode ser encontrada com frequência de 18% na síndrome MonoMAC e pode ser explicada pois *GATA2* regula a fagocitose por macrófagos pulmonares (LASBURY et al., 2003).

Figura 6 - Características clínicas da deficiência de *GATA2*, por órgãos e sistemas

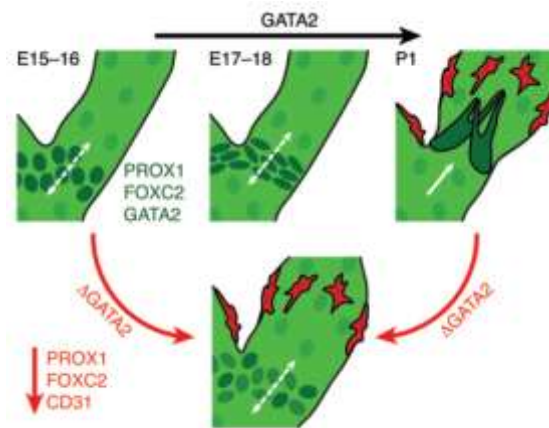


Achados clínicos comuns estão indicados de acordo com o sistema afetado. Achados primários estão indicados em negrito. Fonte: Figura adaptada de (SPINNER et al., 2014)

GATA2 é necessário para a formação e manutenção das valvas dos vasos linfáticos e venosos (KAZENWADEL et al., 2015). Vasos linfáticos deficientes em *GATA2* são ectasiados, com células musculares lisas aberrantes e dismórficas (KAZENWADEL et al., 2015). Justificando este fenótipo, foram identificados elementos intensificadores em ambos os *loci* dos fatores de transcrição PROX1 e FOXC2 ligados a *GATA2* e revelam que nenhum desses dois fatores de transcrição, que são importantes no desenvolvimento vascular linfático, estão

elevados em territórios formadores de valvas na ausência de *GATA2* (KAZENWADEL et al., 2015), conforme ilustra a Figura 8. A maioria dos casos de linfedema associado à deficiência de *GATA2* está relacionada à perda completa de função de um alelo *GATA2*, por exemplo, por deleção ou perda de heterozigose (KAZENWADEL et al., 2015).

Figura 7 - Modelo demonstrando o mecanismo mediado por *GATA2* de regulação do desenvolvimento linfático-vascular



GATA2 está elevado nos territórios formadores de valvas no início do desenvolvimento dos vasos linfáticos e regula os níveis de *PROX1* e *FOXC2* nas células endoteliais formadoras das valvas. Fonte: Figura adaptada de (KAZENWADEL et al., 2015)

Infecções afetam 82% dos pacientes com Síndrome MonoMAC, sendo as virais as mais comuns (70%), particularmente por HPV em 63% dos casos, associada a verrugas resistentes, condilomas e/ou displasia. Infecções graves por herpes vírus são descritas em 35% dos pacientes, além de estomatite herpética recorrente, esofagite e infecções genitais, varicela grave e pneumonia por citomegalovírus ou doença disseminada (SPINNER et al., 2014). A ocorrência significativa de infecções virais, como HPV, herpes vírus simplex (HSV) e vírus varicela-zoster (VZV), reflete provavelmente a grave deficiência de NK na síndrome MonoMAC (HSU et al., 2011). A haploinsuficiência de *GATA2* deve ser considerada como potencial diagnóstico diferencial em pacientes com linfo-histiocitose hematofagocítica (HLH), síndrome de hiperinflamação potencialmente fatal, especialmente se houver persistência das citopenias após recuperação da HLH e deficiência de células NK, já tendo sido identificada em três relatos de caso, todos após infecções virais: Epstein-Barr vírus (EBV), HSV-1 e VZV (GROSSMAN et al., 2014; PRADER et al., 2018; SPINNER et al., 2016). Um caso de encefalite por West Nile vírus em paciente de 24 anos com história progressiva de verrugas de extremidade por HPV,

linfedema e sinusopatias de repetição, além de monocitopenia e linfopenia graves foi descrito associado a deleção no ZF2 de *GATA2* (ROSA et al., 2019).

Infecções disseminadas por MNT estão presentes em 53% e incluem tanto os microrganismos de crescimento lento, como pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium*, *M. kansasii* e *M. szulgai*; como as de crescimento rápido, como *M. fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae* (SPINNER et al., 2014). MNT são encontradas no solo e na água, e infecções em adultos tipicamente são resultado de exposição ambiental. A infecção mais comum nestes pacientes é causada pelas MNT pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium*, seguidas por *M. kansasii*. Apesar da prevalência das doenças pulmonares por MNT estar aumentando em todo o mundo, a doença disseminada é infrequente e pode sinalizar um contexto de imunodeficiência (SPINNER et al., 2014).

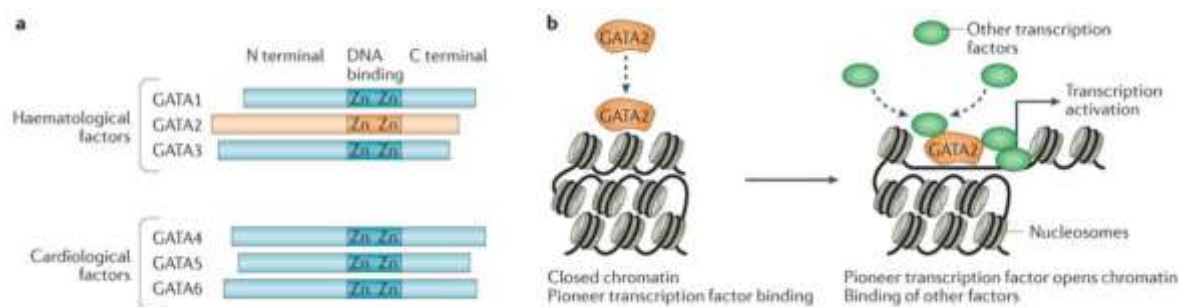
Nos pacientes com mutações em *GATA2*, outras infecções bacterianas graves podem ser observadas, como bacteremia (21%), infecções de pele e partes moles (19%), pneumonia (14%) e colite (9%). Infecções por *Clostridium difficile* são particularmente graves, e podem estar associadas a diferentes desfechos, como colectomia, megacolon tóxico e óbito. Em relação às infecções fúngicas graves, são descritas a aspergilose (9%), histoplasmose (5%) e candidíase mucosa resistente (5%) (SPINNER et al., 2014).

As manifestações dermatológicas são frequentemente um indicador de infecção ou malignidade subjacente. Verrugas recorrentes estão presentes na maioria dos pacientes (53%) e são a manifestação inicial da doença. Verrugas comuns e planas estão presentes nas extremidades (39%) e genitália (32%) e são tipicamente refratárias a cauterização, crioterapia, imiquimod tópico, 5-flouracil, corticosteroides e laserterapia. Paniculite ou eritema nodoso comprovado por biópsia é visto em 30% dos pacientes e foi frequentemente associado a MNT ou infecção fúngica. Câncer de pele, incluindo carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas e melanoma metastático também são descritos, assim como Síndrome de Sweet, observada em pacientes com SMD ou LMA como doença de base (SPINNER et al., 2014). A incidência de melanoma está aumentada, de maneira geral, em indivíduos imunocomprometidos (KUBICA; BREWER, 2012). Um estudo retrospectivo de 72 pacientes com deficiência da proteína *GATA2* identificou 2 pacientes com melanoma (NGUYEN et al., 2017). Apesar dos defeitos na imunidade celular encontrados nesses pacientes provavelmente contribuirão para um risco aumentado de melanoma, também há evidências que sugerem que a deficiência em *GATA2* pode diretamente agir na fisiopatologia, já que essa proteína inibe as

células do melanoma e sua baixa expressão pode estar associada a um fenótipo mais agressivo (NGUYEN et al., 2017).

Dentre os tumores sólidos relacionados a mutações em *GATA2*, destacam-se aqueles relacionados a infecções virais, como a displasia relacionada ao HPV, carcinoma de células escamosas, tumores de cabeça e pescoço relacionados ao HPV, tumores mesenquimais relacionados ao EBV, neoplasia de mama, adenocarcinoma de pâncreas, carcinoma de células renais e tumores desmoides (SPINNER et al., 2014). Ao fator de transcrição endotelial *GATA2* foi atribuído papel-chave na agressividade do câncer de próstata (RODRIGUEZ-BRAVO et al., 2017). Além de ter papel pioneiro na transcrição, aumenta a ligação e a atividade do receptor de androgênio (AR). Além disso, *GATA2* regula outros genes clinicamente significativos de maneira AR-independente em fases iniciais e finais da doença, como indicado na Figura 8 (RODRIGUEZ-BRAVO et al., 2017). Sabe-se que a maior parte do DNA está inacessível no núcleo celular devido à organização da cromatina, impossibilitando a ligação da maioria dos fatores de transcrição. Neste contexto, os fatores de transcrição pioneiros são importantes pois têm a habilidade especial de se ligarem a estas regiões de cromatina “fechada”. Eles ganham acesso passivo, ou ativamente abrem e reorganizam a cromatina, facilitando a subsequente ligação hierárquica de outros reguladores (fatores de transcrição, cofatores, proteínas modificadoras de cromatina e remodeladoras) e ativação da expressão gênica (RODRIGUEZ-BRAVO et al., 2017).

Figura 8 - Representação da função pioneira do fator de transcrição *GATA2*



(a) Representação esquemática dos seis fatores de transcrição endotelial membros da família *GATA*, contendo dois domínios de ligação de DNA *zinc finger*. (b) Representação da função pioneira do fator de transcrição *GATA2*. O fator de transcrição *GATA2* é o primeiro a se ligar à cromatina fechada e possibilita a ligação de outros fatores, ativando a transcrição gênica. Fonte: Figura adaptada de (RODRIGUEZ-BRAVO et al., 2017)

1.8 GATA2 e doenças hematológicas

De maneira geral, alterações relacionadas à leucemogênese podem afetar cinco classes de proteínas: componentes da via de sinalização ou de Classe I, como *JAK2*, *Rat sarcoma vírus (RAS)* e Tirosino-quinase 3 Fms-relacionado (*FLT3*); fatores de transcrição ou de Classe II, como *CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPA)*, *Translocation-Ets-leukemia virus (ETV6)* e *GATA2*; reguladores epigenéticos ou de Classe III, como *Additional sex comb-like-1 (ASXL1)*, *Mixed-lineage leukemia (MLL)*, também conhecida como *Histone-lysine N-methyltransferase 2A (KMT2A)* e *Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)*; supressores tumorais ou de Classe IV, como Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*), Proteína de tumor 53 (*TP53*) e Tumor de Wilms-1 (*WT1*); e componentes do spliceossomo relacionados à maturação do RNA ou de Classe V, como *Splicing factor 3B subunit 1 (SF3B1)* (MURATI et al., 2012).

Em um estudo com modelo murino, foi avaliado o papel da haploinsuficiência *GATA2* para predisposição para SMD e LMA (CHARLOTTE NIEMEYER, 2018). Foi usado ensaio de transplante de CTH competitivo e indução de mutagênese química com *N-etil-N-nitrosureia (ENU)*. Como conclusões, verificou-se que as CTH *GATA2* mutadas são menos competitivas e entram em exaustão mais facilmente com risco aumentado de insuficiência medular. Além disso, foi observado que a haploinsuficiência de *GATA2* acelera a leucemogênese induzida por agentes mutagênicos, sugerindo uma possível função supressora tumoral. Conclui-se, propondo que a haploinsuficiência de *GATA2* apresenta um duplo papel na leucemogênese e informando que o grupo está trabalhando na identificação de fatores que cooperam com a patogênese e que são relevantes para a função de *GATA2* (CHARLOTTE NIEMEYER, 2018).

A Tabela 1 apresenta a classificação dos subtipos de SMD, segundo a revisão de 2016 da Classificação da OMS para neoplasias mieloides. Devido à sua importância, essa revisão criou um subgrupo de neoplasias mieloides associadas a mutações germinativas, que inclui *GATA2*, representado na Tabela 2 (ARBER et al., 2016).

Em crianças e adultos jovens com SMD, a prevalência da síndrome de deficiência de *GATA2* ficou entre 7 e 15% (WLODARSKI et al., 2016). Dentre os casos de SMD com monossomia do cromossomo 7 ou deleção parcial do braço longo do cromossomo 7 (del7q), mutações em *GATA2* foram encontradas em até 72% dos pacientes (WLODARSKI; SAHOO; NIEMEYER, 2018).

Um estudo genético em pacientes com insuficiência medular idiopática empregou um painel com 85 genes associados a doenças hematológicas congênitas e identificou mutações germinativas heterozigóticas em *GATA2* em 5 dos 71 pacientes (7%) e foi a causa hereditária mais frequente (DICKINSON et al., 2014). A síndrome de deficiência de *GATA2* pode ocorrer em casos esporádicos, sem história familiar sugestiva. Isto pode ser resultado de não-penetrância completa ou ainda mutações germinativas *de novo* em *GATA2* (DONADIEU et al., 2018; HIRABAYASHI et al., 2017).

A morte prematura durante a infância pode acontecer em pacientes com mutações em *GATA2*, devido a infecções, disfunção pulmonar, neoplasias sólidas e, ainda, SMD/LMA (COLLIN et al., 2015; DICKINSON et al., 2014). Os portadores de defeitos nos alelos de *GATA2* podem apresentar perda progressiva de células mononucleares (células dendríticas, monócitos, linfócitos T e B e células NK), podendo evoluir para SMD, mais frequentemente após os 60 anos de idade (COLLIN et al., 2015). A evolução esquemática da deficiência de *GATA2* está ilustrada na Figura 9.

Tabela 1 - Classificação de síndromes mielodisplásicas segundo a revisão da OMS 2016

Nome	Citopenias*	Sideroblastos em anel como % dos elementos eritroides da MO	Blastos em MO e SP	Citogenética
Citopenia refratária com displasia unilinhagem	1 ou 2	<15%/ <5%**	<5% MO, <1% SP, sem bastonetes de Auer	Qualquer, exceto se preencher critério para del isolada (5q)
Citopenia refratária com displasia multilinhagem	1-3	<15%/ <5%**	<5% MO, <1% SP, sem bastonetes de Auer	Qualquer, exceto se preencher critério para del isolada (5q)
SMD com sideroblastos em anel	1-3	≥15%/ ≥5%**	<5% MO, <1% SP, sem bastonetes de Auer	Qualquer, exceto se preencher critério para del isolada (5q)
SMD com deleção isolada de (5q)	1-2	Qualquer	<5% MO, <1% em SP, sem bastonetes de Auer	Del (5q) sozinha ou com 1 anormalidade, exceto -7 ou del (7q)
Anemia refratária com excesso de blastos (RAEB)				
RAEB tipo 1	1-3	Qualquer	5-9% MO, 2-4% SP, sem bastonetes de Auer	Qualquer
RAEB tipo 2	1-3	Qualquer	10-19% MO, 5-19% SP, sem bastonetes de Auer	Qualquer
SMD sem classificação	1-3	Qualquer	<5% MO, ≤1% SP, sem bastonetes de Auer	Qualquer
SMD baseada na anormalidade citogenética	1-3	<15%***	<5% MO, ≤1% SP, sem bastonetes de Auer	Anormalidade definidora de SMD
Citopenia refratária da criança	1-3	Qualquer	<5% MO, <2% SP	Qualquer

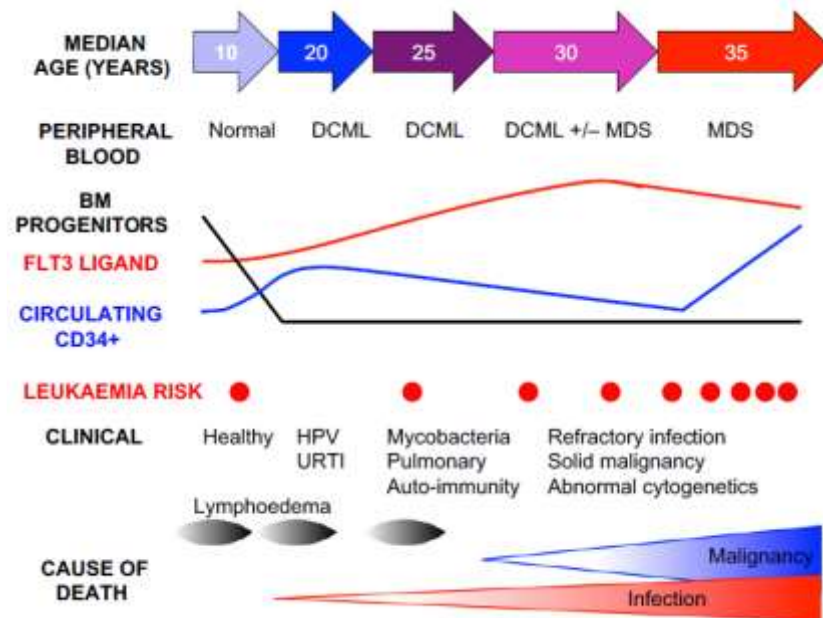
*Citopenias definidas por hemoglobina < 10 g/dl, plaquetas < 100.000 /mm³, neutrófilos < 1.800 céls/mm³**Se mutação em SF3B1 estiver presente. ***Caso >15% de sideroblastos em anel tem muita displasia eritroide e é classificado como SMD unilinhagem com sideroblastos em anel. OMS- Organização Mundial da Saúde; SMD – síndrome mielodisplásica; MO – Medula óssea; SP – sangue periférico; Del- deleção. Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de (ARBER et al., 2016)

Tabela 2. Classificação das neoplasias mieloides com predisposição germinativa segundo a revisão da OMS 2016

Neoplasia mieloide com predisposição germinativa sem doença ou disfunção orgânica preexistente
LMA com mutação CEBPA germinativa
Neoplasia mieloide com mutação DDX41 germinativa
Neoplasia mieloide com predisposição germinativa e desordem plaquetária preexistente
Neoplasia mieloide com mutação RUNX1 germinativa*
Neoplasia mieloide com mutação ANKRD26 germinativa*
Neoplasia mieloide com mutação ETV6 germinativa*
Neoplasia mieloide com predisposição germinativa e outra disfunção orgânica
Neoplasia mieloide com mutação GATA2 germinativa*
Neoplasia mieloide associada a síndrome de insuficiência medular
Neoplasia mieloide associada a doenças na biologia dos telômeros
LMMJ associada a neurofibromatose ou síndrome de Noonan
Doenças síndrome de Noonan-like
Neoplasia mieloide associada a síndrome de Down*

* Neoplasia linfóide também reportada. LMA- Leucemia mieloide aguda; LMMJ- Leucemia mielomonocítica juvenil. Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de (ARBER et al., 2016)

Figura 9 - Diagrama esquemático demonstrando a evolução da deficiência celular em *GATA2*



BM- Medula óssea; HPV- Papiloma vírus humano; URTI- Infecções bacterianas respiratórias altas; DCML – Deficiência de células dendríticas, monócitos e linfócitos; MDS- Síndrome mielodisplásica; Ligante FLT3- Ligante fms-relacionado tirosino-kinase 3. Fonte: Figura adaptada de (COLLIN; DICKINSON; BIGLEY, 2015)

Aos 60 anos de idade, cerca de 90% dos indivíduos com mutação germinativa em *GATA2* irá desenvolver citopenias refratárias com displasia multilineagem (CRDM), frequentemente associadas à aquisição de defeitos genéticos adicionais (COLLIN et al., 2015). Em indivíduos com mutações em *GATA2* que progridem para SMD/LMA, mutações secundárias adquiridas no gene codificante ASXL-1 são detectadas em aproximadamente 30% dos casos (WEST et al., 2014)

Uma série de características pode ajudar a diferenciar a SMD associada à mutação germinativa em *GATA2* da SMD *de novo*, ou esporádica. Dentre elas, estão a história familiar de SMD ou alterações hematológicas raras, idade jovem na apresentação inicial, com média entre 21 e 33 anos, infecções atípicas, monocitopenia grave, hipocelularidade, atipia megacariocítica, fibrose na MO e presença de hemofagocitose (CALVO et al., 2011; COLLIN et al., 2015). Em comparação à SMD *de novo*, os pacientes que apresentam SMD relacionada à mutação em *GATA2* exibem hemoglobina, neutrófilos e plaquetas em níveis relativamente preservados (CALVO et al., 2011).

A análise por citometria de fluxo auxilia a caracterização das doenças associadas às mutações de *GATA2*, mostrando uma diminuição acentuada ou ausência de macrófagos, presença de uma população de granulócitos hipogranulares (CALVO et al., 2011), linfopenia B e T CD4⁺, além de citopenia da subpopulação de células NK CD56⁺ *bright* (MACIEJEWSKI-DUVAL et al., 2016). As células NK CD56⁺ *bright* apresentam uma quimiotaxia diminuída no eixo CXCR12/CXCR4 dependente e a molécula CD200 parece estar envolvida na resposta imune inata através da diminuição da atividade citotóxica e da produção de interferon- α (LE DIEU et al., 2009). A linfopenia B profunda, incluindo progenitores em sangue periférico e medula óssea (MO), mostrou-se de forma mais constante do que as já conhecidas monocitopenia e linfopenia de células NK nos casos de deficiência em *GATA2*, quando comparada a outras formas de SMD ou anemia aplástica em crianças (NOVAKOVA et al., 2016). Casos de LMA e *GATA2* com mutação germinativa apresentam células T e NK não funcionais, com uma maior frequência de células NK imaturas (WANG et al., 2015). Em menor frequência, já foram relatados alguns casos de leucemia linfóide aguda (LLA) em indivíduos com deficiência de *GATA2* (DONADIEU et al., 2018; KOEGEL et al., 2016).

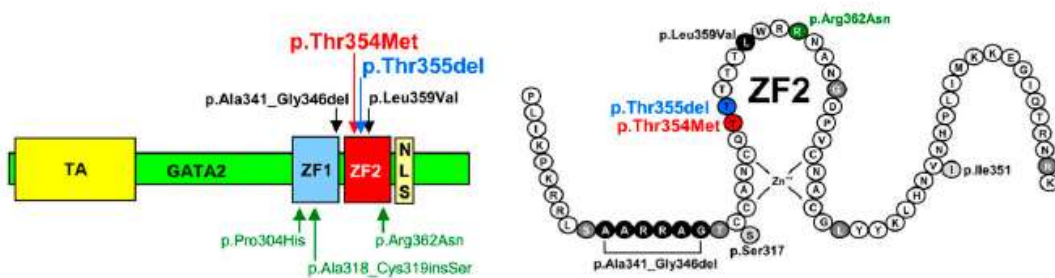
O gene *GATA2* também é um dos principais genes candidatos relacionados à síndrome hipereosinofílica idiopática, em que foram descartadas causas reacionais ou clonais habituais. Está envolvido por três mecanismos: regulação específica da linhagem eosinofílica,

prolongamento da sobrevivência dos eosinófilos e recrutamento tecidual de eosinófilos (LEE et al., 2017).

Um estudo em agregados familiares com história de predisposição a SMD/LMA em que foram descartadas mutações em *RUNX1* e *CEBPA*, identificou em 3 famílias a mutação T354M e em uma família a T355del, ambas no exon 5, ZF2 do gene *GATA2*. Em todas as 3 famílias em que foi identificada a T354M, houve pelo menos um portador assintomático (2 indivíduos na família 1, e um em cada das famílias 2 e 3) (HAHN et al., 2011). As treoninas pThr354 e p355 são as primeiras duas de cinco treoninas consecutivas numa região altamente conservada da proteína *GATA2* codificada pelo ZF2 do gene *GATA2*, conforme ilustrado na Figura 10, que está envolvido na ligação ao DNA, homodimerização e interação com o fator de transcrição PU.1 (HAHN et al., 2011).

A análise preditiva mostrou que ambas as mutações T354M e T355del têm alta probabilidade de afetar a função da proteína *GATA2*. O padrão de dominância negativa que a mutação T354M exerce em relação à *GATA2*-wild type está ilustrado na Figura 11, onde verificou-se a diminuição acentuada da ligação de *GATA2* ao elemento potencializador CD34. Mutações somáticas no ZF2 de *GATA2* já foram descritas em crise blástica de LMC (pLeu359Val, pAla341_Gly346del) e em ZF1 e ZF2 de LMA M5. Mutações somáticas no ZF2 do gene *GATA3* foram reportadas em câncer de mama (HAHN et al., 2011).

Figura 10 - Localização das mutações Thr354Met e Thr355del no segundo ZF do gene *GATA2*



ZF2- zinc-finger 2. Fonte: figura modificada de (HAHN et al., 2011)

Figura 11 – Dominância negativa que a mutação Thr354Met exerce em relação à *GATA2-wild type*

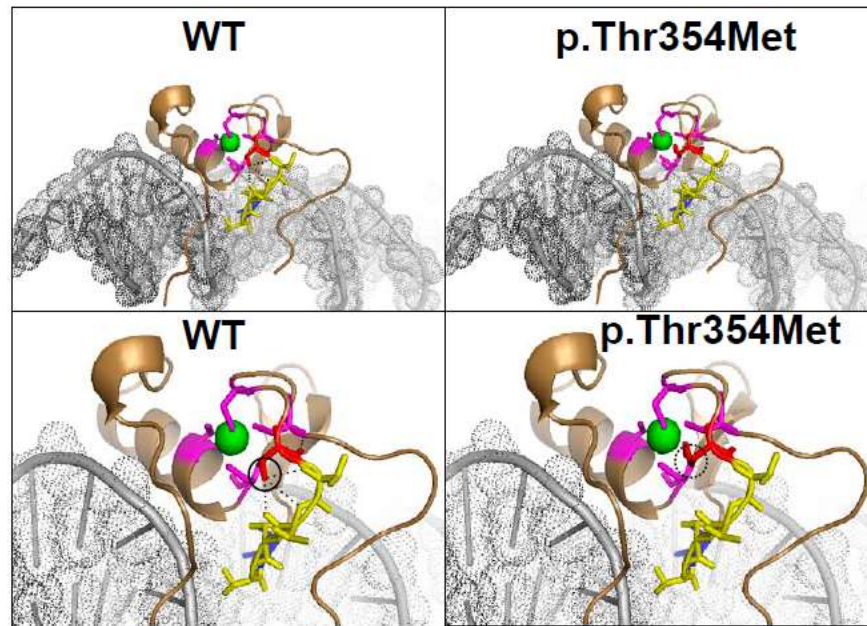


Ilustração da dominância negativa que a mutação T354M exerce em relação a *GATA2-wild type* (WT) no elemento potencializador CD34 (em amarelo) nos fibroblastos HEK293 cotransfectados. Fonte: figura adaptada de (HAHN et al., 2011)

Parecem existir diferenças no prognóstico em relação às LMAs em adultos de acordo com os locais de mutação em *GATA2*, já que os pacientes com mutação no ZF1 apresentam melhor sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) que os pacientes com mutações em ZF2 e mantêm essa diferença, considerando-se apenas pacientes com risco citogenético intermediário, Figura 12 (TIEN et al., 2018). Mutações em ZF1 e ZF2 de *GATA2* podem induzir LMA por diferentes mecanismos oncogênicos e, por isso, ter diferentes impactos nos desfechos clínicos (TIEN et al., 2018). Mutações em *GATA2* frequentemente co-ocorrem com mutações bi-alélicas em *CEBPA*, que codifica outro fator de transcrição envolvido na leucemogênese e ambas mostram interação direta proteína-proteína (TONG et al., 2005). A incidência da co-ocorrência *GATA2* ZF1 e *CEBPA*-bialélica (ou *CEBPA*^{double mut}) varia de 18-41% e confere melhor prognóstico (FASAN et al., 2013; GREEN et al., 2013; GREIF et al., 2012). Mutações em ZF1 do *GATA2* foram associadas a baixas incidências de mutações em *NPM1* e *FLT3-ITD* quando comparadas a *GATA2-wild type*, diferente de mutações no ZF2 que tem incidências similares de mutações nesses dois genes (TIEN et al., 2018). Mutações em ZF1 do *GATA2* também parecem afetar o desfecho de pacientes com LMA e mutação *CEBPA*^{double mut}, conferindo melhor SG e SLD, como pode ser constatado na Figura 13. Isto pode sugerir

uma necessidade de refinamento da classificação da OMS, especificamente na entidade LMA com mutação *CEBPA*^{double mut} (TIEN et al., 2018).

Figura 12 – Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com locais da mutação no gene *GATA2* em pacientes com LMA de risco intermediário

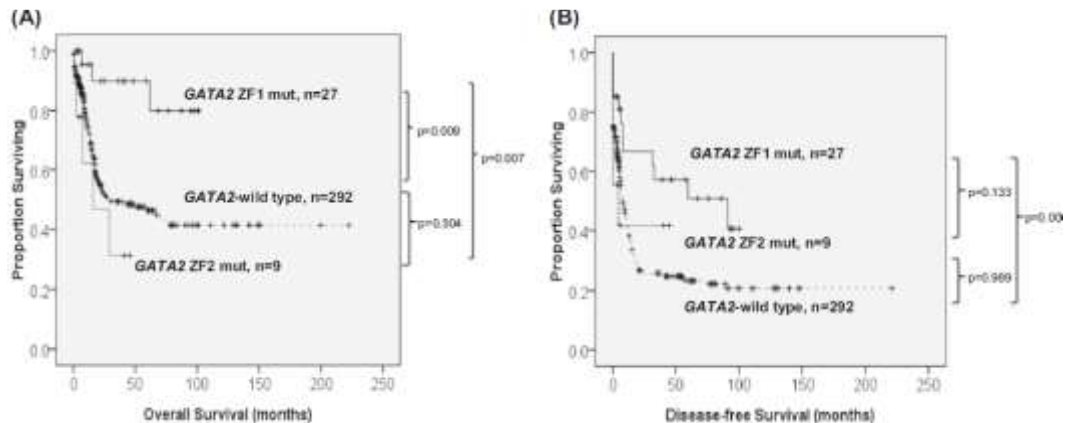


Gráfico (A) Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global (overall survival); e gráfico (B) e sobrevida livre de doença (*disease free survival*) ambas em meses estratificadas de acordo com os locais de mutação em *GATA2* em 328 pacientes com LMA e risco citogenético intermediário submetidos a quimioterapia padrão intensa. ZF1- *Zinc-finger 1*; ZF2- *Zinc-finger 2*; mut- Mutado. Fonte: Figura adaptada de (TIEN et al., 2018).

Figura 13 - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes com LMA estratificados em 3 grupos de acordo com *status* mutacional de *GATA2* e *CEBPA*

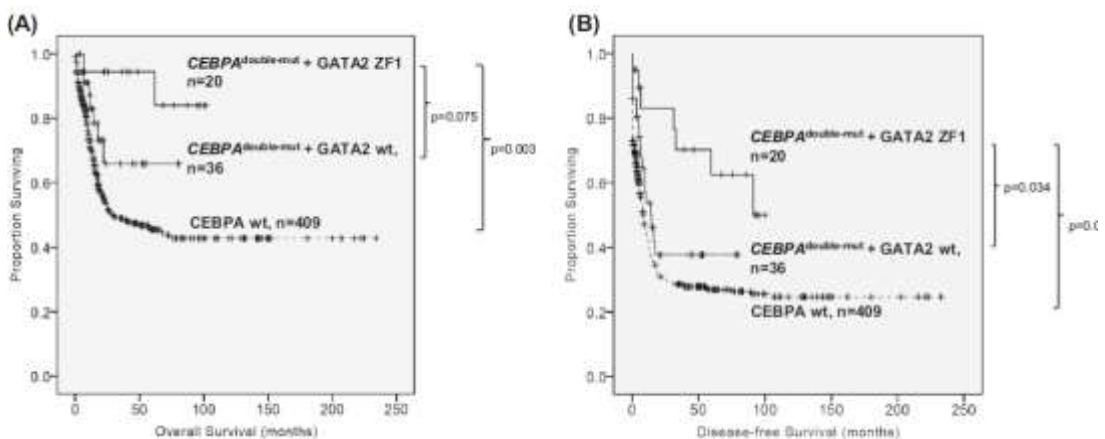


Gráfico (A) Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global (overall survival); e gráfico (B) e sobrevida livre de doença (*disease free survival*) ambas em meses de pacientes com LMA estratificados em 3 grupos: *CEBPA*^{bialélicas} ou *CEBPA*^{double mut} / ZF1 *GATA2*, *CEBPA*^{double mut} / *GATA2*^{wild type} e *CEBPA*^{wild type} submetidos a quimioterapia padrão intensa. Fonte: Figura adaptada de (TIEN et al., 2018).

1.9 Importância da detecção das mutações em *GATA2* e tratamento

A identificação precoce de indivíduos com deficiência de *GATA2* permite o rastreamento e manejo de manifestações clínicas associadas, com o apoio de uma equipe multidisciplinar, além da realização do TCTH em fase menos avançada da doença (MIR et al., 2015). Como profilaxia, considera-se a vacinação para HPV e uso de azitromicina (*THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM*, 2016). A alta incidência de SMD/LMA entre os indivíduos com mutação constitutiva em *GATA2* exige o monitoramento para sinais e sintomas das doenças associadas à mutação. Irmãos com antígenos leucocitários humanos compatíveis devem ser triados para a mutação familiar e, caso sejam portadores da mutação, devem ser evitados como doadores de MO (MIR et al., 2015). Indicações para rastreamento de mutações em *GATA2* encontram-se na Tabela 3. De maneira geral, pacientes devem ser encaminhados para aconselhamento genético por apresentarem MDS ou insuficiência medular antes de 50 anos de idade, história familiar ou pessoal forte para malignidade, se tiver sido identificada mutação germinativa nos genes *CEBPA*, *GATA2* ou *RUNX1* e a fonte de DNA germinativo mais apropriada para análise de malignidades hematológicas é a cultura de fibroblastos (DINARDO et al., 2016).

Tabela 3 - Indicações sugeridas para rastreamento de mutações em *GATA2*

Neutropenia pediátrica
Monocitopenia
Citopenia de células B ou NK
Deficiência de células dendríticas
Síndrome mielodisplásica hipocelular
SMD ou LMA familiar
Proteinose alveolar pulmonar sem anticorpos anti-GM-CSF
Verrugas por HPV extragenitais recorrentes ou grave HPV genital refratário
Infecção viral grave (HSV, EBV)
Linfedema de início na infância ou adolescência
Surdez neurossensorial com imunodeficiência
Infecção por MNT disseminada
Infecção fúngica disseminada ou invasiva
MNT pulmonar sem bronquiectasias

MDS – Síndrome mielodisplásica; AML – Leucemia mieloide aguda; HSV – Herpes simplex vírus; EBV – Epstein-Barr vírus; HPV – Papilomavirus humano; GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos. Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de (MIR et al., 2015).

O TCTH para tratamento das malignidades hematológicas, infecções graves recorrentes e proteinose alveolar vem sendo realizado com sucesso em indivíduos com a mutação em *GATA2*, com estudos clínicos em andamento (CALVO et al., 2011; LÜBKING et al., 2015). O prognóstico dos pacientes com haploinsuficiência do gene *GATA2* após o desenvolvimento de SMD/ LMA parece pobre, com os melhores resultados reportados em indivíduos submetidos a TCTH em fases mais precoces da doença, com sobrevida de 57% em 36 meses (DONADIEU et al., 2018; SPINNER et al., 2014). TCTH alogênico vem se mostrando curativo em alguns casos, usando regimes de condicionamento não-mieloablativos (CUELLAR-RODRIGUEZ et al., 2011), porém melhores resultados têm sido observados em regimes mieloablativos (GROSSMAN et al., 2014).

2 JUSTIFICATIVA

As mutações em *GATA2* podem levar a um estado de imunossupressão celular e humoral, que acarreta não só infecções graves e recorrentes como também o desenvolvimento de SMD e LMA, que são neoplasias com alta taxa de mortalidade e morbidade. O acometimento de crianças, famílias e indivíduos jovens em fase produtiva, a necessidade da atenção e cuidados multidisciplinares e o tratamento curativo com TCTH, são fatores que oneram o sistema de saúde e órgãos públicos de seguro e assistência social. Apesar das pesquisas mundiais, a prevalência da mutação ainda é pouco estudada. Isto se deve à descoberta relativamente recente desta PID, desconhecimento na classe médica e também a dificuldade de acesso ao diagnóstico molecular. Seu diagnóstico interfere na história natural da doença, já que o TCTH pode ser indicado na fase mais precoce, conferindo menor mortalidade e com doador mais adequado.

Para o cumprimento desse estudo, formou-se uma parceria entre a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e o Instituto Nacional do Câncer José Alencar (Inca), para fornecimento de uma valiosa contribuição no diagnóstico dessa causa de imunodeficiência primária nos pacientes com doenças infecciosas. O Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) é referência no atendimento das infecções por MNT e micoses sistêmicas no estado do Rio de Janeiro e muitas vezes não é identificada uma causa para imunossupressão dos pacientes, o que levou a suspeita da presença de imunodeficiência primária nestes pacientes. O laboratório do Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica (PHOP) do Inca é referência nacional no diagnóstico imunomolecular de leucemias agudas, com vasta experiência na metodologia proposta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar as alterações do gene *GATA2* nos indivíduos com infecções por MNT ou fúngicas disseminadas em pacientes sem imunossupressão conhecida.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência de alterações em *GATA2* em indivíduos com infecções por MNT e fúngicas disseminadas em pacientes sem imunossupressão conhecida.
- Avaliar a presença da mutação patogênica em *GATA2* em familiares de primeiro e segundo grau de indivíduos com mutações já identificadas.
- Identificar os genótipos das mutações em *GATA2*
- Estabelecer a correlação entre o genótipo de *GATA2* e as características clínico-fenotípicas dos casos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo de coorte de indivíduos com infecções oportunistas sem imunossupressão conhecida. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INI, Fiocruz, via Plataforma Brasil CAAE 64574417.0.0000.5262, tendo sua versão 5 aprovada, ANEXO A.

4.2 Casuística

4.2.1 População do estudo

- Pacientes com mais de 12 anos de idade, com infecções por MNT e fúngicas disseminadas, diagnosticadas a partir de 2010 e em acompanhamento no INI, Fiocruz.
- Familiares saudáveis de primeiro e segundo graus (irmãos, pais, sobrinhos e filhos), com idade superior a 12 anos, dos pacientes que apresentarem mutações no gene *GATA2*.

4.2.2 Critérios de inclusão

- Diagnóstico clínico e microbiológico de infecção por MNT ou infecção fúngica disseminada. Foram incluídos casos de forma pulmonar e disseminada de histoplasmose, forma juvenil de paracoccidiodomicose, esporotricose de acometimento linfocutâneo e ósseo, candidemia e aspergilose pulmonar, diagnosticados a partir de 2010 no INI.
- Familiar de primeiro ou segundo graus de pacientes com mutação comprovada no gene *GATA2*.

4.2.3 Critérios de exclusão

- Diagnóstico prévio de síndromes de imunodeficiência primária ou secundária, como HIV, doenças autoimunes, transplante de órgão sólido, fibrose cística ou tratamento imunossupressor ou quimioterápicos.

4.2.4 Cálculo amostral

- Não há dados de prevalência de mutações em *GATA2* nos pacientes com as doenças infecciosas citadas, portanto o cálculo amostral não foi realizado. Foi estimada a análise de cerca de 20 amostras de sangue de pacientes em amostra de conveniência.

4.2.5 Análises estatísticas e demografia

- Dados demográficos, características clínicas e patológicas, história familiar e pessoal foram obtidos nos prontuários e analisados utilizando ferramentas do programa estatístico SPSS®. As características dos pacientes foram analisadas de maneira descritiva ou não-inferencial usando mediana para as variáveis contínuas e distribuição de frequência percentual para as variáveis categóricas.

4.3 Aspectos éticos

- O projeto contou com dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs), sendo um para os pacientes em acompanhamento de doenças infecciosas no INI ou responsáveis por pacientes menores de 18 anos e outro para seus familiares saudáveis (APÊNDICES A e B), além do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) para inclusão de eventuais familiares de pacientes menores de idade, o que, no entanto, não aconteceu (APÊNDICE C).

4.4 Materiais, procedimentos e técnicas

4.4.1 Procedimento para coleta de amostras biológicas

Quatro mililitros de sangue periférico foram coletados em 1 tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Como possíveis complicações, poderiam acontecer sangramento no local da punção venosa, infecção, dor ou hematoma, porém não ocorreram em nenhum paciente.

4.4.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico através do kit comercial QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do material genético é realizada por espectrofotômetro (NanoDrop1000, DE, USA), avaliando-se a relação da absorbância 260/280nm, através do programa ND-1000 que acompanha o aparelho.

4.4.3 Reação de PCR para amplificação do gene *GATA2*

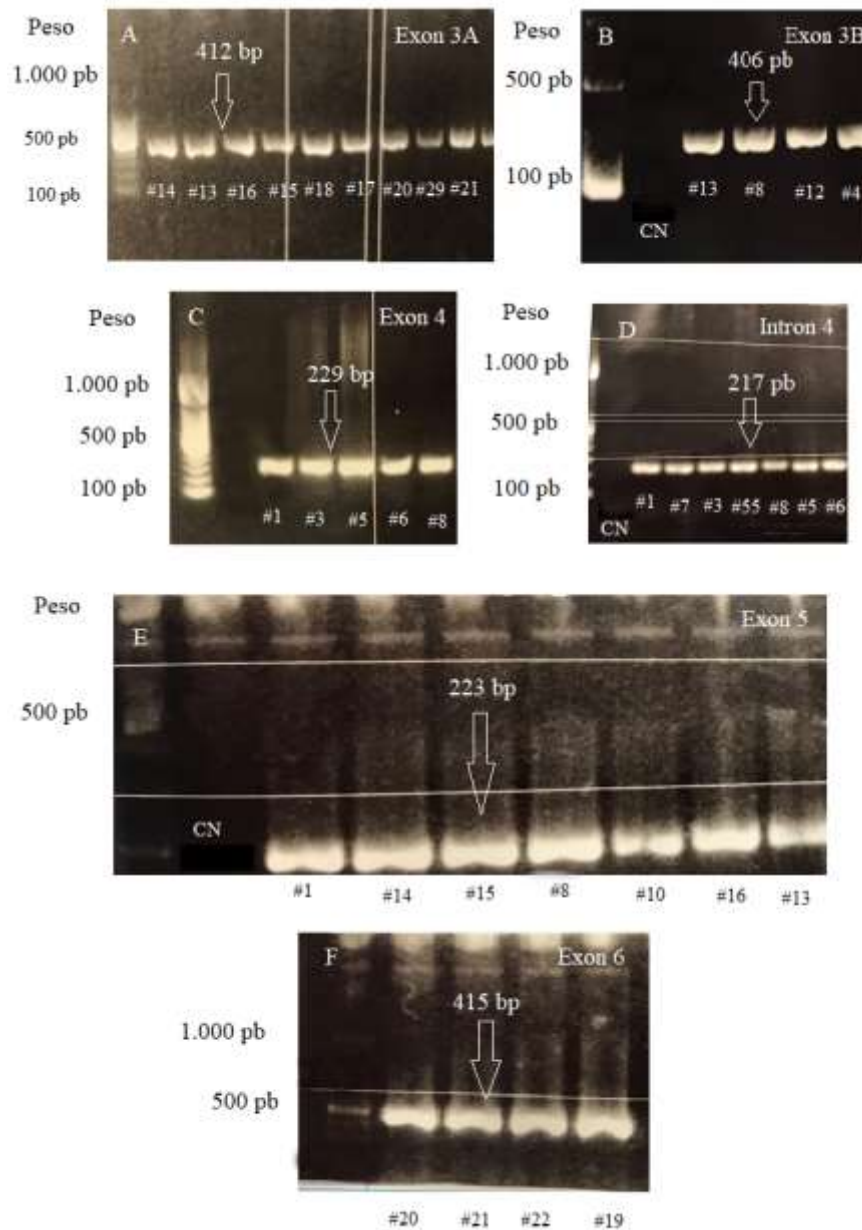
Seis exons codificantes (3A, 3B, 4, 5 e 6) e o íntron 4 do gene *GATA2* foram amplificados nos pacientes pela reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando os reagentes nas concentrações: tampão 1x, cloreto de magnésio 1,5mM, desoxirribonucleotídeos trifosfatados 0,2mM, Platinum *Taq* DNA Polimerase High Fidelity 5 U/ μ l (Invitrogen, CA, USA) e *primers* a 0,4 μ M. *Primers* e condições de PCR do gene *GATA2* são descritos na Tabela 4 (WANG et al., 2015). No caso dos familiares, apenas a região onde foi identificada a mutação do probando foi amplificada por PCR e sequenciada. A Figura 14 ilustra os géis de agarose de PCR.

Tabela 4 - Primers e condições de PCR do gene *GATA2*

Tamanho do produto de PCR (pb)	Primers	Sequência de oligonucleotídeos <i>Forward e Reverse 5`-3`</i>	Condições de PCR
Exon 3A 412 pb	<i>GATA2</i> ex3A F	GTCCCTAGCTCTGCCTACCC	94°C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento a 60°C por 30 s, e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 3 min
	<i>GATA2</i> ex3A R	CTCCTCGGGCTGCACTAC	
Exon 3B 406 pb	<i>GATA2</i> ex3B F	ACCTTTTCGGCTTCCCAC	94°C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento a 60°C por 30 s, e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 3 min
	<i>GATA2</i> ex3B R	CTCTCCCAAGTCACAGCTCC	
Exon 4 229 pb	<i>GATA2</i> ex4 F	GACTCCCTCCCGAGAACTTG	94°C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento a 58°C por 30 s, e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 3 min
	<i>GATA2</i> ex4 R	TGTAATTAACCGCCAGCTCC	
Intron 4 217 pb	<i>GATA2</i> in4 F	ATGGAGTCACCTATACTGTGTATTT	94°C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento a 58°C por 30 s, e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 3 min
	<i>GATA2</i> in4 R	TTTGCAGAGTGGAGGGTATTAG	
<i>GATA2</i> exon 5 223 pb	<i>GATA2</i> ex5 F	GTGGAGCGAGGGTCAGG	94°C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento a 60°C por 30 s, e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 3 min
	<i>GATA2</i> ex5 R	CACAAAGCGCAGAGGTCC	
<i>GATA2</i> exon 6 415 pb	<i>GATA2</i> ex6 F	AGGAATGTTGCTGGAGGAAG	94°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30 s, e 72°C por 45 s; e extensão final a 72°C por 3 min
	<i>GATA2</i> ex6 R	GCTGGCAGGAGTGGTGTC	

PCR- Reação da polimerase em cadeia. pb – Pares de bases. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 14 - Reações da Polimerase em Cadeia do gene *GATA2*.



Peso 100 pb. (A) Exon 3A; (B) Exon 3B; (C) Exon 4; (D) Intron 4; (E) Exon 5 e (F) Exon 6. CN – Controle negativo. Fonte: elaborado pela autora.

4.4.4 Reação de sequenciamento direto do gene *GATA2*

A purificação dos produtos de PCR amplificados foi realizada através do kit comercial GFX™ PCR DNA e *Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, NE, UK). A quantificação desses produtos foi estimada em gel de agarose utilizando o reagente *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), conforme instruções do fabricante.

As placas de sequenciamento foram preparadas utilizando como referência as concentrações e reagentes recomendados para montagem da reação de sequenciamento com o BigDye® *Terminator Cycle Sequencing Kit* v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA). As placas foram submetidas às reações utilizando a ciclagem básica no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), com os perfis térmicos: etapa inicial de desnaturação a 96°C por 1 min, 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 s, temperatura e tempo de hibridização de 50°C por 15 s, e extensão a 60°C por 4 min. As amostras foram precipitadas na placa de sequenciamento seguindo o protocolo utilizado na Plataforma de Sequenciamento do IOC ou do PHOP pelo método de precipitação com etanol/isopropanol.

Após estas etapas, as amostras foram direcionadas para o processamento no sequenciador automático ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). A análise das sequências geradas pelo aparelho foi realizada no programa Mutation Surveyer® (Softgenetics, PA, USA).

4.4.5 Demais exames

De todos os pacientes, foi coletado hemograma, a partir do qual foi obtido a contagem de monócitos. De 17 pacientes foi obtida a contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, realizada por citometria de fluxo da Plataforma de Laboratório Multiusuário do INI.

Nos pacientes em que foi identificada a necessidade de investigação hematológica, foram realizados mielograma, imunofenotipagem leucocitária, análise citogenética e histopatológica de medula óssea. Estes exames foram realizados para investigação clínica de rotina, conforme indicação clínica, não fazendo parte originalmente do estudo. Mielograma e histopatológico de medula foram realizados no INI. Os exames de imunofenotipagem leucocitária e citogenética foram realizados nos laboratórios Diagnóstico das Américas (Dasa) e laboratório do Centro de Transplante de Medula Óssea (Cemo-Inca), respectivamente.

4.4.6 Dados sociodemográficos, epidemiológicos e clínicos

Categorizamos as variáveis que foram analisadas como segue abaixo:

- Aspectos sócio-demográficos e epidemiológicos: idade, sexo, raça, município de moradia;
- Aspectos clínicos das doenças infecciosas: órgãos acometidos, como pele, pulmão, linfonodos, cérebro. Apesar de infecções virais não terem sido consideradas no critério de inclusão, pois o INI não é referência para tratamento, foram consideradas como outras infecções em pacientes com MNT ou IFI.
- Outros aspectos clínicos: presença de linfedema, verrugas de extremidades, déficit auditivo, manifestações reumatológicas, presença de neoplasias sólidas, história familiar de linfedema, infecções, SMD, LMA ou neoplasias sólidas, história de eosinofilia;
- Aspectos laboratoriais: dados hematimétricos, como dosagem de hemoglobina, leucócitos, monócitos, plaquetas, contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺;
- Aspectos hematológicos: achados no mielograma, imunofenotipagem e histopatológico de medula óssea, cariótipo em banda G;
- Aspectos terapêuticos: realização de TCTH;
- Desfecho: óbito;
- Análise das mutações: caracterização genotípica por sequenciamento direto;
- Análise familiar: frequência da mutação nos familiares de primeiro e segundo graus (irmãos, pais, sobrinhos e filhos).

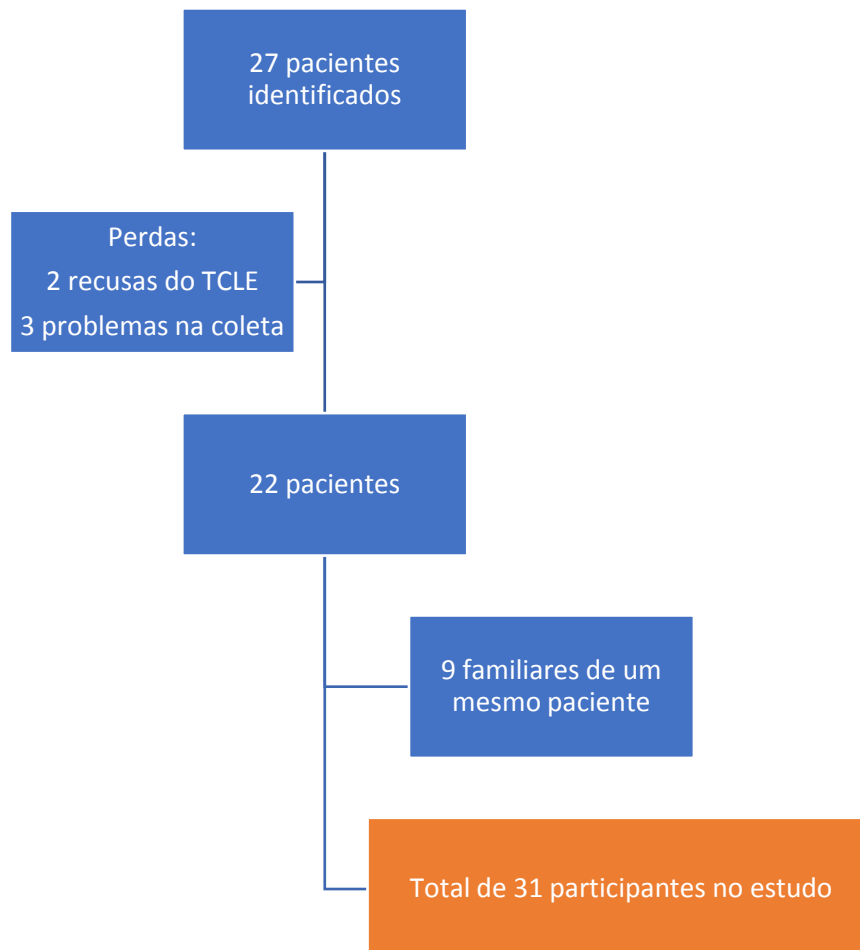
4.4.7 Análise do sequenciamento genético

As variantes encontradas no gene *GATA2* foram comparadas com os bancos de dados de referência disponíveis online nos sites <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar> e www.ensembl.org, a fim de avaliar frequência populacional e associação clínica.

5 RESULTADOS

Trinta e uma (31) amostras de 22 pacientes e 9 familiares foram sequenciadas para identificação de mutações em *GATA2*. Vinte e sete possíveis pacientes preencheram critério de inclusão no estudo, porém ocorreram 5 perdas (2 por recusa a participar do estudo pois não assinaram o TCLE e 3 por problemas na coleta do sangue). O fluxograma de recrutamento de pacientes está ilustrado na Figura 15. O recrutamento ocorreu no período entre 05 de maio de 2015 e 11 de setembro de 2018

Figura 15 - Fluxograma de recrutamento de pacientes no INI



5.1 Perfil demográfico e clínico dos pacientes

Dentre os 22 pacientes, o predomínio foi do sexo masculino com 14 indivíduos (63,6%), enquanto 8 eram do sexo feminino (36,4%). A mediana de idade foi de 45,5 anos (variação de 19-75 anos), a cor de pele autorreferida mais frequentemente observada foi a branca em 13 (59,1%), seguida da parda em 6 (27,3%) e negra em 3 (13,6%) indivíduos. Os dados epidemiológicos dos pacientes estão resumidos nos gráficos na Figura 16.

Figura 16 – Gráficos com distribuição de sexo e cor de pele autorreferida dos pacientes

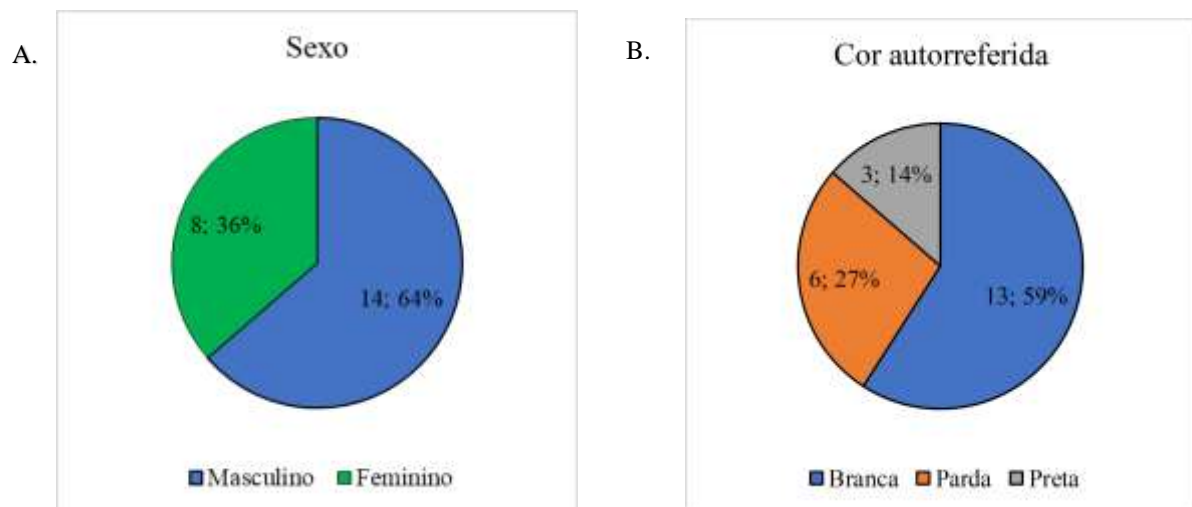


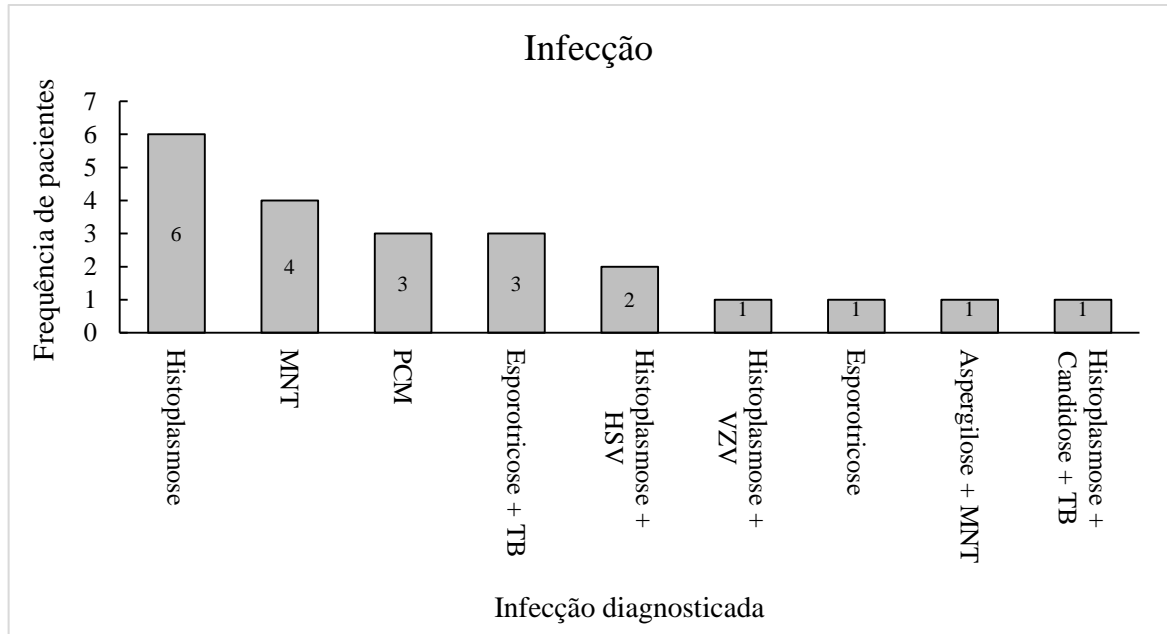
Gráfico (A) Distribuição de sexo dos pacientes (n=22), 14 masculino (64%) e 8 feminino (36%) e (B) Distribuição autorreferida de cor de pele autorreferida dos pacientes, branca 13 (59%), parda 6 (27%) e negra 3 (14%). Fonte: Elaborado pela autora.

Os municípios de residência mais frequentes dos pacientes foram Rio de Janeiro 15 (68,2%), Niterói 3 (13,6%) e Duque de Caxias, São Gonçalo, Sumidouro e Nilópolis 1 cada (4,5% cada). História familiar de neoplasia em parentes de primeiro grau com menos de 50 anos (pais ou irmãos) foi observada em 6 pacientes (27,3%). História de eosinofilia, definida por contagem de eosinófilos acima de 1.500 céls/mm^3 por pelo menos 3 meses foi observada em 2 pacientes (9,1%). Seis (6) pacientes apresentaram alguma manifestação reumatológica (27,3%).

A Figura 17 mostra um gráfico com a distribuição de frequência das infecções observadas entre os 22 pacientes. Dezesete (17) foram diagnosticados com IFI (77,3%), 4 com MNT pulmonar (18,2%) e 1 com ambas (4,5%). Do total, 14 pacientes apresentaram apenas uma infecção, sendo 4 pacientes com MNT (28,6%), 6 com histoplasmose (42,9%), 3 com paracoccidiodomicose (21,4%) e 1 paciente com esporotricose (7,1%). Dentre os 7 pacientes que apresentaram duas infecções, foram identificados 3 com tuberculose e esporotricose

(42,9%), 2 com HSV e histoplasmosse (28,6%), 1 com VZV e histoplasmosse (14,3%) e 1 com aspergilose e MNT (14,3%). Do total, 1 paciente apresentou 3 infecções: histoplasmosse, candidose e tuberculose (4,5%) (Figura 17 e Tabela 5).

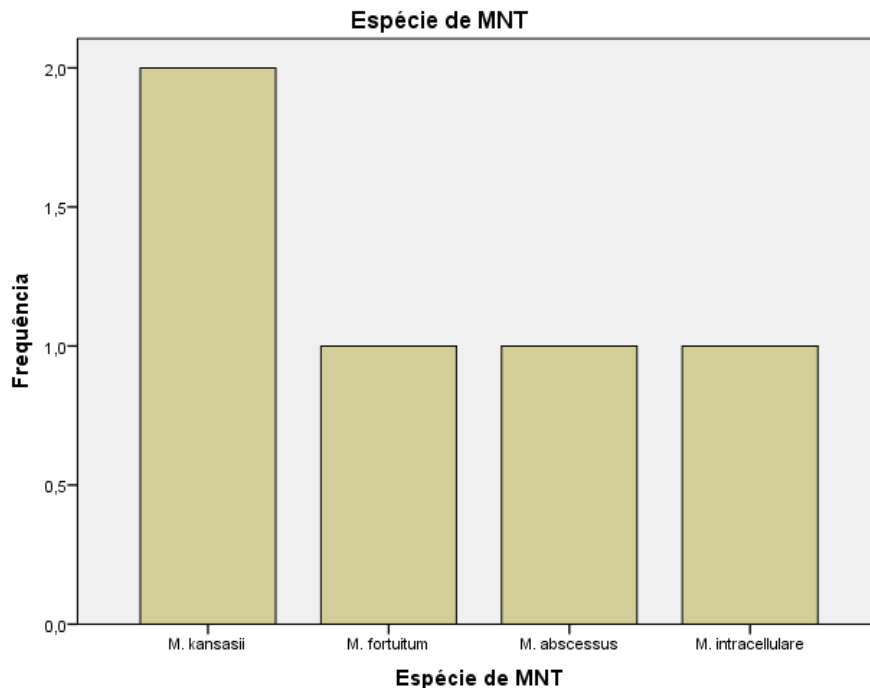
Figura 17 - Gráfico com a distribuição de frequência das infecções dos 22 pacientes



MNT - Micobactéria não tuberculose; PCM - Paracoccidioidomicose; TB - Tuberculose; VZV- Varicela zoster vírus; HSV - Herpes simplex vírus. Fonte: Elaborado pela autora.

Dentre os 5 pacientes com MNT, foram observadas 2 infecções por *M. kansasii* (40%), 1 por *M. intracellulare* (20%), 1 por *M. fortuitum* (20%) e 1 por *M. abscessus* (20%), conforme demonstrado na Figura 18.

Figura 18 - Gráfico com a distribuição de frequência das espécies de micobactérias não tuberculose apresentadas nos 4 pacientes.



MNT- micobactéria não tuberculose. Fonte: Elaborado pela autora.

O número de total de pacientes que apresentaram alguma neoplasia além do quadro infeccioso foi 6 (27,3%). Três apresentaram SMD (13,6%), sendo #1 SMD com transformação para LMA, #2 SMD com transformação para anemia refratária com excesso de blastos tipo 2 (RAEB2) e #13 com CRDM; 2 melanoma (9,1%), sendo #4 em intestino com metástases para fígado e pulmões e #13 em região palmar; 1 Linfoma não-Hodgkin difuso de células B em pele, #5 (4,5%); e 1 neoplasia de ovário, #8 (4,5%). Excetuando-se a paciente com câncer de ovário, que foi tratada apenas cirurgicamente, todos os demais indivíduos desenvolveram as neoplasias após apresentarem as infecções e entrarem no estudo. Nenhum dos pacientes apresentava surdez, verrugas, linfedema ou proteinose alveolar (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes

Pacientes	Idade/ Sexo	Cor Autorreferida	Município de residência	Infecção	Localização da infecção	Neoplasia	Manifestação reumatológica	História de eosinofilia	HF de neoplasia
1.	75/M	Branca	Rio de Janeiro	MNT (<i>M. kansasii</i>)	Sangue, linfonodos, pulmão	SMD/ LMA	Não	Sim	Não
2.	50/M	Branca	Rio de Janeiro	MNT (<i>M. kansasii</i>)	Líquido sinovial, sangue, pulmão	SMD	Artrite, vasculite, eritema nodoso	Sim	Não
3.	19/M	Branca	Nilópolis	PCM juvenil	Sangue, linfonodos	-	Não	Não	Não
4.	55/F	Parda	Rio de Janeiro	MNT (<i>M. fortuitum</i>)	Pulmão	Melanoma intestino	Não	Não	Não
5.	57/M	Branca	Niterói	Histoplasmose	Pele e suprarenal	LNH pele	Não	Não	Sim
6.	52/F	Negra	Rio de Janeiro	Esporotricose + TB	Pele	-	Eritema nodoso	Não	Sim
7.	37/M	Parda	Rio de Janeiro	Histoplasmose + HSV	Pulmão e pele	-	Não	Não	Não
8.	42/F	Negra	Rio de Janeiro	Histoplasmose	Medula, linfonodos e pulmão	Ovário	Não	Não	Não
9.	25/M	Parda	Rio de Janeiro	PCM juvenil	Linfonodos	-	Não	Não	Sim
10.	40/F	Branca	Rio de Janeiro	MNT (<i>M. intracellulare</i>)	Pulmão	-	Não	Não	Não
11.	74/F	Parda	Rio de Janeiro	Esporotricose + TB	Pele	-	Não	Não	Sim
12.	58/M	Branca	Rio de Janeiro	Histoplasmose + Candidose + TB	Pulmão, pele e laringe	-	Artralgia	Não	Sim
13.	49/M	Parda	São Gonçalo	Esporotricose	Pele e ossos	SMD e Melanoma mão	Não	Não	Não
14.	36/F	Negra	Rio de Janeiro	Esporotricose + TB	Pele, ossos e pulmão	-	Artralgia	Não	Não
15.	55/M	Branca	Niterói	Histoplasmose + HSV	Pulmão e pele	-	Não	Não	Não
16.	58/M	Branca	Rio de Janeiro	Histoplasmose	Pulmão	-	Não	Não	Não
17.	59/M	Branca	Niterói	Aspergilose + MNT (<i>M. abscessus</i>)	Pulmão e pleura	-	Artralgia	Não	Não
18.	24/M	Branca	Rio de Janeiro	Histoplasmose	Pulmão	-	Não	Não	Não
19.	29/M	Parda	Sumidouro	PCM juvenil	Pulmão e linfonodos	-	Não	Não	Não
20.	30/F	Branca	Rio de Janeiro	Histoplasmose + VZV	Pulmão e pele	-	Artralgia	Não	Não
21.	30/M	Branca	Rio de Janeiro	Histoplasmose	Pulmão	-	Não	Não	Não
22.	39/F	Branca	Duque de Caxias	Histoplasmose	Cérebro	-	Não	Não	Não

M- Masculino; F- Feminino; HF – História familiar; PCM - Paracoccidiodomicose; HSV- Herpes simplex vírus; VZV- Varicela-zoster vírus; TB- Tuberculose; MNT- Micobactéria não tuberculose; SMD- Síndrome mielodisplásica; LMA- Leucemia mieloide aguda; LNH- Linfoma não Hodgkin. Fonte: Elaborado pela autora.

A mediana do valor da hemoglobina na entrada no estudo foi 11,7 g/dl (variação 5,5-15,3), com valores de referência para homens entre 13,0 e 18,0 e mulheres entre 11,0 e 16,0 g/dl. A mediana da contagem de leucócitos foi 7.055 céls/mm³ (variação de 1.650-23.500 céls/mm³), referência para homens de 4.200 a 9.000 e mulheres de 4.000 a 10.000 céls/mm³. A contagem de neutrófilos teve mediana 4.440 céls/mm³ (variação de 1.100 a 21.385 céls/mm³), sendo a referência acima de 1.500 céls/mm³. A contagem de linfócitos teve mediana 1.670 céls/mm³ (variação de 445 a 3.513 céls/mm³), sendo a referência acima de 924 céls/mm³ para homens e acima de 760 céls/mm³ para mulheres. A contagem de monócitos teve mediana 425 céls/mm³ (variação de 33-1.140 céls/mm³), sendo a referência acima de 210 para homens e acima de 200 céls/mm³ para mulheres. A mediana da contagem de plaquetas foi 252.000 /mm³ (variação de 43.000- 512.000 /mm³), referência de 150.000 a 450.000 /mm³ (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados laboratoriais dos pacientes

Pacientes	Hb g/dl	Leucócitos céls/mm ³	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	CD4 ⁺	Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Plaquetas /mm ³
1.	10,4	1.650	1.171	445	33	96	0,53	43.000
2.	7,7	3.000	-	-	60	369	0,64	95.000
3.	8,4	23.500	21.385	1.410	366	-	-	121.000
4.	7,9	13.530	12.176	811	541	-	-	508.000
5.	15,0	5.930	4.150	889	296	19	0,57	201.000
6.	11,9	3.640	1.100	2.210	260	1.050	1,59	254.000
7.	5,5	5.560	3.280	1.670	360	982	2,15	218.000
8.	11,5	6.350	3.174	2.032	635	604	1,41	320.000
9.	8,8	10.550	9.178	1.055	316	-	-	512.000
10.	13,4	10.200	8.180	1.330	470	-	-	327.000
11.	9,8	4.190	2.429	1.089	209	1.014	4,42	141.000
12.	13,0	10.000	6.960	1.720	1.140	1.424	3,31	287.000
13.	10,4	6.000	3.780	1.740	420	810	1,03	94.000
14.	11,9	7.280	4.513	2.038	509	1.126	1,93	296.000
15.	14,7	9.150	6.679	1.738	640	683	1,26	250.000
16.	15,1	6.150	4.489	1.107	430	434	1,06	178.000
17.	13,0	9.070	6.711	1.269	907	941	3,16	399.000
18.	15,3	6.830	4.370	1.884	546	857	1,11	297.000
19.	10,2	6.500	4.225	1.495	585	-	-	430.000
20.	14,3	7.940	4.763	1.905	635	855	0,96	305.000
21.	15,0	7.350	4.440	2.012	416	892	1,84	215.000
22.	10,2	9.100	3.749	3.513	121	524	3,5	81.000

Hb – Hemoglobina. Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação à contagem de linfócitos T CD4⁺ e relação CD4⁺/CD8⁺, tivemos 15 resultados válidos e 7 ausentes por dificuldades na realização do teste. A mediana foi 857 céls/mm³ (variação de 19-1.424 céls/mm³), sendo a referência de 410 a 1.590 céls/mm³. Já a mediana da relação CD4⁺/CD8⁺ foi de 1,59 (variação de 0,53-4,42), sendo a referência acima de 1,0 (Tabela 6).

Nos pacientes em que foi identificada citopenia persistente ou suspeita de doença hematológica, foram realizados mielograma, imunofenotipagem leucocitária, análise citogenética e histopatológica de medula óssea. Dos 22 pacientes, 4 foram submetidos a todos estes exames (pacientes #1, #2, #5 e #13) e uma (#8) foi submetida somente a mielograma e histopatológico devido à suspeita de doença infecciosa. A paciente #4 não teve investigação de medula óssea, pois sua cinética de ferro era compatível com anemia ferropriva, provavelmente relacionada ao melanoma intestinal, não havendo, portanto, suspeita de doença hematológica primária. O paciente #1 foi submetido a exames de medula quando ainda estava na fase de SMD, posteriormente progrediu para LMA. Ao mielograma, a medula óssea encontrava-se hiper celular em 1 paciente ($n=5$, 20%), normocelular em 3 pacientes ($n=5$, 60%), e hipocelular em 1 paciente ($n=5$, 20%); sinais displásicos em dois pacientes ($n=5$, 40%), excesso de blastos, caracterizado por mais de 10% de células nucleadas em 1 ($n=5$, 20%) e presença de hemofagocitose em 1 paciente ($n=5$, 20%). A imunofenotipagem leucocitária indicou inversão de linfócitos CD4⁺/CD8⁺ em 2 pacientes ($n=4$, 50%), sinais displásicos em 1 paciente ($n=4$, 25%), fenótipo anômalo em 1 paciente ($n=4$, 25%) e ausência de fenótipo anômalo em 2 pacientes ($n=4$, 50%). O histopatológico evidenciou a presença de medula óssea hiper celular em 3 pacientes ($n=5$, 60%), hipocelular em 1 paciente ($n=5$, 20%) e sinais de hemofagocitose em 1 paciente ($n=5$, 20%). Foi observada ausência de fibrose em 1 paciente ($n=5$, 20%) extensa fibrose reticulínica em 1 paciente ($n=5$, 20%). Em 3 pacientes, foram observados megacariócitos pequenos e hipolobulados ($n=5$, 60%). A análise citogenética evidenciou a deleção do braço longo do cromossomo 6 em 1 paciente ($n=4$, 25%), sem metáfase avaliável em 1 ($n=4$, 25%), e cariótipo masculino sem anormalidades (46, XY) em 2 pacientes ($n=4$, 50%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Dados morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e histopatológicos de medula óssea

Pacientes	Mielograma	Imunofenotipagem de MO	Histopatológico de MO	Citogenética
1.	Hipercelular, com hiperplasia granulocítica (provável por uso de GCSF) com disgrânulo e diseritropoiese, compatível com SMD tipo CRDM, descartadas causas secundárias de SMD, presença de figuras de hemofagocitose	Leves sinais displásicos, inversão CD4 ⁺ /CD8 ⁺ , baixo percentual de linfócitos B, baixo percentual de monócitos	90% de celularidade, numerosos histiócitos, por vezes com hemácias em seu interior, série granulocítica com retardo de maturação, megacariócitos frequentes pequenos e hipolobulados	46, XY, del (6) (q21) [10]/ 46, XY [20]
2.	Hipocelular com cerca de 10-12% de blastos e intensos sinais displásicos nas três linhagens hematológicas	Presença de 18,5% de blastos mieloides com expressão de CD7 e CD4, sem expressão de MPO e com expressão aberrante de marcadores linfoides T CD4 ⁺ e CD7 ⁺	Medula óssea moderadamente hipercelular (70% de celularidade) demonstrando extensa fibrose e componente estromal de células fusiformes, colorações de Ziehl e Grocott negativas	Sem metáfase
5.	Normocelular, discreta hiperplasia eritroide, 1,2% de blastos	Não se detectou população celular com imunofenótipo anômalo. Acentuada inversão CD4/CD8 com aumento percentual de linfócitos T CD3 ⁺ /CD57 ⁺	Discretamente hipercelular para a idade com 60% de celularidade, alguns megacariócitos pequenos e hipolobulados, ausência de granulomas, ausência de fungos ou micobactérias	46, XY
8.	Medula óssea normocelular, pleomórfica, com séries eritroide e mioide de maturação normal, presença de micromegacariócitos. Ausência de parasitos ou infiltração leucêmica na amostra analisada.	-	Processo inflamatório crônico granulomatoso. A impregnação pela prata revela raras estruturas arredondadas e pequenas, relativamente uniformes, com aparente figura de brotamento, que poderiam corresponder a formas fúngicas, especificamente <i>Histoplasma capsulatum</i>	-
13.	Normocelular, presença de micromegacariócitos hipossegmentados	Medula óssea com sinais de hemodiluição, sem detecção de população anômala	Hipocelular para a idade com 40% de celularidade hematopoiética, relação G:E 2:1, série eritroide preservado, alguns pequenos e hipolobulados, blastos em número normal, ausência de granulomas, ausência de fibrose reticulínica	46, XY

MO – Medula óssea, GCSF - Fator de crescimento estimulador de granulócitos; SMD – Síndrome mielodisplásica; CRDM – Citopenia refratária com displasia multilinhagem; MPO – Mieloperoxidase; Relação G:E – Relação granulócito: eritrócito; del - Deleção. Fonte: elaborado pela autora

5.2 Frequência das mutações

A Tabela 8 apresenta os dados de sequenciamento genético e evolução clínica dos pacientes incluídos no período. Nas 22 amostras de DNA, foram encontradas 4 variantes genéticas identificadas, tendo como base a sequência original do gene *GATA2* (3 polimorfismos e uma mutação patogênica). A frequência do alelo menor (MAF) de cada polimorfismo na população geral está assinalada na Tabela 8. Ao final de dois anos, 6 pacientes faleceram (27,3%). A Figura 19 mostra os 3 polimorfismos do gene *GATA2* em heterozigose nos traçados dos eletroferogramas. Do total de pacientes, apenas um, paciente #2 portador da mutação patogênica, foi submetido a TCTH (4,5%).

Em 4 pacientes (# 1, #4, #9, #21) foi observada a presença da variante não-patogênica c.490 G>A; p. 164 A>T (rs2335052) (18%) no exon 3A, conforme mostrado na Tabela 7 e Figura 20. É descrita como variante de substituição *missense* p.A164T e classificada como polimorfismo com MAF na população geral de 23%.

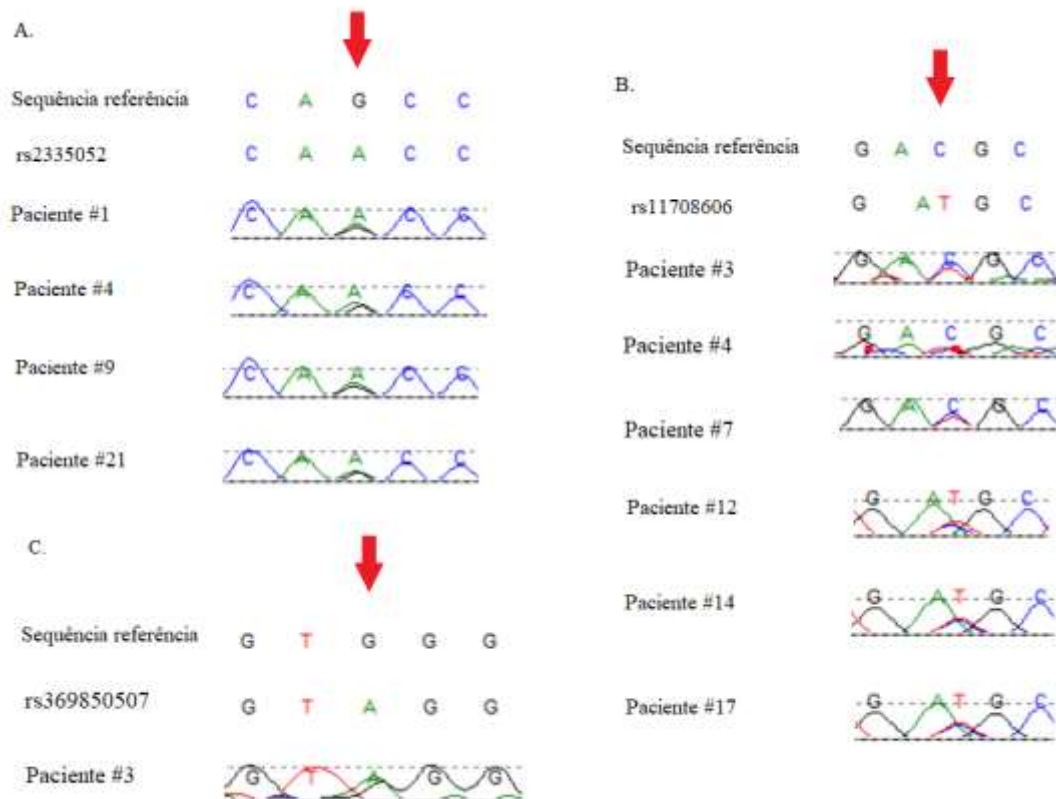
O polimorfismo rs11708606 foi observado em 6 pacientes (27,3%) (#3, #4, #7, #12, #14 e #17) com MAF na população geral de 12,3%. Já a variante rs369850507 foi observada em um paciente (4,5%) (paciente #3) com MAF na população geral de 0,04%., conforme indicam a Tabela 8 e Figura 19. Ambos os polimorfismos estão localizados em regiões intrônica próximas ao exon 5 e não há relato de associação clínica com doenças.

Tabela 8 – Dados moleculares de sequenciamento genético e evolução clínica

Pacientes	Variante <i>GATA2</i> e localização	Tipo de alteração	MAF (%)	TCTH	Seguimento
1.	c.490 G>A; p. 164 A>T (rs2335052) no Exon 3A	Polimorfismo	23	Não	Óbito
2.	c.1061 C>T p.T354M no Exon 5	Mutação Patogênica		Sim	Óbito
3.	g.11199 G>A (rs369850507) e g.11223 C>T (rs11708606) Ambas Exon 5, região intrônica	Polimorfismos	0,04 e 12,3	Não	Óbito
4.	c.490 G>A; p. 164 A>T (rs2335052) no Exon 3A e g.11223 C>T (rs11708606) em Exon 5, região intrônica	Polimorfismos	23 e 12,3	Não	Óbito
5.	-	-	-	Não	Vivo
6.	-	-	-	Não	Vivo
7.	g.11223 C>T (rs11708606) em Exon 5, região intrônica	Polimorfismo	12,3	Não	Vivo
8.	-	-	-	Não	Vivo
9.	c.490 G>A; p. 164 A>T (rs2335052) no Exon 3A	Polimorfismo	23	Não	Óbito
10.	-	-	-	Não	Óbito
11.	-	-	-	Não	Vivo
12.	c.999C>T (rs11708606) em Exon 5, região intrônica	Polimorfismo	12,3	Não	Vivo
13.	-	-	-	Não	Vivo
14.	c.999C>T (rs11708606) em Exon 5, região intrônica	Polimorfismo	12,3	Não	Vivo
15.	-	-	-	Não	Vivo
16.	-	-	-	Não	Vivo
17.	c.999C>T (rs11708606) em Exon 5, região intrônica	Polimorfismo	12,3	Não	Vivo
18.	-	-	-	Não	Vivo
19.	-	-	-	Não	Vivo
20.	-	-	-	Não	Vivo
21.	c.490 G>A; p. 164 A>T (rs2335052) no Exon 3A	Polimorfismo provavelmente	23	Não	Vivo
22.	-	-	-	Não	Vivo

MAF – Frequência do alelo menor; TCTH- Transplante de células-tronco hematopoiéticas. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 19 - Eletroferogramas indicando a presença dos polimorfismos no gene *GATA2* em heterozigose



(A.) c.490 G>A; p. 164 A>T (rs2335052) em região codificante do exon 3A em 4 ($n=22$, 18%); (B.) c.999C>T ou g.11223 C>T (rs11708606) em região não codificante intrônica em 6 pacientes ($n=22$, 27,27%); (C.) g.11199 G>A (rs369850507) em região intrônica não codificante em 1 paciente ($n=22$, 4,54%). Fonte: Elaborado pela autora.

A mutação patogênica *missense* c.1061 C>T; p.T354M, uma das mais prevalentes descritas relacionadas à Síndrome MonoMAC, foi observada no quinto exon do gene *GATA2* em região de ZF2 do paciente #2 que apresentava história de diagnóstico aos 30 anos de SMD e 20 anos de evolução de fenômenos autoimunes e trombóticos, hipotireoidismo e infecção disseminada de difícil controle por *M. kansasii* refratário a vários esquemas antibióticos. Não apresentava, porém, linfedema ou proteinose alveolar. A linha do tempo com apresentação clínica de sinais, sintomas, alterações tomográficas e histopatológicas do paciente #2 encontra-se na Figura 21.

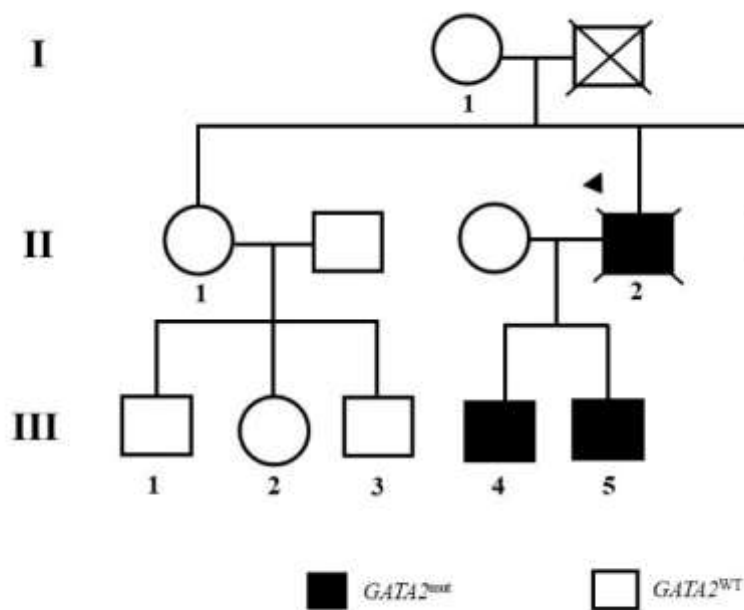
Figura 20 - Linha do tempo de 20 anos com apresentação clínica de sinais, sintomas, alterações tomográficas e histopatológicas do paciente #2



Cada círculo representa um ano. Ele inicialmente apresenta pancitopenia, monocitopenia e síndrome mielodisplásica (MDS) em 1996, quando tinha 30 anos. Aos 43 anos, desenvolve infecção persistente por *Mycobacterium kansasii* até 2015, quando desenvolve anemia refratária com excesso de blastos tipo II (RAEB2), e é feito diagnóstico de Síndrome MonoMAC. Em 2016, foi submetido a transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCT) e faleceu aos 50 anos, 9 meses após o transplante. As figuras representam: (a) Tomografia computadorizada de tórax com infiltrado pulmonar; (b) Úlceras perimaleolares indolores; (c) Artrite em joelho direito; (d) Inflamação granulomatosa esplênica, necrose e calcificação (coloração H&E); (e) Displasia em medula óssea com megacariócitos pequenos e hipolobulados e mielofibrose (coloração H&E); (f) Esporos e hifas septadas inespecíficas em pele (coloração de Grocott). NBT – Nitrozul de tetrazólio, exame que avalia a capacidade fagocítica de neutrófilos por meio da atividade da NAPH-oxidase de coloração azul intensa. Fonte: Modificado de Mendes-de-Almeida et al (submetido), APÊNDICE D.

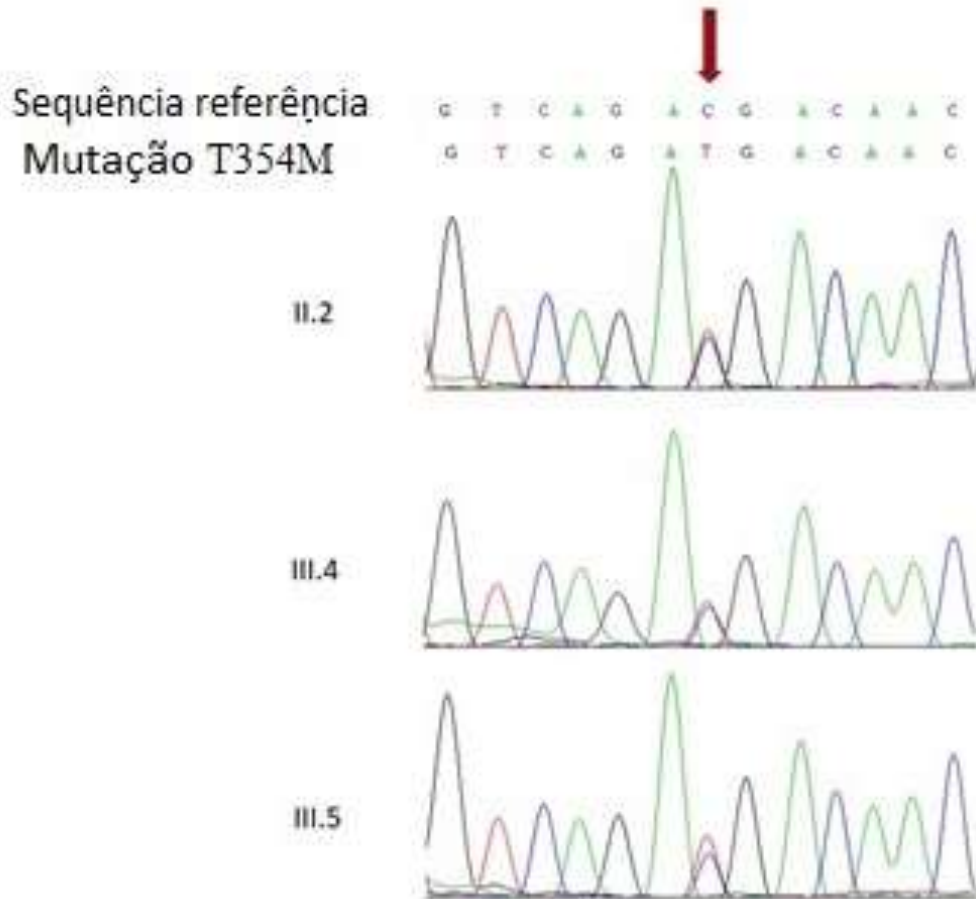
A identificação da mutação T354M em *GATA2* ocorreu após a progressão de CRDM para RAEB2. Após tratamento quimioterápico intenso, ele apresentou infecção inespecífica na pele por esporos e hifas septadas e foi tratado com antifúngico com sucesso. Os nove familiares identificados por números no heredograma da Figura 21 também foram investigados, e a mutação foi identificada em ambos os filhos assintomáticos, de 21 e 28 anos. Os eletroferogramas do sequenciamento de *GATA2* mostrando a mutação c.1061 C>T; p.T354M no paciente #2 e em seus filhos encontram-se na Figura 22. Os filhos foram encaminhados para aconselhamento genético no INCA e o paciente, submetido a TCTH alogênico aparentado a partir de seu irmão *GATA2*-wild type. No entanto, faleceu nove meses depois de causa não documentada, provavelmente infecciosa. A partir deste caso, foi redigido um manuscrito, que foi submetido à revista *BMC Medical Genetics* (Qualis B2, FI 2,168), APÊNDICE D.

Figura 21 - Heredograma mostrando o estudo nas três gerações da família do paciente #2



Indivíduos *GATA2* mutado (*GATA2*^{mut}) and *GATA2* wild-type (*GATA2*^{WT}) estão representados; a flecha indica o probando; indivíduos com números foram estudados. Fonte: Modificado de Mendes-de-Almeida et al (submetido), APÊNDICE D.

Figura 22 - Eletroferogramas do sequenciamento de *GATA2* mostrando a mutação c.1061 C>T; p.T354M no paciente #2 (II.2) e em seus dois filhos (III.4 e III.5)



Mutação c.1061 C>T; p.T354M no exon 5, segundo domínio *zinc-finger* no paciente #2 - probando (II.2) e em seus dois filhos (III.4 e III.5). Fonte: Modificado de Mendes-de-Almeida et al (submetido), APÊNDICE D.

6 DISCUSSÃO

A deficiência do gene *GATA2* é uma causa de PID, que foi atribuída à Síndrome MonoMAC em 2011 e tem como característica marcante a deficiência de monócitos, células dendríticas, linfócitos B e NK. Como consequência, leva à predisposição a infecções como MNT, virais e IFI, além de SMD e LMA, dentre outras neoplasias. No Brasil, até o momento, a deficiência de *GATA2* não foi estudada em coorte de pacientes com doenças infecciosas. Uma dissertação de mestrado desenvolvida na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, em 2016 estudou a prevalência de mutações em *GATA2* em pacientes com síndromes de falência medular em 36 pacientes com anemia aplástica e 33 com SMD hipoplásica e encontrou taxa de 3% em cada (2/69) (BORGES, 2016). As mutações encontradas foram Y72X e N363I nos casos índices e seus familiares também foram estudados. O probando portador da mutação Y72X, que promove substituição do aminoácido Tirosina por *stop codon*, faleceu em 2012 aos 26 anos de idade e tinha história de infecções recorrentes por bactérias Gram-negativas, monocitopenia e psoríase, seu irmão de 30 anos também foi considerado portador da mutação, apesar de não ter sintomas clínicos. Este foi o primeiro caso de Síndrome MonoMAC descrita no Brasil. Todos os familiares do probando portador da mutação N363I, localizada em ZF2, foram considerados *wild-type* (BORGES, 2016).

Considerando ser uma doença relativamente nova e rara, os dados são escassos sobre a prevalência desta mutação no âmbito das doenças infecciosas. Por este motivo, a detecção de 4,5% de prevalência (1/22) de mutações germinativas consideradas patogênicas em pacientes com MNT ou IFI é relevante. Não é possível descartar outras causas de PIDs nos demais 21 pacientes, pois outras causas de PID não foram investigadas.

O predomínio de infecções por MNT ou IFI no sexo masculino é marcante em algumas infecções, como a PCM que tem relação de 22:1, relacionada a fatores de risco ambientais como a atividade laborativa rural, por exemplo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). Outra explicação seria o efeito protetor de estrógenos na PCM, já que há receptores de estrogênio na parede do fungo, que quando estimulados inibem a replicação do mesmo, por bloquear a transformação de micélios ou conídios à forma leveduriforme infectante (FORTES et al., 2011). Já nas MNT, há relato de predominância discretamente maior em mulheres em relação a homens 1,7:1 (OLIVEIRA et al., 2017).

A maior prevalência da cor da pele branca pode ser ao acaso pelo reduzido número amostral, o que não pode ser valorizado. Mutações em *GATA2*, a princípio, não têm predileção por sexo ou cor da pele. A distribuição dos municípios de residência com predominância no Rio de Janeiro reflete a cobertura assistencial do INI, bem como ao fato do instituto estar localizado nesse município e esse ser o município mais populoso do estado. A variedade de infecções fúngicas observada nos pacientes está compatível com a frequência endêmica na nossa região tropical (LEE; LAU, 2017; STOUT; KOH; YEW, 2016). A ausência de MAC contraria a literatura em geral, que fala que a causa mais frequente de infecção por MNT é MAC, seguida de *M. kansasii* (STOUT; KOH; YEW, 2016; WU; HOLLAND, 2015).

O desenvolvimento de neoplasias em pacientes com infecções por MNT ou IFI pode sugerir desregulação do sistema imune, pois já é sabido que a incidência de melanoma está aumentada em pacientes com imunodeficiências (KUBICA; BREWER, 2012). A minoria dos pacientes apresentou história familiar para neoplasia, pois poderia sugerir uma predisposição familiar pela presença de mutações germinativas. A presença de manifestação reumatológica é um dos sintomas relacionados à deficiência em *GATA2*, foi observado em exuberância no paciente portador da mutação T354M, e pode ser observado em menor intensidade em outros pacientes. Houve relato de história de eosinofilia em 2 dos 3 pacientes com SMD. Estes pacientes tiveram curta sobrevida, o que pode reforçar a relação entre eosinofilia e SMD de pior evolução, com progressão mais frequente para RAEB e LMA (MATSUSHIMA, 2003).

A mediana de hemoglobina foi pouco inferior em relação aos níveis normais, o que pode ser explicado pela presença de anemia de doença crônica, muito comum nesses tipos de infecção granulomatosa (WEISS; GOODNOUGH, 2005). Valores de mediana de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas encontraram-se dentro dos limites normais, sendo mais baixos nos pacientes com SMD ou com formas mais graves de infecção. A mediana de monócitos, entretanto, foi bem mais elevada que aquela observada por Vinh et al em grupo de 18 pacientes com Síndrome MonoMAC, 425 versus 14,5 céls; mm³ (VINH et al., 2010). A estes pacientes, posteriormente foram associados mutações em *GATA2* (HSU et al., 2011).

As medianas das contagens de linfócitos T CD4⁺ e relação CD4⁺/CD8⁺ em sangue periférico ficaram dentro da normalidade com alguns escapes fora da faixa. A imunofenotipagem de medula óssea de dois pacientes mostrou inversão da relação CD4⁺/CD8⁺, alteração comum dentre pacientes com HIV. Isto pode indicar desregulação imune T, porém é um achado inespecífico. A celularidade da medula óssea pode ser melhor avaliada pelo exame histopatológico e encontrava-se, na maioria das vezes, aumentada. Foi comum também a

presença de megacariócitos pequenos e hipolobulados. A fibrose reticulínica, comum em pacientes com SMD relacionada a *GATA2*^{-mut}, estava presente no paciente em que foi identificada mutação patogênica. Apenas um paciente, que apresentou SMA com progressão para LMA, teve alteração citogenética com (del6).

Na literatura, até o momento, já foram identificadas 624 mutações patogênicas em regiões codificantes de *GATA2* (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, [s.d.]). A maioria delas são mutações *missense* (74,4%), silenciosas (24,1%), deleção *frameshift* (2,4%), substituição *nonsense* (2,1%) e demais. As trocas de nucleotídeos mais frequentes são G>A (30,3%), C>T (25,5%), C>G (21%), C>A (7,6%), G>T (6%), G>C (5,5%), A>T (3,1%), dentre outras. Curiosamente, há registro de 6 substituições por nucleotídeos desconhecidos (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, [s.d.]).

GATA2 é indispensável para a hematopoiese. Ele é associado a, regula e é regulado por vários fatores de transcrição envolvidos em malignidades hematológicas (HAHN et al., 2011). Muitas destas interações envolvem o ZF2, onde a mutação T354M está localizada, e é provável que mudanças na natureza destas interações contribuam para a predisposição de SMD e LMA (HAHN et al., 2011). A mutação patogênica *missense* c.1061 C>T; p.T354M foi identificada no paciente #2 que apresentava SMD com progressão para RAEB2 e em seus descendentes assintomáticos. A ausência de linfedema neste paciente corrobora os dados da literatura que apontam que a maioria das mutações *missense*, incluindo a prevalente T354M, não se correlaciona com linfedema (KAZENWADEL et al., 2015). Apesar de ter um padrão de herança dominante, estudos observaram portadores assintomáticos, o que sugere que a penetrância pode ser variável ou incompleta (DONADIEU et al., 2018; HAHN et al., 2011). Isso pode justificar o fato de ainda não terem apresentado sintomas ao diagnóstico. No entanto, podem ainda vir a apresentá-los no futuro, daí a importância do acompanhamento e aconselhamento genético. Chong et al., recentemente identificaram que as três mutações germinativas *missenses* em *GATA2* mais prevalentes (gT354M, gR396Q e gR398W) apresentaram diferenças na idade do início da leucemia e diferenças na capacidade de ligação ao DNA, sugerindo o conceito de diferentes consequências funcionais em mutações *GATA2* (CHONG et al., 2018). Pacientes com gR396Q foram os primeiros a apresentar SMD/LMA (surgimento com mediana de idade de 16 anos), seguido de gT354M e gR398W (mediana de 27 e 39 anos, respectivamente). Além disso, demonstrou-se que mutações no ZF2 de *GATA2* podem drasticamente afetar a habilidade de interação com PU.1, um ligante-parceiro conhecido de fatores de transcrição mieloide (CHONG et al., 2018). O paciente #2 abriu o quadro com

MDS aos 30 anos de idade, o que é compatível com a observação de Chong et al., e desenvolveu monocitopenia e infecção recorrente por *M. kansasii*, características que associadas a outras inespecíficas e à mutação patogênica em *GATA2* confirmam o diagnóstico de Síndrome MonoMAC. Apesar de ter sido submetido a TCTH alogênico aparentado de irmão *GATA2*^{-WT} com regime de condicionamento mieloablativo, faleceu 9 meses depois de provável causa infecciosa.

O polimorfismo rs2335052 leva à substituição do aminoácido alanina por treonina no códon 164 (A164T) no terceiro exon do gene *GATA2*. Foi também estudado em pacientes com câncer colorretal (CCR) em estudo imunohistoquímico de 180 casos e foi relacionado a aumento da expressão da proteína *GATA2* (LIU et al., 2015). Assim como no câncer de próstata (RODRIGUEZ-BRAVO et al., 2017), níveis aumentados de expressão da proteína *GATA2* no CCR estão associados a pior prognóstico, com aumento de recorrência e redução de sobrevida livre de doença e pode ser usado como potencial indicador preditivo de recorrência após colectomia curativa (LIU et al., 2015). Neste estudo, foi comparado o prognóstico dos alelos GG, GA e AA, sendo este último o de pior prognóstico. Como a homozigose é teoricamente incompatível com a vida, uma possível explicação para essa ocorrência, poderia ser a perda de heterozigose do gene, restando apenas o alelo A. Dos nossos 4 pacientes onde o SNP rs2335052 GA foi observado, dois apresentaram MNT de difícil manejo e neoplasias agressivas, sendo #1 de 75 anos com *M. kansasii* e SMD com progressão para LMA e #4 de 55 anos com *M. fortuitum* e melanoma intestinal metastático para fígado e pulmões, ambos evoluíram para óbito dois meses após a entrada no estudo; o paciente #9 de 25 anos apresentou paracoccidioidomicose forma juvenil, evoluiu também para óbito após abandono de tratamento 10 meses após entrar no estudo; e o #21 de 30 anos encontra-se em tratamento para histoplasmose pulmonar com boa resposta clínica. Não se sabe se a presença deste polimorfismo pode ter contribuído para o desfecho dos casos. Ao contrário das LMAs, o papel do genótipo *GATA2* no prognóstico das neoplasias sólidas ainda foi pouco explorado. Apesar de não ser considerado variante patogênica e não ocorrer em regiões de ZF, que são importantes no papel de ligação ao DNA, o SNP rs2335052 está localizado em região codificante e regulatória, e pode contribuir para a regulação da expressão e função da proteína *GATA2*. Outro estudo identificou cinco polimorfismos do gene *GATA2* (rs2335052, rs2713604, 3P0455, rs3803 e rs2713579) com o risco estatístico aumentado de doença arterial coronariana (DAC) precoce (CONNELLY et al., 2006). Posteriormente, dois deles (rs2713604 e rs3803) foram validados em estudo caso-

controle, que sugere *GATA2* como gene para predisposição de DAC precoce (CONNELLY et al., 2006).

Os polimorfismos rs11708606 e rs369850507 observados em nossos pacientes não levam à troca de aminoácido, pois estão localizados em região não codificante intrônica e não se associam a doenças clínicas (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, [s.d.]). No entanto, já foram descritas outras mutações patogênicas intrônicas (deleções e mutações pontuais) capazes de diminuir a transcrição da proteína *GATA2* e se relacionaram à síndrome MonoMAC (HSU et al., 2013), o que sugere que mutações em regiões não codificantes podem ser importantes na expressão da proteína *GATA2*. No paciente #3 foi observada a co-ocorrência de dois polimorfismos rs11708606 e rs369850507, ambos em regiões intrônicas próximas ao exon 5 e no paciente #4 houve co-ocorrência do polimorfismo rs2335052 no exon 3A e rs11708606 em região intrônica próxima ao exon 5.

Ao diagnóstico, portadores de mutações patogênicas em *GATA2* devem ser rastreados para HPV e cânceres relacionados e considerar vacinação para HPV (*THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM*, 2016). Devem realizar exames pulmonares de base, como prova de função respiratória e tomografia de tórax, conforme sintomas. O médico assistente do paciente deve ser alertado para possíveis infecções oportunistas, especialmente MNT. Deve-se considerar azitromicina profilática, repor imunoglobulinas se estiverem baixas ou apresentar infecções de repetição, rastrear surdez congênita e evitar drogas ototóxicas (*THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM*, 2016). Seu acompanhamento deve ser pelo menos anual com rastreio para HPV, cânceres e problemas respiratórios. O grupo de Chicago que estuda indivíduos com susceptibilidade a malignidades hematológicas sugere considerar TCTH alogênico quando o paciente desenvolve necessidade transfusional frequente, alteração citogenética clonal, displasia ou malignidade em medula óssea, ou ainda infecções graves e recorrentes. Sugere ainda considerar em indivíduos com mutações em *ASXL1* e com níveis aumentados do ligante FLT3, o que aumenta a gravidade do quadro (*THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM*, 2016).

Na série do NIH de 14 pacientes com mutações em *GATA2* submetidos a TCTH alogênico não mieloablativo. As mutações em *GATA2* mais frequentemente observadas foram T354M e R398W (GROSSMAN et al., 2014). A mediana de idade foi de 33 anos, variando de 15 a 46 anos, a maioria dos pacientes sofria de infecções desde a infância e a mediana de tempo de doença antes do TCTH foi de 7,5 anos. Dos 14 pacientes, 12 (86%) apresentavam critérios

da OMS para SMD, sendo a maioria representada por RCDM, sendo que dois pacientes rapidamente progrediram para RAEB antes do TCTH. Quatro pacientes apresentavam monossomia do cromossomo 7, alteração que confere pior prognóstico em LMA ou SMD. Todos receberam profilaxia com azitromicina por pelo menos 6 meses pós-transplante. Oito pacientes estão vivos com reconstituição da grave deficiência de monócitos, células B e NK e reversão do fenótipo clínico com mediana de acompanhamento de 3,5 anos (GROSSMAN et al., 2014). Dois pacientes rejeitaram o enxerto, sendo um aparentado e um não aparentado, e um receptor de doador aparentado recaiu com SMD pós-TCTH (GROSSMAN et al., 2014). Os autores sugerem que o tempo para realização do TCTH deve ser melhor definido, e deve acontecer após o início das alterações patológicas, porém antes do desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo ou malignidades (GROSSMAN et al., 2014). Além disso, a incidência de rejeição a enxerto e a recaída após-TCTH alogênico não mieloablativo podem indicar que uma abordagem alternativa deve ser considerada, como a preferência para utilização de regime de condicionamento mieloablativo (GROSSMAN et al., 2014). O mesmo grupo em 2018 obteve sobrevida global de 86% em 2 anos em crianças com deficiência em *GATA2* submetidas a TCTH mieloablativo com bussulfan e fludarabina (FREEMAN, 2018). Além disso, protocolos haploidênticos com ciclofosfamida pós-transplante para diminuir a doença enxerto-hospedeiro (GVHD) tiveram excelentes resultados (FREEMAN, 2018). Óbitos ocorreram por LMA refratária, GVHD grave ou sepse (FREEMAN, 2018).

O presente estudo reforça a importância do rastreamento para deficiência de *GATA2* em pacientes com infecções por MNT e IFI sem imunossupressão conhecida. A presença de características como SMD, monocitopenia, ou manifestações reumatológicas exuberantes podem indicar esta causa de PID. É importante a compreensão que a simples presença da mutação não é suficiente para o desenvolvimento de sintomas. Assim como os estudos americano e franco-belga, que identificaram 4 e 5 indivíduos portadores assintomáticos da mutação em *GATA2* (DONADIEU et al., 2018; SPINNER et al., 2014), os 2 filhos do paciente #2 até o momento não apresentam sintomas. Fenômenos epigenéticos, como o silenciamento genético ou o desenvolvimento de mutações adicionais somáticas em outros genes, poderiam explicar esta observação. Além disso, nosso estudo identificou 3 polimorfismos do gene *GATA2* que até o momento não são considerados patogênicos. Futuros estudos possivelmente podem associá-los, especialmente o rs2335052, à presença de imunodeficiências ou neoplasias.

7 CONCLUSÃO

Pela primeira vez, demonstra-se 4,5% de prevalência de mutação patogênica em *GATA2* em pacientes com MNT ou IFI em centro de referência em doenças infecciosas (1/22). A mutação *missense* c.1061 C>T; p.T354M foi correlacionada com a síndrome MonoMAC em paciente com idade de início de SMD aos 30 anos de idade e história de 7 anos de evolução de tratamento sem sucesso para MNT, dentre outros sintomas sugestivos da síndrome. Acreditamos ser a segunda descrição de síndrome MonoMAC e a primeira da mutação T354M no Brasil. Houve confirmação do caráter germinativo da mutação pois a mesma foi também observada em seus descendentes e caracteriza a segregação genética.

Além disso, houve também a observação do polimorfismo rs2335052 em região codificante com valor inferior à MAF na população geral. Este polimorfismo, a princípio não é capaz de provocar doenças clinicamente importantes, porém um estudo já demonstrou associação com pior prognóstico no CCR. Dois polimorfismos intrônicos rs11708606 e rs369850507 tiveram prevalência maior que a MAF da população em geral e até o momento não foram associados a doenças. Não foi possível correlacionar os 3 polimorfismos encontrados com algum fenótipo específico. Porém 3 dos 4 pacientes com polimorfismo rs 2335052 apresentaram formas graves de MNT e PCM, além da concomitância de neoplasias e evoluíram para óbito.

Confirmamos a necessidade de rastreio de pacientes portadores de MNT ou IFI para sequenciamento do gene *GATA2*, especialmente se apresentarem citopenia, como monocitopenia, como estratégia de identificação precoce dos pacientes portadores desta mutação germinativa associada a PID. Mais estudos sobre a prevalência, expressão e significância clínica de variantes no gene *GATA2* são necessários para o conhecimento desta condição em toda sua complexidade e para podermos indicar o melhor tratamento de maneira mais segura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. 2nd ed ed. Philadelphia: Saunders, 2004.

ALONSO-MONTES, C. et al. Rare genetic variants in GATA transcription factors in patients with hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of Investigative Medicine**, v. 65, n. 5, p. 926–934, jun. 2017.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.

ARMSTRONG, P. A. et al. Multistate Epidemiology of Histoplasmosis, United States, 2011–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 425–431, mar. 2017.

BODOR, C. et al. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. **Haematologica**, v. 97, n. 6, p. 890–894, 1 jun. 2012.

CALVO, K. R. et al. Myelodysplasia in autosomal dominant and sporadic monocytopenia immunodeficiency syndrome: diagnostic features and clinical implications. **Haematologica**, v. 96, n. 8, p. 1221–1225, 1 ago. 2011.

CHARLOTTE NIEMEYER, M. E. **Mechanistic insights into the role of GATA2 haploinsufficiency for predisposition to MDS and AML**. Apresentação oral apresentado em 11th Biennial Childhood Lymphoma and Leukemia Symposium. Helsinki, Finlândia, 21 maio 2018.

CHONG, C.-E. et al. Differential effects on gene transcription and hematopoietic differentiation correlate with GATA2 mutant disease phenotypes. **Leukemia**, v. 32, n. 1, p. 194–202, jan. 2018.

COLLIN, M.; DICKINSON, R.; BIGLEY, V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. **British Journal of Haematology**, v. 169, n. 2, p. 173–187, abr. 2015.

CONNELLY, J. J. et al. GATA2 Is Associated with Familial Early-Onset Coronary Artery Disease. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 8, p. e139, 2006.

CSABA SZALAI. **Genetics and genomics**. Typotex Kiadó, Hungria: [s.n.].

CUELLAR-RODRIGUEZ, J. et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. **Blood**, v. 118, n. 13, p. 3715–3720, 29 set. 2011.

DICKINSON, R. E. et al. The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. **Blood**, v. 123, n. 6, p. 863–874, 6 fev. 2014.

DINARDO, C. D. et al. Evaluation of Patients and Families With Concern for Predispositions to Hematologic Malignancies Within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic

(HHMC). **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 16, n. 7, p. 417- 428.e2, jul. 2016.

DONADIEU, J. et al. Natural history of GATA2 deficiency in a survey of 79 French and Belgian patients. **Haematologica**, v. 103, n. 8, p. 1278–1287, ago. 2018.

FASAN, A. et al. GATA2 mutations are frequent in intermediate-risk karyotype AML with biallelic CEBPA mutations and are associated with favorable prognosis. **Leukemia**, v. 27, n. 2, p. 482–485, fev. 2013.

FORTES, M. R. P et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v 86, n 3, p 516-25, jun 2011.

FREEMAN, A. F. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Primary Immunodeficiencies Beyond Severe Combined Immunodeficiency. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 7, n. suppl_2, p. S79–S82, 26 dez. 2018.

GREEN, C. L. et al. *GATA2* mutations in sporadic and familial acute myeloid leukaemia patients with *CEBPA* mutations. **British Journal of Haematology**, v. 161, n. 5, p. 701–705, jun. 2013.

GREIF, P. A. et al. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 120, n. 2, p. 395–403, 12 jul. 2012.

GROSSMAN, J. et al. Nonmyeloablative Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for GATA2 Deficiency. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 20, n. 12, p. 1940–1948, dez. 2014.

HAHN, C. N. et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **Nature Genetics**, v. 43, n. 10, p. 1012–1017, 4 set. 2011.

HIRABAYASHI, S. et al. Heterogeneity of GATA2-related myeloid neoplasms. **International Journal of Hematology**, v. 106, n. 2, p. 175–182, ago. 2017.

HSU, A. P. et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. **Blood**, v. 118, n. 10, p. 2653–2655, 8 set. 2011.

HSU, A. P. et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. **Blood**, v. 121, n. 19, p. 3830–3837, 9 maio 2013.

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. [s.l: s.n.].

KAZENWADEL, J. et al. GATA2 is required for lymphatic vessel valve development and maintenance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 8, p. 2979–2994, 3 ago. 2015.

KOEGEL, A. K. et al. Acute lymphoblastic leukemia in a patient with MonoMAC syndrome/*GATA2* haploinsufficiency: Koegel et al. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 63, n. 10, p. 1844–1847, out. 2016.

KUBICA, A. W.; BREWER, J. D. Melanoma in Immunosuppressed Patients. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, n. 10, p. 991–1003, out. 2012.

LASBURY, M. E. et al. Effect of transcription factor GATA-2 on phagocytic activity of alveolar macrophages from *Pneumocystis carinii*-infected hosts. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4943–4952, set. 2003.

LE DIEU, R. et al. Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. **Blood**, v. 114, n. 18, p. 3909–3916, 29 out. 2009.

LEE, J.-S. et al. Idiopathic hypereosinophilia is clonal disorder? Clonality identified by targeted sequencing. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0185602, 31 out. 2017.

LEE, P. P.; LAU, Y.-L. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections—Revelations from Endemic Mycoses. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 28 jun. 2017.

LIONAKIS, M. S. Genetic Susceptibility to Fungal Infections in Humans. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 11–22, mar. 2012.

LIU, X. et al. GATA2 rs2335052 Polymorphism Predicts the Survival of Patients with Colorectal Cancer. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136020, 19 ago. 2015.

LÜBKING, A. et al. Young woman with mild bone marrow dysplasia, GATA2 and ASXL1 mutation treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Leukemia Research Reports**, v. 4, n. 2, p. 72–75, 2015.

LUESINK, M. et al. High GATA2 expression is a poor prognostic marker in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 120, n. 10, p. 2064–2075, 6 set. 2012.

MACIEJEWSKI-DUVAL, A. et al. Altered chemotactic response to CXCL12 in patients carrying *GATA2* mutations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 6, p. 1065–1076, jun. 2016. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. 2nd ed ed. Philadelphia: Saunders, 2004.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.

ARMSTRONG, P. A. et al. Multistate Epidemiology of Histoplasmosis, United States, 2011–2014¹. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 425–431, mar. 2017.

BODOR, C. et al. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. **Haematologica**, v. 97, n. 6, p. 890–894, 1 jun. 2012.

CALVO, K. R. et al. Myelodysplasia in autosomal dominant and sporadic monocytopenia immunodeficiency syndrome: diagnostic features and clinical implications. **Haematologica**, v. 96, n. 8, p. 1221–1225, 1 ago. 2011.

CHARLOTTE NIEMEYER, M. E. **Mechanistic insights into the role of GATA2 haploinsufficiency for predisposition to MDS and AML**. Apresentação oral apresentado

em 11th Biennial Childhood Lymphoma and Leukemia Symposium. Helsinki, Finlândia, 21 maio 2018.

CHONG, C.-E. et al. Differential effects on gene transcription and hematopoietic differentiation correlate with GATA2 mutant disease phenotypes. **Leukemia**, v. 32, n. 1, p. 194–202, jan. 2018.

COLLIN, M.; DICKINSON, R.; BIGLEY, V. Haematopoietic and immune defects associated with *GATA2* mutation. **British Journal of Haematology**, v. 169, n. 2, p. 173–187, abr. 2015.

CONNELLY, J. J. et al. *GATA2* Is Associated with Familial Early-Onset Coronary Artery Disease. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 8, p. e139, 2006.

CSABA SZALAI. **Genetics and genomics**. Typotex Kiadó, Hungria: [s.n.].

CUELLAR-RODRIGUEZ, J. et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for *GATA2* deficiency. **Blood**, v. 118, n. 13, p. 3715–3720, 29 set. 2011.

DICKINSON, R. E. et al. The evolution of cellular deficiency in *GATA2* mutation. **Blood**, v. 123, n. 6, p. 863–874, 6 fev. 2014.

DINARDO, C. D. et al. Evaluation of Patients and Families With Concern for Predispositions to Hematologic Malignancies Within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic (HHMC). **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 16, n. 7, p. 417- 428.e2, jul. 2016.

DONADIEU, J. et al. Natural history of *GATA2* deficiency in a survey of 79 French and Belgian patients. **Haematologica**, v. 103, n. 8, p. 1278–1287, ago. 2018.

FASAN, A. et al. *GATA2* mutations are frequent in intermediate-risk karyotype AML with biallelic *CEBPA* mutations and are associated with favorable prognosis. **Leukemia**, v. 27, n. 2, p. 482–485, fev. 2013.

FORTES, M. R. P. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516–524, jun. 2011.

FREEMAN, A. F. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Primary Immunodeficiencies Beyond Severe Combined Immunodeficiency. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 7, n. suppl_2, p. S79–S82, 26 dez. 2018.

GREEN, C. L. et al. *GATA2* mutations in sporadic and familial acute myeloid leukaemia patients with *CEBPA* mutations. **British Journal of Haematology**, v. 161, n. 5, p. 701–705, jun. 2013.

GREIF, P. A. et al. *GATA2* zinc finger 1 mutations associated with biallelic *CEBPA* mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 120, n. 2, p. 395–403, 12 jul. 2012.

GROSSMAN, J. et al. Nonmyeloablative Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for *GATA2* Deficiency. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 20, n. 12, p. 1940–1948, dez. 2014.

HAHN, C. N. et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **Nature Genetics**, v. 43, n. 10, p. 1012–1017, 4 set. 2011.

HIRABAYASHI, S. et al. Heterogeneity of GATA2-related myeloid neoplasms. **International Journal of Hematology**, v. 106, n. 2, p. 175–182, ago. 2017.

HSU, A. P. et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. **Blood**, v. 118, n. 10, p. 2653–2655, 8 set. 2011.

HSU, A. P. et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. **Blood**, v. 121, n. 19, p. 3830–3837, 9 maio 2013.

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. [s.l: s.n.].

KAZENWADEL, J. et al. GATA2 is required for lymphatic vessel valve development and maintenance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 8, p. 2979–2994, 3 ago. 2015.

KOEGEL, A. K. et al. Acute lymphoblastic leukemia in a patient with MonoMAC syndrome/GATA2 haploinsufficiency: Koegel et al. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 63, n. 10, p. 1844–1847, out. 2016.

KUBICA, A. W.; BREWER, J. D. Melanoma in Immunosuppressed Patients. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, n. 10, p. 991–1003, out. 2012.

LASBURY, M. E. et al. Effect of transcription factor GATA-2 on phagocytic activity of alveolar macrophages from *Pneumocystis carinii*-infected hosts. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4943–4952, set. 2003.

LE DIEU, R. et al. Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. **Blood**, v. 114, n. 18, p. 3909–3916, 29 out. 2009.

LEE, J.-S. et al. Idiopathic hypereosinophilia is clonal disorder? Clonality identified by targeted sequencing. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0185602, 31 out. 2017.

LEE, P. P.; LAU, Y.-L. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections—Revelations from Endemic Mycoses. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 28 jun. 2017.

LIONAKIS, M. S. Genetic Susceptibility to Fungal Infections in Humans. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 11–22, mar. 2012.

LIU, X. et al. GATA2 rs2335052 Polymorphism Predicts the Survival of Patients with Colorectal Cancer. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136020, 19 ago. 2015.

LUESINK, M. et al. High GATA2 expression is a poor prognostic marker in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 120, n. 10, p. 2064–2075, 6 set. 2012.

MACIEJEWSKI-DUVAL, A. et al. Altered chemotactic response to CXCL12 in patients carrying *GATA2* mutations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 6, p. 1065–1076, jun. 2016.

MARCEAU-RENAUT, A. et al. Classification of CEBPA mutated acute myeloid leukemia by *GATA2* mutations: *GATA2* and CEBPA Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 5, p. E93–E94, maio 2015.

MATSUSHIMA, T. Prevalence and clinical characteristics of myelodysplastic syndrome with bone marrow eosinophilia or basophilia. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3386–3390, 1 maio 2003.

MIR, M. A. et al. Spectrum of myeloid neoplasms and immune deficiency associated with germline *GATA2* mutations. **Cancer Medicine**, v. 4, n. 4, p. 490–499, abr. 2015.

MURATI, A. et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, dez. 2012.

NGUYEN, J. et al. Melanoma in Patients with *GATA2* Deficiency. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 20 nov. 2017.

NOVAKOVA, M. et al. Loss of B cells and their precursors is the most constant feature of *GATA-2* deficiency in childhood myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, v. 101, n. 6, p. 707–716, 1 jun. 2016.

OLIVEIRA, M. J. et al. *Mycobacterium avium* infection in Portugal. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 21, n. 2, p. 218–222, 1 fev. 2017.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement_1, p. S3–S14, 1 ago. 2006.

PICARD, C. et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. **Journal of Clinical Immunology**, v. 38, n. 1, p. 96–128, jan. 2018.

PRADER, S. et al. Life-Threatening Primary Varicella Zoster Virus Infection With Hemophagocytic Lymphohistiocytosis-Like Disease in *GATA2* Haploinsufficiency Accompanied by Expansion of Double Negative T-Lymphocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 3 dez. 2018.

BORGES, G. **Mutações no gene *GATA2* em pacientes com síndrome de falência medular**. Dissertação de Mestrado—Área de Concentração: Oncologia, Células tronco e Terapia celular: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

RODRIGUES, N. P. et al. *GATA-2* mediated regulation of normal hematopoietic stem/progenitor cell function, myelodysplasia and myeloid leukemia. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 3, p. 457–460, mar. 2012.

RODRIGUEZ-BRAVO, V. et al. The role of *GATA2* in lethal prostate cancer aggressiveness. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n. 1, p. 38–48, jan. 2017.

ROSA, J. S. et al. West Nile virus encephalitis in GATA2 deficiency. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 15, n. 1, dez. 2019.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidiodomicose - 2017*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. esp, nov. 2018.

SPINNER, M. A. et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. **Blood**, v. 123, n. 6, p. 809–821, 6 fev. 2014.

SPINNER, M. A. et al. GATA2 deficiency underlying severe blastomycosis and fatal herpes simplex virus–associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 2, p. 638–640, fev. 2016.

STOUT, J. E.; KOH, W.-J.; YEW, W. W. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 123–134, abr. 2016.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. **Blood**, v. 128, n. 14, p. 1800–1813, 6 out. 2016.

TIEN, F.-M. et al. GATA2 zinc finger 1 mutations are associated with distinct clinico-biological features and outcomes different from GATA2 zinc finger 2 mutations in adult acute myeloid leukemia. **Blood Cancer Journal**, v. 8, n. 9, set. 2018.

TONG, Q. et al. Interaction between GATA and the C/EBP Family of Transcription Factors Is Critical in GATA-Mediated Suppression of Adipocyte Differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 2, p. 706–715, 15 jan. 2005.

VIGER, R. S. et al. Role of the GATA Family of Transcription Factors in Endocrine Development, Function, and Disease. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 4, p. 781–798, abr. 2008.

VINH, D. C. et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. **Blood**, v. 115, n. 8, p. 1519–1529, 25 fev. 2010.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of Chronic Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 1011–1023, 10 mar. 2005.

WEST, R. R. et al. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. **Haematologica**, v. 99, n. 2, p. 276–281, 1 fev. 2014.

WLODARSKI, M. W. et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. **Blood**, v. 127, n. 11, p. 1387–1397, 17 mar. 2016.

WLODARSKI, M. W.; SAHOO, S. S.; NIEMEYER, C. M. Monosomy 7 in Pediatric Myelodysplastic Syndromes. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 32, n. 4, p. 729–743, ago. 2018.

WU, U.-I.; HOLLAND, S. M. Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 968–980, ago. 2015.

ZHANG, P. et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 15, p. 8705–8710, 20 jul. 1999.

ZHANG, S.-J. et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 6, p. 2076–2081, 12 fev. 2008.

ZHENG, R.; BLOBEL, G. A. GATA Transcription Factors and Cancer. **Genes & Cancer**, v. 1, n. 12, p. 1178–1188, 1 dez. 2010.

ANEXO A - PARECER DO CEP

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE GATA2 EM PACIENTES COM INFECÇÕES PULMONARES POR MICOBACTÉRIAS NÃO-TUBERCULOSE OU INFECÇÕES FÚNGICAS DISSEMINADAS SEM IMUNOSSUPRESSÃO CONHECIDA

Pesquisador: Rosely Maria Zancopé Oliveira

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 64574417.0.0000.5262

Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

Patrocinador Principal: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Relatório referente ao 1º semestre de 2018

Data do Envio: 29/10/2018

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.087.142

Apresentação da Notificação:

Relatório parcial da pesquisa "Detecção de mutações no gene GATA2 em pacientes com infecções pulmonares por micobactérias não-tuberculose ou infecções fúngicas disseminadas sem imunossupressão conhecida" aprovada neste CEP sob o parecer nº 2.875.911 de 05/09/2018.

Objetivo da Notificação:

Envio de Relatório Parcial correspondente ao período de 04/12/2017 a 15/08/2018, informando o andamento da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Permanecem os mesmos aprovados por este CEP em parecer 2.875.911 de 05/09/2018.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 3.087.142

Estudo em co-participação com o Instituto Nacional de Câncer, em fase de inclusão de participantes, já tendo sido incluídos 21 pacientes de 30 propostos, além de 9 familiares destes pacientes. Cinco participantes foram desligados do estudo, dois por recusarem a dar o consentimento e três por problemas na coleta de sangue, sendo estes não graves. Até o momento sem resultados divulgados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Permanecem os mesmos aprovados por este CEP em parecer 2.875.911 de 05/09/2018.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	64574417.docx	29/10/2018 15:25:58	Rosely Maria Zancopé Oliveira	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 17 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Léa Ferreira Camillo Coura
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: "Detecção de mutações no gene *GATA2* em pacientes com infecções pulmonares por micobactérias não-tuberculose ou infecções fúngicas disseminadas sem imunossupressão conhecida" - versão de 26 de Agosto de 2018.

COORDENADOR DO PROJETO: Rosely Maria Zancopé Oliveira, MsC, PhD.

Você/ seu filho(a) menor de 18 anos está sendo convidado a participar de um estudo chamado de: "Detecção de mutações no gene *GATA2* em pacientes com infecções fúngicas sistêmicas e pulmonares por micobactérias não-tuberculose sem imunossupressão conhecida" **versão de 26 de Agosto de 2018.**

Este estudo visa obter um maior conhecimento sobre a ocorrência de diferenças no DNA onde fica o gene *GATA2*. Esta alteração pode causar problemas na imunidade e causar doenças por micróbios pouco comuns (fungos e por micobactérias). A caracterização de aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes possibilitará a elaboração de uma rotina de acompanhamento adaptada à suas necessidades e a testagem de seus familiares de primeiro grau (irmãos, pais e filhos), já que essa alteração pode ter origem familiar.

Esteja ciente que sua/ do seu filho (a) participação é **VOLUNTÁRIA**, o que significa que o (a) Sr. (a) poderá decidir se quer ou não participar deste estudo, ou caso haja qualquer **DESCONFORTO** ou **CONSTRANGIMENTO** durante o mesmo o Sr.(a) poderá solicitar a não participação ou desistência do estudo. Caso não aceite ou desista de participar do estudo seu tratamento/ do seu filho (a) ou investigação diagnóstica ocorrerá sem nenhum prejuízo.

Este estudo ocorrerá de forma **CONFIDENCIAL** e manterá seu **ANONIMATO** em todos os exames que realizar e também sobre seu diagnóstico. Somente a equipe de profissionais envolvida neste estudo terá conhecimento dos resultados dos exames que realizar e do conteúdo que foi informado durante a(s) consulta(s). A sua participação/ de seu filho (a) neste estudo é fundamental e poderá gerar benefícios para você, sua família ou para outras pessoas portadoras de infecções fúngicas ou por micobactérias no futuro, após o término do estudo.

Essas amostras constituirão um biorrepositório (uma coleção de amostras biológicas humanas). As amostras coletadas serão, a princípio, armazenadas apenas até o final desta pesquisa, no entanto, após esse período, a coordenadora do estudo poderá solicitar ao Comitê de ética em pesquisa (CEP) para armazenar as amostras por um prazo maior, sendo o máximo de 10 anos. Também poderão ser usadas em projetos futuros, porém, primeiro solicitaremos a aprovação do CEP e, quando necessário, solicitaremos a autorização da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O Comitê de Ética e a CONEP são um grupo de pessoas que aprovaram esta pesquisa para proteger seus direitos. Porém, se for aprovado, solicitaremos a sua autorização ANTES de tudo. No caso de não obtermos sucesso no contato, o CEP poderá dispensar o consentimento.

Após todos os esclarecimentos necessários, solicitamos sua autorização, através da assinatura deste TCLE, para utilização de suas amostras biológicas neste estudo, e armazenamento das mesmas para utilização em estudos futuros.

Você poderá recusar-se a participar da pesquisa, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento e sem que o seu atendimento clínico ou do meu filho (a) seja modificado pela sua recusa.

Seus gastos com alimentação e demais despesas que venham a ocorrer em função do estudo e de seu acompanhante serão reembolsados, mediante apresentação de comprovação até o máximo de R\$ 20,00 por visita. O transporte de ida e volta para o INI será oferecido por carro próprio da instituição, mediante agendamento prévio, e será realizado, de preferência, nos dias de consultas.

Os exames aplicados serão gratuitos.

Antes de assinar este Termo, você deve ser informado plenamente sobre a pesquisa, não hesitando em fazer perguntas de qualquer natureza que julgar conveniente esclarecer. Este projeto visa estudar a associação entre infecções por fungos ou micobactérias com diferenças no DNA onde fica o gene *GATA2*.

Nesta investigação serão coletados 1 tubo de 04 ml de sangue. O sangue será colhido assepticamente por punção de uma veia do braço. Este procedimento será realizado junto com a coleta dos exames de rotina, não implicando em uma punção venosa separada. A coleta de sangue

é um exame seguro, podendo causar pequeno desconforto, como um pequeno hematoma, ou seja, extravasamento de sangue da veia para o tecido, no local da punção. A identificação de mutação genética pode levar a ansiedade e preocupações com o que pode ocorrer com o indivíduo no futuro. Por isso, aqueles pacientes com teste positivo poderão ser acompanhados por psicólogos no Serviço de Genética do INCA.

Esta pesquisa pode ou não trazer benefícios imediatos para o seu acompanhamento clínico ou do seu filho (a), mas poderá trazer maior conhecimento da doença;

Em caso da parte do seu DNA onde fica o gene GATA2 ser diferente do DNA da maioria das pessoas, você ou seu filho poderão receber aconselhamento genético se quiserem, e seus familiares de primeiro grau poderão ser contatados e convidados a participar também do estudo.

Após todos os esclarecimentos necessários, solicitamos sua autorização, através da assinatura deste TCLE, para utilização de suas amostras biológicas ou de seu filho (a) neste estudo, e armazenamento das mesmas para utilização em estudos futuros. Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido você não está abrindo mão de nenhum direito, incluindo o direito de buscar indenização e assistência integral por danos resultantes do estudo.

Você/seu filho (a) podem optar por receber ou não o resultado dos seus exames e ser encaminhado para aconselhamento genético.

Deseja receber o resultado do seu exame: Sim () Não ()

Deseja receber aconselhamento genético: Sim () Não ()

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento, decidindo-me participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer momento.

Declaro dar meu consentimento para participar deste estudo recebendo uma cópia do Termo de Consentimento, e estando ciente, de que a outra cópia será arquivada sob a responsabilidade do Laboratório de Micologia.

Este Termo é redigido em duas cópias, uma para o participante e outra para o pesquisador. TODAS AS PÁGINAS DEVERÃO SER RUBRICADAS PELO SUJEITO E PELO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, COM AMBAS AS ASSINATURAS APOSTAS NA ÚLTIMA PÁGINA.

Nome do participante: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Local: _____

Data atual: ____/____/____

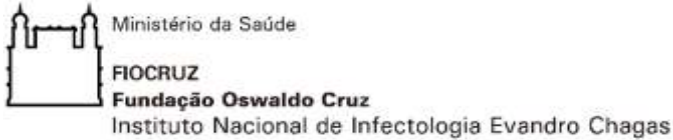
Ass. do Voluntário ou Responsável legal:

Digital se paciente analfabeto

Testemunha

Ass. do Profissional membro da equipe que obteve o Termo:

Em caso de qualquer dúvida, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com a médica e pesquisadora assistente Dra Daniela Palheiro Mendes de Almeida no telefone 3865-9584, 3865-9586 ou 3864-9538 de segunda a sexta-feira de 8 às 17h, EMERGÊNCIAS (21) 99336-9163 ou com a Coordenadora do Projeto, Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira, Telefones: 3865-9640 ou 3865-9557 de segunda a sexta-feira de 8 às 17h no INI – FIOCRUZ no endereço: Av. Brasil, 4365, INI – Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP: 21.040-361.



APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA FAMILIARES ADULTOS

TÍTULO DO PROJETO: "Detecção de mutações no gene GATA2 em pacientes com infecções pulmonares por micobactérias não-tuberculose ou infecções fúngicas disseminadas sem imunossupressão conhecida" - versão de 26 de Agosto de 2018.

COORDENADOR DO PROJETO: Rosely Maria Zancopé Oliveira, MsC, PhD.

Você está sendo convidado a participar de um estudo chamado de "Detecção de mutações no gene GATA2 em pacientes com infecções pulmonares por micobactérias não-tuberculose ou infecções fúngicas disseminadas sem imunossupressão conhecida" **versão de 26 de Agosto de 2018.**

Este estudo visa obter um maior conhecimento sobre a ocorrência de diferenças no DNA, que podem causar problemas na imunidade e causar doenças por micróbios pouco comuns (fungos e por micobactérias). Você possui um parente que foi identificada diferença em parte do DNA onde fica o gene *GATA2* e por isso foi convidado para avaliar se você também a possui. A caracterização de aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores e em seus familiares possibilitará a elaboração de uma rotina de acompanhamento clínico adaptada e aconselhamento genético.

Esteja ciente que sua participação é **VOLUNTÁRIA**, o que significa que o (a) Sr. (a) poderá decidir se quer ou não participar deste estudo, ou caso haja qualquer **DESCONFORTO** ou **CONSTRANGIMENTO** durante o mesmo o Sr.(a) poderá solicitar a não participação ou desistência do estudo. Caso não aceite ou desista de participar do estudo, o tratamento de seu familiar ou investigação diagnóstica ocorrerá sem nenhum prejuízo.

Este estudo ocorrerá de forma **CONFIDENCIAL** e manterá seu **ANONIMATO** em todos os exames que realizar e também sobre o diagnóstico de seu familiar. Somente a equipe de profissionais envolvida neste estudo terá conhecimento dos resultados dos exames que realizar e do conteúdo que foi informado durante a(s) consulta(s). A sua participação neste estudo é fundamental e poderá gerar benefícios para você, sua família ou para outras pessoas portadoras de infecções fúngicas ou por micobactérias no futuro, após o término do estudo.

Essas amostras constituirão um Biorrepositório (uma coleção de amostras biológicas humanas). As amostras coletadas serão armazenadas até o final desta pesquisa (2019), porém após esse período, a pesquisadora do estudo pode solicitar ao Comitê de ética em pesquisa (CEP) para armazenar as amostras por um prazo maior, sendo o máximo 10 anos. Também poderão ser usadas em projetos futuros, porém, primeiro solicitaremos a aprovação do CEP, e, quando necessário, solicitaremos a autorização da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O CEP e CONEP são compostos por um grupo de pessoas que aprovaram esta pesquisa para proteger seus direitos. Se for aprovado, solicitaremos a sua autorização **ANTES** de tudo. No caso de não obtermos sucesso no contato, o CEP poderá dispensar o consentimento.

Após todos os esclarecimentos necessários, solicitamos sua autorização, através da assinatura deste TCLE, para utilização de suas amostras biológicas neste estudo, e armazenamento das mesmas para utilização em estudos futuros.

Você poderá recusar-se a participar da pesquisa, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento e que o atendimento clínico de seu familiar em nada será modificado pela sua recusa.

Seus gastos com alimentação e demais despesas que venham a ocorrer em função do estudo e de seu acompanhante serão reembolsados, mediante apresentação de comprovação até o máximo de R\$ 20,00 por visita. O transporte de ida e volta para o INI será oferecido por carro próprio da instituição, mediante agendamento prévio, e será realizado, de preferência, nos dias de consultas.

Os exames aplicados serão gratuitos.

Antes de assinar este Termo, você deve ser informado plenamente sobre a pesquisa, não hesitando em fazer perguntas de qualquer natureza que julgar conveniente esclarecer.

Este projeto visa estudar a associação entre infecções por fungos ou micobactérias com mutações no gene *GATA2*.

Nesta investigação será coletado 1 tubo de 04 ml de sangue. O sangue será colhido assepticamente por punção de uma veia do braço. A coleta de sangue é um exame seguro, podendo causar pequeno desconforto, como um pequeno hematoma, ou seja, extravasamento de sangue da veia para o tecido, no local da punção. A identificação de mutação genética pode levar a ansiedade e preocupações com o que pode ocorrer com o indivíduo no futuro. Por isso, aqueles indivíduos com a diferença identificada, poderão ser acompanhados por psicólogos no Serviço de Genética do INCA.

Esta pesquisa pode ou não trazer benefícios imediatos para o acompanhamento clínico de meu familiar, mas poderá trazer maior conhecimento da doença.

Em caso da parte do DNA que contém o gene *GATA2* ser diferente da maioria das pessoas, você poderá ser acompanhado por médico especializado e receber aconselhamento genético.

Após todos os esclarecimentos necessários, solicitamos sua autorização, através da assinatura deste TCLE, para utilização de suas amostras biológicas neste estudo, e armazenamento das mesmas para utilização em estudos futuros.

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido você não está abrindo mão de nenhum direito, incluindo o direito de buscar indenização e assistência integral por danos resultantes do estudo.

Você pode optar por receber ou não o resultado dos seus exames e aconselhamento genético.

Deseja receber o resultado do seu exame: Sim () Não ()

Deseja receber aconselhamento genético: Sim () Não ()

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento, decidindo-me participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer momento.

Declaro dar meu consentimento para participar deste estudo recebendo uma cópia do Termo de Consentimento, e estando ciente, de que a outra cópia será arquivada sob a responsabilidade do Laboratório de Micologia.

Este Termo é redigido em duas cópias, uma para o participante e outra para o pesquisador. TODAS AS PÁGINAS DEVERÃO SER RUBRICADAS PELO SUJEITO E PELO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, COM AMBAS AS ASSINATURAS APOSTAS NA ÚLTIMA PÁGINA.

Nome do participante: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

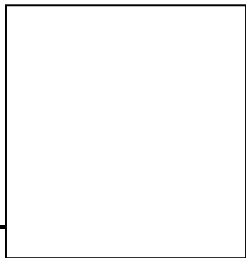
Endereço: _____

Local: _____

Data atual: ____/____/____

Ass. do Voluntário ou Responsável Legal:

Digital se paciente analfabeto



Testemunha

Ass. do profissional membro da equipe que obteve o Termo:

Em caso de qualquer dúvida, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com a médica e pesquisadora assistente Dra Daniela Palheiro Mendes de Almeida no telefone 3865-9584, 3865-9586 ou 3864-9538 de segunda a sexta-feira de 8h às 17h, EMERGÊNCIAS (21) 99336-9163 ou com a Coordenadora do Projeto, Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira, Telefones: 3865-9640 ou 3865-9557 de segunda a sexta-feira de 8h as 17h no INI – FIOCRUZ no endereço: Av. Brasil, 4365, INI – Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP: 21.040-361.

APÊNDICE C - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE) Para adolescentes - 13 a 17 anos de idade

TÍTULO DO PROJETO: "Detecção de mutações no gene GATA2 em pacientes com infecções pulmonares por micobactérias não-tuberculose ou infecções fúngicas disseminadas sem imunossupressão conhecida" - versão de 26 de agosto de 2018.

COORDENADOR DO PROJETO: Rosely Maria Zancopé Oliveira, MsC, PhD;

Você está sendo convidado a participar de um estudo chamado de: "Detecção de mutações no gene GATA2 em pacientes com infecções pulmonares por micobactérias não-tuberculose ou infecções fúngicas disseminadas sem imunossupressão conhecida" versão de 26 de agosto de 2018.

Com esse estudo, queremos obter um maior conhecimento sobre a ocorrência de diferenças no DNA que, em linhas gerais, afetam o sistema imunológico. Pode resultar em infecções por micróbios não muito comuns, além de problemas na fabricação do sangue, levando a anemia, plaquetas e células de defesa baixas. O diagnóstico correto possibilitará um tratamento mais adequado para você, além de evitar algumas complicações.

Se for necessário, podemos testar seus familiares de primeiro grau (irmãos, pais e filhos) pois a alteração pode também ser encontrada neles. O tratamento definitivo, se aplicável, é feito com transplante de medula óssea.

A pesquisa será feita no Instituto Nacional de Infectologia (INI/ FIOCRUZ), em parceria com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Sendo assim, a análise do gene GATA2 será realizado no Laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrica (PHOP) do INCA, localizado no prédio do Centro de Pesquisas (CPQ) na Rua André Cavalcanti, 37 - sexto andar, centro do Rio de Janeiro.

Para isso, será coletado um tubo de sangue, equivalente a quantidade de meia colher de sopa rasa, de uma veia do seu braço. O procedimento é considerado seguro, mas é possível ocorrer um pouco de dor, sangramento ou "roxo" no local da punção. Você só precisa "tirar o sangue" se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A identificação da alteração pode levar a preocupações com o que pode ocorrer no futuro. Por isso, aquelas pessoas que tiveram a diferença no DNA identificada, serão acompanhadas por psicólogos no INCA.

Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefones que tem no final do texto. Mas há coisas boas que podem acontecer como descobrir se você tem problemas de imunidade que resultariam em infecções, evitar complicações mais graves e possibilitar o tratamento mais adequado.

Não falaremos a outras pessoas sobre a sua doença ou o resultado do exame, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados do seu teste podem ser publicados em revistas científicas ou congressos, mas sempre sem identificar seu nome.

Você pode dizer "sim" e participar da pesquisa, mas a qualquer momento, pode dizer "não" e desistir e que ninguém vai ficar aborrecido com você.

Você pode tirar suas dúvidas e conversar com o (s) seu (s) médicos e responsável (eis), que estão sabendo da importância do exame e autorizaram sua coleta.

Seus gastos e de seu acompanhante com alimentação que venham a ocorrer em função do estudo serão reembolsados, mediante apresentação de comprovação até o máximo de R\$ 20,00 por visita. O transporte de ida e volta para o INI será oferecido por carro próprio da instituição, mediante agendamento prévio, e será realizado, de preferência, nos dias de consultas.

O resultado do seu exame será informado para você e seu médico. Caso o exame dê alterado, você será encaminhado para um médico especializado em genética e poderá tirar suas dúvidas sobre a probabilidade de futuros problemas.

Contudo, você pode não querer saber seu resultado nem ser encaminhado para médico especialista em genética.

Deseja receber o resultado do seu exame: Sim () Não ()

Deseja receber aconselhamento genético: Sim () Não ()

Este Termo de Autorização é redigido em duas vias, uma para o paciente e outra para o médico responsável e/ou equipe do Laboratório de Micologia do IN/ Fiocruz.

TODAS AS PÁGINAS DEVERÃO SER RUBRICADAS PELO PACIENTE E PELO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, COM ASSINATURAS E DATAS TAMBÉM NA ÚLTIMA PÁGINA.

Nome do participante: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Nome completo do responsável pelo participante: _____

Endereço:

Telefone de contato: _____

Recebi uma via deste Termo de Assentimento, li e concordo em ter meu sangue coletado para teste diagnóstico, conforme foi explicado neste documento.

Local: _____

Data atual: ____/____/____

Assinatura do pesquisador

Assinatura do participante

Em caso de qualquer dúvida, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com a médica e pesquisadora assistente Dra Daniela Palheiro Mendes de Almeida de segunda a sexta-feira de 8h a 17h no telefone 3865-9584, 3865-9586 ou 3864-9538, EMERGÊNCIAS (21) 99336-9163, ou com a Coordenadora do Projeto, Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira, de segunda a sexta-feira de 8h as 17h nos Telefones: 3865-9640 ou 3865-9557 no INI – FIOCRUZ no endereço: Av. Brasil, 4365, INI – Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP: 21.040-361.

APÊNDICE D - Submissão de Relato de caso na revista BMC Medical Genetics
***GATA2* Mutation in Long Stand *Mycobacterium kansasii* Infection, Myelodysplasia and MonoMAC syndrome: a case-report**

Daniela Palheiro Mendes-de-Almeida, M.D.^{1, 2}, Francianne Gomes Andrade, M.Sc., Ph.D.², Gustavo Borges, M.Sc.³, Filipe V. dos Santos-Bueno, M.Sc.², Iracema F. Vieira, M.D.⁴, Luana Kelly M. da S. da Rocha, M.D.⁵, Daniella A. Mendes-da-Cruz, M.Sc., Ph.D.^{6,7}, Rosely M. Zancopé-Oliveira, Ph.D.⁸, Rodrigo T. Calado, M.D., Ph.D.³, Maria S. Pombo-de-Oliveira, M.D., Ph.D.^{2*}

- 1- Division of Hematology, Evandro Chagas National Institute of Infectology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil;
- 2- Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, Brazil;
- 3- Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil
- 4- Infectious Diseases Department, Hospital dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, Brazil
- 5- Division of Hematology, Oncologia D'Or, Rio de Janeiro, Brazil
- 6- Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil
- 7- Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

8- Laboratory of Mycology, Evandro Chagas National Institute of Infectology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil;

Key words: *GATA-2* mutation, MonoMAC syndrome, myelodysplastic syndrome, myelodysplasia, *Mycobacterium kansasii*.

*Corresponding author:

Maria S. Pombo-de-Oliveira, M.D, Ph.D. Pediatric Hematology-Oncology Program, 6th floor, Research Center, Instituto Nacional de Câncer-INCa. Rua André Cavalcanti, 37. Zip code: 20231- 050; Rio de Janeiro - Brazil. Telephone: +55 21 3207-6532; Fax: +55 21 3207-1470; e-mail: mpombo@inca.gov.br

Abstract

Background: *GATA2* is a transcription factor that is a critical regulator of gene expression in hematopoietic cells. *GATA2* deficiency presents with multi-lineage cytopenia, mycobacterial, fungal and viral infections. Patients with *GATA2* mutation have a high risk of developing myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia.

Case presentation: We described a 43 years-old white male with 20-year follow-up of autoimmune and thrombotic phenomena, hypothyroidism, disseminated refractory *Mycobacterium kansasii* infection and MonoMAC syndrome. *GATA2* c.1061 C>T; p.T354M mutation was identified after he progressed from myelodysplastic pancytopenia to refractory anemia with excess blasts type II. His relatives were also investigated, and he underwent unsuccessful haematopoietic stem cell transplantation. We discuss the clinical features, genetic diagnosis and treatment of this immunodeficiency disorder.

Conclusions: This case illustrates the challenge how a multidisciplinary disease should be handle. Once usual causes of immunodeficiency were excluded, clinicians should consider *GATA2* deficiency in patients with myelodysplasia and long-standing *Mycobacterium kansasii* infection.

Background

Disseminated non-tuberculosis mycobacterium (NTM) infections are found in subjects with advanced human immunodeficiency virus infection, hairy cell leukaemia, or under immunosuppressive therapy regimes (WU; HOLLAND, 2015). Host immune deficiencies with genetic disorders of the interleukin-12 (IL-12)–interferon- γ (IFN- γ) pathway has been also associated with NTM (WU; HOLLAND, 2015). *GATA2* autosomal gene mutations are among these genetic disorders that confer predisposition NTM infections (WU; HOLLAND, 2015). *GATA2* encodes an ill-defined protein containing two zinc-finger domains that is located in the 3p21.3 region and is a key transcriptional regulator of haematopoiesis, lymphopoiesis, and vascular development (COLLIN; DICKINSON; BIGLEY, 2015). Germline loss-of-function mutations in the *GATA2* gene are associated with myelodysplastic syndrome (MDS), acute myeloid leukaemia (AML) and opportunistic infections, including NTM infections (DICKINSON et al., 2014). *GATA2* deficiency/haploinsufficiency is an etiologic in Emberger and MonoMAC syndromes (SPINNER et al., 2014). Emberger syndrome includes primary lymphedema, congenital sensorineural deafness, and cutaneous or anogenital warts (HSU et al., 2011). MonoMAC syndrome is characterized by monocytopenia, predisposition to NTM infections, typically of the *Mycobacterium avium* complex,

viral and fungal infections, pulmonary alveolar proteinosis, and natural killer (NK) and B cell deficiencies (VINH et al., 2010). Recognition of an underlying immune defect associated with genetic susceptibility is crucial for rational treatment, preventive care, and family screening. Our aim is to describe a 20-year follow-up of a male patient finally diagnosed with MonoMAC syndrome. He had long-standing cytopenia, autoimmune and thrombotic phenomena, hypothyroidism and disseminated refractory *Mycobacterium kansasii* infection. He received anti-NTM regimen with different drugs for seven years. *GATA2* mutation was identified in the patient, and his relatives were also investigated. We discuss the clinical features, genetic diagnosis and treatment of this challenging immunodeficiency disorder.

Case presentation

A 43-year-old white male was seen in our clinic due to recurrent sinusitis, ankle and knee arthritis, painless nodular skin lesions at extremities, and eosinophilia in 2008. His clinical history is marked by long-standing pancytopenia and MDS diagnosed in 1996 at age 30, when he complained of spontaneous rectal bleeding and fatigue, which was diagnosed as haemorrhoidal disease (Figure 1). Six years after the MDS diagnosis, he was admitted to the hospital with hepatosplenomegaly, erythema nodosum, retroperitoneal lymph node enlargement, and bilateral pleural effusion. Laboratory investigations failed to demonstrate any fungal, bacterial, or HIV infection. Chronic granulomatous pleuritis was discovered, and he was treated empirically for tuberculosis with standard doses of isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide. Allergy to pyrazinamide developed, and ethambutol was used instead. Circulating blood cells demonstrated pancytopenia with low monocytes (haemoglobin, 7.7 g/dL; white blood cell (WBC) 3,000 cells/ μ L; lymphocytes, 750/ μ L; monocytes, 60/ μ L; and platelets, 95,000/ μ L). One year later, monocytopenia improved slightly, but thrombocytopenia worsened (WBC, 1,900 cells/ μ L; lymphocytes 475 / μ L; monocytes, 114/ μ L; and platelets, 33,000/ μ L). Seven years later (2006), developed respiratory distress and bronchial analysis was negative for bacterial infection. He was then treated with clarithromycin for possible atypical pneumonia. In 2007, a 27% decrease in total body weight loss was observed. The patient had been complaining of night fever, night sweats, Raynaud phenomenon, left thigh superficial thrombophlebitis, and painless perimalleolar ulcers. Skin and bone marrow (BM) biopsies were performed. The ulcer biopsy revealed vasculitis with eosinophils, whereas the BM biopsy showed myelodysplastic features and noncaseating granuloma, and myeloculture was negative. In 2008, he developed hypothyroidism, recurrent sinusitis, ankle and knee swellings and nodular skin lesions (Figure 1). Antineutrophil cytoplasmic antibodies and antinuclear antibodies were within normal limits. He presented WBC 28,610/ μ L with marked eosinophilia (5,440/ μ L). BM aspirate and biopsy diagnosed MDS without excess blasts. Churg-Strauss syndrome was suspected, and after 3 months of prednisone (50 mg/day), he developed arthritis and sustained night fevers. Blood culture, arthrocentesis and thyroid biopsy were performed. *Mycobacterium kansasii*, a slow-growing mycobacterium, was identified in the bloodstream and synovial fluid. The thyroid histopathological analysis demonstrated chronic and acute granulomatous inflammation. Rifampicin, isoniazid and ethambutol were restarted in addition to clarithromycin for the next 2 years. Progressive spleen enlargement culminated in splenectomy in 2010. Portal thrombosis developed at the immediate post-operative period, and oral anticoagulant was administered. The histopathology features displayed granulomatous splenic inflammation, abscesses and central necrosis. In 2012, an increased WBC (39,080/ μ L) with eosinophilia (20,630/ μ L) and thrombocytosis (1,099,000/ μ L) were found. The nitro blue tetrazolium test, which is useful in diagnosing chronic granulomatous diseases, suggested a defect in phagocytosis, as it was positive in 38% of cells, and *FIP1L1/PDGFRa* rearrangement was negative, excluding hypereosinophilic

syndrome. He received hydroxyurea, dexamethasone and anti-NTM therapy containing moxifloxacin until 2015, when MDS refractory anaemia with excess blasts (12%) type II (RAEB II) was diagnosed. The entire *GATA2* exons were investigated and a heterozygous germline *GATA2* (c.1061 C>T; p.T354M) mutation was determined by Sanger sequencing of peripheral blood leukocytes (as in Supplemental Table1). The combination of results led to a final diagnosis of MonoMAC syndrome. The patient was treated with 3 days of idarubicin and 7 days of cytarabine chemotherapy and developed cutaneous and pulmonary filamentous fungal infection. A skin biopsy was performed and identified nonspecific spore and septate hyphae. He was treated with liposomal B amphotericin and voriconazole, received consolidation chemotherapy with high doses of cytarabine and was submitted to haematopoietic stem cell transplant (HSCT) with a myeloablative conditioning regimen from his HLA-identical brother. He died nine months after transplantation in October 2016, in other institution, so we are not sure of the exactly cause of death. *GATA2* gene sequencing (exon 5) was performed on his relatives, including his HSCT donor and was positive only in his two healthy sons, aged 21 and 28-year-old (Figures 2 and 3). The hotspot regions for acquired mutations exons 11-12 of *ASXL1* sequencing were also performed in the three *GATA2* mutant (*GATA2*^{mut}) subjects but were *ASXL1* Wild-Type (*ASXL1*^{WT}) as in Supplemental Table1.

Discussion and conclusions

MonoMAC syndrome was first described in 2010 in a group of 18 adult patients with disseminated NTM and other opportunistic infections(VINH et al., 2010). Half of the patients were diagnosed with MDS/AML, characterized by reduced numbers of circulating monocytes, B cell, and NK cells (VINH et al., 2010). Since then, patients with persistent cytopenia, even in the absence of diagnostic morphologic dysplasia, are suspected of having MonoMAC syndrome. In 2011, the MonoMAC syndrome was linked to 12 distinct *GATA2* mutations, including the T354M in the second zinc-finger domain that was also found in our patient (HSU et al., 2011). Although *GATA2* mutations might be found in a large number of sporadic cases, disease phenotype follows an autosomal dominant inheritance pattern (HSU et al., 2011). To date, nearly 380 *GATA2*-deficient patients have been reported, with an estimated prevalence of myeloid neoplasia of at least 75% (HIRABAYASHI et al., 2017). The most frequent clinical features described in *GATA2* deficient patients according to literature reviews and in our patient are summarized in Table 1. Non-infectious conditions also have been described in MonoMAC cases, especially endocrine, rheumatologic, and dermatological manifestations with hypothyroidism, panniculitis/erythema nodosum, arthritis and vasculitis. MonoMAC-associated MDS is usually hypocellular, shows atypical megakaryocytes, and fibrosis (CALVO et al., 2011). The 2016 revision of the World Health Organization classification for myeloid neoplasms has incorporated a subgroup of cases associated with germline mutations, that includes *GATA2*(ARBER et al., 2016). *GATA2*^{mut} is associated with MonoMAC syndrome despite of variable *GATA2* expression and initial presentation spanning from early childhood to late adulthood, with a median age of presentation of 32 years with viral, mycobacterial or fungal infections(VINH et al., 2010). The ubiquitous influence of NTM and other infections, accompanied by co-occurrence of monocytopenia, lymphopenia, neoplasia and a vast possibility of symptoms make the initial diagnosis of MonoMAC syndrome difficult for physicians. Clinical suspicion of MonoMAC syndrome is critical to make an early genetic diagnosis and to direct an appropriate management. Other gene mutations, such as mutations in *IL12R* or *IFN γ R* receptors or *STAT1*, are also important for differential diagnosis, however, CD4⁺, T cell and monocyte numbers are often normal in these conditions(WU; HOLLAND, 2015). Genetic counselling should be offered to at-risk individuals (THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC

MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM, 2016). The proband's father died prematurely from a coronary artery disease (CAD). Because *GATA2* has been functionally involved in the pathophysiology of thrombosis and CAD (CONNELLY et al., 2006), we hypothesized that *GATA2*^{mut} would be present in the first generation of this patient's family, but we didn't have biological material to test him. In healthy carriers of *GATA2* mutations, antimicrobial prophylaxis with azithromycin and immunization against human papilloma virus (HPV) are suggested as follow-up treatments (THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM, 2016). Other recommendations at diagnosis are screening for HPV infection and HPV-related cervical, head and neck and anogenital cancer as well as baseline pulmonary evaluation (THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM, 2016). It is also important to educate patients and physicians about the increased risk of opportunistic infections, especially NTM. Vigilant BM monitoring, immunoglobulin replacement when low or with recurrent infections, screening for congenital deafness and avoidance of ototoxic drugs are all recommended (THE UNIVERSITY OF CHICAGO HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES CANCER RISK TEAM, 2016). Even though characterized as autosomal dominant inheritance, *GATA2* mutations are germline heterozygous and might have incomplete penetrance (DONADIEU et al., 2018). Allogeneic HSCT has been curative for haematopoietic disease in some cases using nonmyeloablative conditioning regimens [12]. Among individuals with *GATA2* deficiency progressing to MDS/AML, acquired secondary mutations in the *ASXL1* that encoding chromatin-binding protein ASXL1 are detected in approximately 30% of cases, despite being negative in our patient (data not shown) (BODOR et al., 2012). The prognosis after MDS/AML diagnosis appears to be poor, with the best outcomes reported among individuals undergoing allogeneic HSCT in the early stages of the disease, with an overall survival rate of 57% at 36 months (SPINNER et al., 2014). In conclusion, we presented a patient with long history of NTM infection, MDS, monocytopenia, autoimmune and thrombotic phenomena, hypothyroidism and carrying a *GATA* mutation. The delay in diagnosis of MonoMAC syndrome is explained by the diversity of clinical features and lack of medical knowledge by the period of disease presentation. With this report, we hope to call attention to the importance of early diagnosis of this immunodeficiency syndrome. Genetic counselling, clinical management, and HSCT in early disease stages can be safely offered.

Abbreviations

NTM: disseminated non-tuberculosis mycobacterium; IL-12: interleukin-12; IFN- γ : interferon- γ ; MDS: myelodysplastic syndrome; AML: acute myeloid leukaemia; NK: natural killer; WBC: white blood cell; BM: bone marrow; RAEB2: anaemia with excess blasts type 2; HSCT: haematopoietic stem cell transplant; CAD: coronary artery disease; HPV: human papilloma virus.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Informed consent was obtained from the case in accordance with the Declaration of Helsinki and ethics was approved by participating centers.

Consent to publish

Written informed consent for publication of the patient's clinical details and molecular data was obtained and is available for the journal.

Availability of data and materials

The clinical documentation is available to the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Funding

This work was partially supported by *Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ*, [grant#218785/2015 to D.A.M.C.]; *Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo-FAPESP* [grants # 2013/08135-2 and 2014/26379-9 to R.T.C]; M.S.P.O. and R.M.Z.O. are supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq* [#301594/2015-5 and # 394976/2013-0, respectively].

Author's contributions

D.P.M.A., designed the study, collected and analysed clinical data; I.F.V. and L.K.M.S.R. assisted the patient and provided the samples for genetic studies; D.P.M.A., F.G.A., F.V.S.B. and G.B. performed genetic tests; M.S.P.O. and R.T.C. supervised the study and reviewed the manuscript; D.A.M.C. and R.M.Z.O provided funding and revised the manuscript. All authors contributed significantly to the work, have seen and approved the manuscript and its submission.

Acknowledgments

The authors thank the patient relatives who made samples available, provided written informed consent and helped with information, as well as the many physicians who provided patient data and clinical details in the course of treatment, especially Amanda Marques and Mariana Mazzi; the pathologists Alessandra Nascimento, Sergio Romano and Roberto Arcuri, who provided histopathological pictures; and the researcher Elizabeth P. Sampaio, who kindly revised this manuscript.