



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**Utilização do exoma na identificação de variantes genéticas relacionadas as
Imunodeficiências Primárias (PIDs)**

Juliana Teixeira Dutra

**Rio de Janeiro
2019**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**Utilização do exoma na identificação de variantes genéticas relacionadas as
Imunodeficiências Primárias (PIDs)**

Juliana Teixeira Dutra

Projeto de Dissertação apresentada à Pós-
graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da
Criança e da Mulher como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Drº Zilton Vasconcelos

**Rio de Janeiro
2019**

CIP - Catalogação na Publicação

Dutra, Juliana.

Utilização do exoma na identificação de variantes genéticas relacionadas as Imunodeficiências Primárias (PIDs) / Juliana Dutra. - Rio de Janeiro, 2019. 96 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2019.

Orientador: Zilton Farias Meira de Vasconcelos.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. imunodeficiências primárias. 2. sequenciamento de nova geração. 3. sequenciamento total de exoma. 4. variantes genéticas. 5. sequenciamento de Sanger. I. Título.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a todos, pessoal da plataforma e da bioinformática de Manguinhos, do sequenciamento do LNCC, do laboratório que trabalho, todos aqueles que se envolveram no projeto ao longo desses dois anos e reservaram um tempo pra me ajudar de alguma forma, seja dando incentivo, apoio ou até mesmo nos ensinamentos de alguma técnica nova.

Além disso, gostaria de agradecer ao meu orientador, Zilton Vasconcelos, pela confiança de ter me dado esse projeto e pelo apoio que me deu em toda a minha trajetória dentro do IFF.

Em especial, gostaria de agradecer ao Leonardo Gomes, que foi meu braço nesse projeto, me ajudando em todos os momentos de dificuldade, naqueles momentos que pensei em desistir ou até mesmo naqueles que achei que talvez não fosse capaz de fazer alguma técnica ou de entender.

Gostaria de agradecer a minha mãe pela paciência, dos dias que cheguei estressada, cansada e nunca deixou de me falar palavras de incentivo, de me apoiar e acreditar em mim.

E por fim, a todo núcleo de financiamento, CNPq, FAPERJ, que me permitiram fazer esse projeto.

Lista de Figuras

Fig.01. Prevalência estimada das classificações das Imunodeficiências Primárias, segundo a <i>International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency (IUIS)</i> -----	17
Fig.02. “10 sinais de alertas para Imunodeficiência Primária, adaptado da Fundação Jeffrey Modell em colaboração com a Cruz Vermelha Americana -----	20
Fig.03. Princípios da metodologia do <i>Illumina</i> -----	27
Fig.04. Valores referentes ao score de qualidade de que uma corrida pode ter, indicando a probabilidade de 1 base errada dentre uma certa quantidade e a acurácia -----	28
Fig 05. Distribuição dos 34 pacientes nas unidades de saúde participantes do RECIP, separados por sexo-----	33
Fig 06. Distribuição dos pacientes de acordo com a idade que iniciaram os primeiros sintomas -----	34
Fig 07. Distribuição dos pacientes de acordo os 10 sinais de alerta -----	34
Fig 08. Representação do número total de variantes encontradas de acordo com o filtro de bioinformática utilizado-----	36
Fig 09. Resultado do Sequenciamento de Sanger do gene <i>BTK</i> da mãe, do paciente e da irmã - -----	41
Fig. 10. Resultado do Sequenciamento de Sanger do gene <i>WAS</i> da mãe e do filho -----	42
Fig. 11. Representação do heredograma da família do paciente e do resultado da monossomia do cromossomo 7 pelo cariótipo -----	43
Fig. 12. Resultado do DHR do paciente, da mãe (mother), da irmã (sister) e de um controle negativo (control), representação do desenho dos primers (forward e reverse) e do resultado do PCR -----	43
Fig. 13. Resultado do Sequenciamento de Sanger do gene <i>GATA2</i> da mãe do CASO 05	45
Fig. 14. Resultado do PCR em Tempo Real da amplificação dos genes <i>IL12B</i> (A) e <i>C6</i> (B) localizados no cromossomo 5, do paciente, da mãe e do pai -----	46
Fig. 15. Resultado do Sequenciamento de Sanger do gene <i>MEFV</i> da mãe e do pai -----	47

Lista de Tabelas

Tabela 01. Representação do resultado dos dados brutos de saída do sequenciador, como arquivo fastq no formato de texto e separados por pacientes, contendo informações sobre as reads (sequências curtas de ≈ 100 bases nucleotídicas) e sobre a qualidade (quality score) do sequenciamento para cada nucleotídeo sequenciado -----	35
Tabela 02. Listagem de variantes genéticas encontradas como patogênicas em 10 pacientes. -- -----	37
Tabela 03. Casos com mutações encontradas no gene BTK, caracterizando fenótipos clínicos de Agamaglobulinemia ligada ao X -----	40
Tabela 04. Caso com mutação encontrada no gene WAS, caracterizando fenótipo clínico de Wiskott-Aldrich -----	41
Tabela 05. Caso com mutação encontrada no gene CYBB, caracterizando fenótipo clínico de Doença Granulomatosa Crônica -----	42
Tabela 06. Caso com mutação encontrada no gene CD40LG, caracterizando fenótipo clínico de Síndrome de Hiper-IgM do tipo I-----	44

Lista de Quadros

Quadro 1. Classificação das Imunodeficiências Primárias, segundo a <i>Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency</i> , dados esid.org -----	16
Quadro 2. Principais exames de primeira linha para a investigação laboratorial de PID -----	21
Quadro 3. Protocolos de triagem para PID, segundo ESID -----	21

Resumo

As imunodeficiências primárias (PIDs) são doenças genéticas que têm como principal característica alterações do sistema imune, caracterizadas por deficiências de desenvolvimento e/ou função desse sistema, levando o paciente à maior suscetibilidade às infecções de repetição, doenças auto-imunes e/ou neoplasias. Estão agrupadas como um único grupo de doenças e a sua classificação, varia de acordo com a natureza da deficiência imunológica subjacente, podendo ser por deficiências de anticorpos, imunodeficiências combinadas, desordens de células fagocitárias, entre outras. Estimam-se sua incidência entre 1:2.000 crianças nascidas vivas e o diagnóstico precoce dessas doenças, é essencial para a redução da morbidade e mortalidade desses pacientes. A identificação precoce e o tratamento eficiente das PIDs são pontos-chaves para a sobrevivência e melhor qualidade de vida dos pacientes imunodeficientes, modificando de maneira decisiva o prognóstico destas doenças. Na busca de um diagnóstico mais rápido e eficaz, esse trabalho dispôs de uma análise multigênica de pacientes com pelo menos 1 dos 10 sinais de alerta para PID. Foram sequenciados e analisados 34 casos, sendo 25 do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Utilizou-se ferramentas de nova geração e filtros específicos, baseados nos resultados do sequenciamento total do exoma, possibilitando assim, o diagnóstico de 7 casos de Agamaglobulinemia (gene BTK), 2 casos de Wiskott-Aldrich (gene WAS), 1 caso de Doença Granulomatosa Crônica (gene CYBB), 1 caso de Síndrome de Hiper-IgM do tipo I (gene CD40LG) e a investigação parental dos 23 casos sem diagnóstico concluído. Esses achados foram confirmados através do Sequenciamento de Sanger, considerado como padrão ouro para o estudo.

Palavras-chave: imunodeficiências primárias, sequenciamento de nova geração, sequenciamento total de exoma, variantes genéticas, sequenciamento de Sanger.

¹Orientador: Dr^o Zilton Farias Meira de Vasconcelos, PhD

Abstract

Primary immunodeficiencies are genetic diseases that have as main characteristic alterations of the immune system, characterized by deficiencies of development and / or function of this system, leading the patient to greater susceptibility to recurrent infections, autoimmune diseases and / or neoplasias. They are grouped as a single group of diseases and their classification varies according to the nature of the underlying immunological deficiency, and may be due to antibody deficiencies, combined immunodeficiencies, phagocytic cell disorders, among others. Their incidence is estimated between 1: 2000 live births and the early diagnosis of these diseases is essential to reduce the morbidity and mortality of these patients. Early identification and efficient treatment of PIDs are key points for the survival and better quality of life of immunodeficient patients, modifying the prognosis of these diseases in a decisive way. In the search for a faster and more effective diagnosis, this work had a multigenic analysis of patients with at least 1 of the 10 warning signs for PID. Thirty-four cases were sequenced and analyzed, of which 25 were male and 9 were female. New generation tools and specific filters were used based on the results of the complete exome sequencing, allowing the diagnosis of 7 cases of agammaglobulinemia (BTK gene), 2 cases of Wiskott-Aldrich (WAS gene), 1 case of disease Chronic Granulomatose (CYBB gene), 1 case of Type I Hyper-IgM Syndrome (CD40LG gene) and parental investigation of the 23 cases without a completed diagnosis. These findings were confirmed using the Sanger Sequencing, considered the gold standard for the study.

Keywords: primary immunodeficiencies, new generation sequencing, total exome sequencing, genetic variants, sanger sequencing.

¹Orientador: Dr^o Zilton Farias Meira de Vasconcelos, PhD

Sumário

1.	Introdução-----	11
2.	Pergunta 13	
3.	Hipótese 13	
4.	Justificativa-----	13
5.	Objetivo Geral-----	14
6.	Objetivos Específicos-----	14
7.	Referencial Teórico-----	15
7.1.	Imunodeficiências Primárias: Definição e Classificação-----	15
7.2.	Imunodeficiências Primárias: Primeiros relatos-----	16
7.3.	Imunodeficiências Primárias: Avanço nas descobertas-----	17
7.4.	Investigação Clínico-Laboratorial-----	18
7.5.	Investigação Molecular – Sequenciamentos de DNA-----	21
7.6.	Sequenciamento Total do Exoma (WES)-----	22
7.7.	Variantes Genéticas e Bancos de Dados-----	23
7.8.	Método do Sequenciamento WES – Illumina-----	26
8.	Metodologia-----	28
8.1.	Tipo de Estudo e Aspectos Éticos-----	28
8.2.	População e Local do Estudo-----	28
8.3.	Critérios de Inclusão-----	29
8.4.	Critérios de Exclusão-----	29
8.5.	Coleta de Amostras para o sequenciamento-----	29
8.6.	Extração de DNA-----	29
8.7.	Dosagem de DNA - Thermo Scientific NanoDrop™ 2000c-----	30
8.8.	Dosagem de DNA – Invitrogen Qubit™ 4 Fluorometer-----	30
8.9.	Sequenciamento de Nova Geração - Plataforma Illumina TruSeq® 500-----	30
8.10.	Utilização de Filtros Específicos-----	31
9.	Resultados-----	32
9.1.	Características da População Estudada – Distribuição por sexo e unidade de saúde---	32
9.2.	Características da População Estudada – Início dos sintomas e os 10 sinais de alerta-	32
9.3.	Dados Brutos – Plataforma Illumina NextSeq® 500/550 – Formato (.fastq)-----	34
9.4.	Etapa de Filtros Específicos-----	35
9.5.	Análise das variantes – Segundo a Predição-----	36

	x
9.6. Análise das variantes – Achados incertos -----	38
9.7. Casos Diagnosticados-----	39
9.7.1. Discussão de casos de pacientes com fenótipo clínico de Agamaglobulinemia -----	39
9.7.2. Discussão de casos de pacientes com fenótipo clínico de Wiskott-Aldrich (WASP) ---	40
9.7.3. Discussão de casos de pacientes com fenótipo clínico de Doença Granulomatosa Crônica (DGC) -----	41
9.7.4. Discussão de casos de pacientes com fenótipo clínico de Síndrome de Hiper-IgM do tipo I	43
9.7.5. Discussão de alguns casos ainda em investigação parental -----	44
10. Discussão-----	47
11. Conclusão -----	48
12. Referências-----	49
13. Anexo 01 -----	53
14. Anexo 02 -----	57
15. Anexo 03 -----	60
16. Apêndice 01 -----	64

1. Introdução

O sistema imunológico é o conjunto de moléculas, células, tecidos e órgãos que são responsáveis pela defesa do organismo contra agentes estranhos, através de respostas coordenadas e coletivas, que tem como finalidade manter a homeostasia dinâmica do organismo de todos os seres vivos (1,2). Algumas doenças genéticas são capazes de gerar diversas falhas ou defeitos no sistema imune, sendo este comprometido de forma funcional ou numérica. Essas doenças, que comprometem o funcionamento do sistema imunológico, são coletivamente chamadas de Imunodeficiências Primárias (PIDs, do inglês *Primary Immunodeficiencies Diseases*) (3,4).

As PIDs, são consideradas um grupo heterogêneo de doenças genéticas raras e hereditárias, que atualmente compreende mais de 354 doenças clinicamente diferentes. Essas doenças, geralmente começam a desenvolver os seus primeiros sintomas na infância, influenciando negativamente na qualidade de vida desses pacientes e estão associadas a mutações em genes que governam diferentes partes da resposta imune, celular ou humoral (5-7). As intercorrências e consequências, são resultados de mutações responsáveis pela completa ausência, disfunção ou deficiência no desenvolvimento das células hematopoiéticas, que comprometem assim, as respostas às infecções ou malignidade (8,9).

Em geral, as PIDs são doenças monogênicas, com defeitos genéticos específicos que seguem os princípios de heranças mendeliana (9). Essas doenças possuem alta variedade quanto ao fenótipo clínico e a sua classificação é baseada na natureza da deficiência imunológica subjacente. Por serem de caráter genético e hereditário, podem afetar várias crianças de uma mesma família e em casos de casamentos consanguíneos a sua incidência é aumentada (10). Em geral, hoje são conhecidos mais de 300 genes, distribuídos ao longo dos 23 pares de cromossomos associados as imunodeficiências primárias (9,10).

Apesar de serem consideradas doenças genéticas raras, sua incidência varia de 1:2.000 a 1:100.000 crianças nascidas vivas (3,6), tendo na maioria dos quadros clínicos uma maior suscetibilidade às infecções, sendo elas infecções recorrentes ou superinfecções. Atualmente no Brasil, esses pacientes são de alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS), devido a necessidade de internações prolongadas em CTI pediátricos, exames complementares e terapia que perduram ao longo de toda a vida do paciente, como por exemplo, o transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCs, do inglês Hematopoietic Stem Cells) ou tratamentos paliativos, como a imunoglobulina intravenosa ou interferon (10). Além de aumentar a frequência de infecções de repetição, geralmente esses erros inatos do sistema imune, apresentam maior incidência de autoimunidade e doenças

malignas ao longo da vida (11,12).

Do ponto de vista da saúde pública, toda criança que apresenta um quadro clínico de infecções de repetição, deve ser avaliada cuidadosamente, pois segundo dados referentes a faixa etária pediátrica, 50% desses pacientes são saudáveis, 30% são alérgicos, 10% apresentam infecções graves e 10% são portadores de imunodeficiência, seja ela primária ou secundária (3,6). Devido a similaridade dos sintomas e da sobreposição dos fenótipos clínicos, as PIDs têm como principal desafio para os pediatras que atuam nessa área, a dificuldade no diagnóstico. Geralmente o diagnóstico desses pacientes é tardio e, muitas das vezes, leva os pacientes afetados a óbito antes mesmo de uma investigação clínica. É de extrema importância a atuação desses médicos no início da investigação dessas doenças, determinando assim, um tratamento empírico em que o uso dos antibióticos seja baseado na sintomatologia do paciente (10).

Na busca de reduzir o tempo de investigação de forma concomitante, multidisciplinar dos achados laboratoriais com os achados clínicos, esse projeto teve como finalidade utilizar o sequenciamento total do exoma (WES do inglês, *whole exome sequencing*) como ferramenta para identificar as variantes genéticas localizadas nos genes associados as PIDs. Dessa forma, foi possível analisar e verificar o poder de diagnóstico dessa ferramenta, selecionando os possíveis genes candidatos como responsáveis pelo fenótipo clínico de 34 pacientes, comprovando os achados através do sequenciamento de Sanger, padrão ouro. Esse projeto visou, fazer investigação laboratorial, mas ter resultados individuais e específicos para cada caso, sendo possível intervir, futuramente, com tratamentos específicos diminuindo as taxas de óbito das crianças afetadas.

2. Pergunta

O WES pode ser utilizado como ferramenta para identificar variantes genéticas de alta qualidade, a fim de selecionar genes considerados como potenciais candidatos pro desenvolvimento do fenótipo clínico de 34 pacientes com suspeitas clínicas de PIDs?

3. Hipótese

É possível utilizar o WES como potencial selecionador dos genes candidatos como responsáveis pelo quadro clínico de 34 pacientes com suspeitas clínicas de PIDs. Através da identificação de variantes genéticas, localizadas em genes relacionados com essa doença, de forma concomitante com o quadro clínico desses pacientes.

4. Justificativa

As PIDs, são consideradas doenças genéticas, e atualmente estão descritos mais de 300 genes que sofrem mutações e comprometem o sistema imunológico com manifestações clínicas adversas e de forma hereditária. Embora a PID seja considerada uma doença geneticamente rara, são estimadas 6 milhões de pessoas no mundo em contato com essa doença, sejam elas afetadas ou portadores. Entretanto, apenas 2% dessas pessoas foram investigadas e têm diagnóstico adequado. As PIDs, possuem um padrão de herança que varia, podendo ser ligada ao cromossomo X, ser autossômica recessiva ou autossômica dominante e por ter caráter genético, tem maiores chances de afetar mais de um filho na família e mais ainda, em casais consanguíneos (6,7).

Essas doenças, geralmente, começam a desenvolver seus primeiros sintomas na infância e a faixa etária de identificação da doença varia desde os primeiros meses de vida até a terceira idade (5-7). Seus principais sintomas são infecções de repetição e necessidade de intervenções imediatas, como internações prolongadas, transplante de medula óssea ou antibioticoterapia. Os testes de diagnóstico molecular existentes podem ser inconclusivos devido à similaridade dos sintomas e sobreposição com os fenótipos clínicos (11).

Devido a esse quadro, é necessária, uma investigação de forma concomitante dos quadros clínicos de cada paciente, com análise genética através do uso de uma ferramenta de nova geração: o sequenciamento total do exoma (WES do inglês, *whole exome sequencing*). O WES, sequencia apenas regiões codificadoras de proteínas dentro do genoma total. Esse projeto tem como objetivo utilizar essa ferramenta para analisar e verificar o seu poder de diagnóstico em 34 pacientes com

suspeitas clínicas de PIDs. Determinar o tipo de PID o mais rápido possível, possibilita uma melhor conduta terapêutica ao paciente, minimizando intercorrências graves como internação prolongada no CTI pediátrico, aumentando a expectativa de vida desses pacientes (10). Além disso, foram desenhados primers específicos para a região desses genes encontrados e, como padrão ouro, foi utilizado o sequenciamento de Sanger.

5. Objetivo Geral

Selecionar através do sequenciamento total do exoma e de filtros de bioinformática específicos, os possíveis genes candidatos para o fenótipo clínico de 34 pacientes com suspeitas clínicas de PID.

6. Objetivos Específicos

- i. Definir a melhor estratégia de análise para identificação de variantes clinicamente relevantes no contexto de imunodeficiências primárias;
- ii. Descrever o número de variantes patogênicas encontradas na população estudada;
- iii. Descrever o número de variantes de significado incerto encontradas na população estudada;
- iv. Estabelecer as variantes de significado incerto que devem ser consideradas como candidatos potencialmente patogênicas a partir de informações clínicas;
- v. Avaliar o WES como potencial ferramenta diagnóstica para PID.

7. Referencial Teórico

7.1. Imunodeficiências Primárias: Definição e Classificação

As imunodeficiências primárias (PID), estão agrupadas em um único grupo heterogêneo de doenças genéticas raras e são definidas como distúrbios congênitos que afetam o desenvolvimento e/ou a funcionalidade das células do sistema imunológico. Geralmente são resultados de defeitos genéticos, através de alterações em genes que codificam a resposta imunológica, podendo afetar um ou mais componentes desse sistema (13,14).

Essas patologias, na maioria das vezes, são monogênicas, ocorrem em apenas um gene, e a sua transmissão é hereditária, com carácter, na maioria das vezes, mendeliano simples e variação de fenótipos, em alguns casos, devido a interações genéticas ou ambientais. As PIDs, têm como principal quadro clínico uma maior suscetibilidade à patógenos oportunistas, com episódios recorrentes de infecções de repetição, doenças autoimunes e neoplasias (15). Geralmente essas doenças, iniciam-se na infância, e na ausência de um diagnóstico precoce pode influenciar negativamente na qualidade de vida desses pacientes, aumentando assim a taxa de morbidade e mortalidade, sendo assim de extrema importância a atuação dos pediatras na suspeita de tais doenças (16).

Há várias classificações para as PIDs (Quadro 1), segundo a *Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency (ESID)* e a sua classificação é dada de acordo com o primeiro componente do sistema imunológico afetado:

Deficiências de células T e B (combinadas)
Deficiências predominantemente de anticorpos
Defeitos congênitos do número e/ou função dos fagócitos
Deficiência do complemento
Defeitos da imunidade inata
Doenças autoinflamatórias
Defeitos na regulação imunológica
Outras síndromes bem definidas com Imunodeficiência

Quadro 1. Classificação das Imunodeficiências Primárias, segundo a *Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency*, dados **esid.org**.

Na maioria das vezes, a classificação das PIDs está associada ao tipo de infecção e o componente afetado do sistema imunológico, causando homogeneidade quanto a clínica e o fenótipo dos pacientes com PID bem definida. Apesar de serem consideradas doenças genéticas raras, a sua incidência varia de 1:2.000 a 1:10.000 crianças nascidas vivas e a sua prevalência é bastante numerosa e diversificada, variando de acordo com o tipo de imunodeficiência primária, com o país e o grupo populacional presente. Segundo a *International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency (IUIS)*, cada classificação tem uma prevalência estimada diferente (Fig. 01) (19).

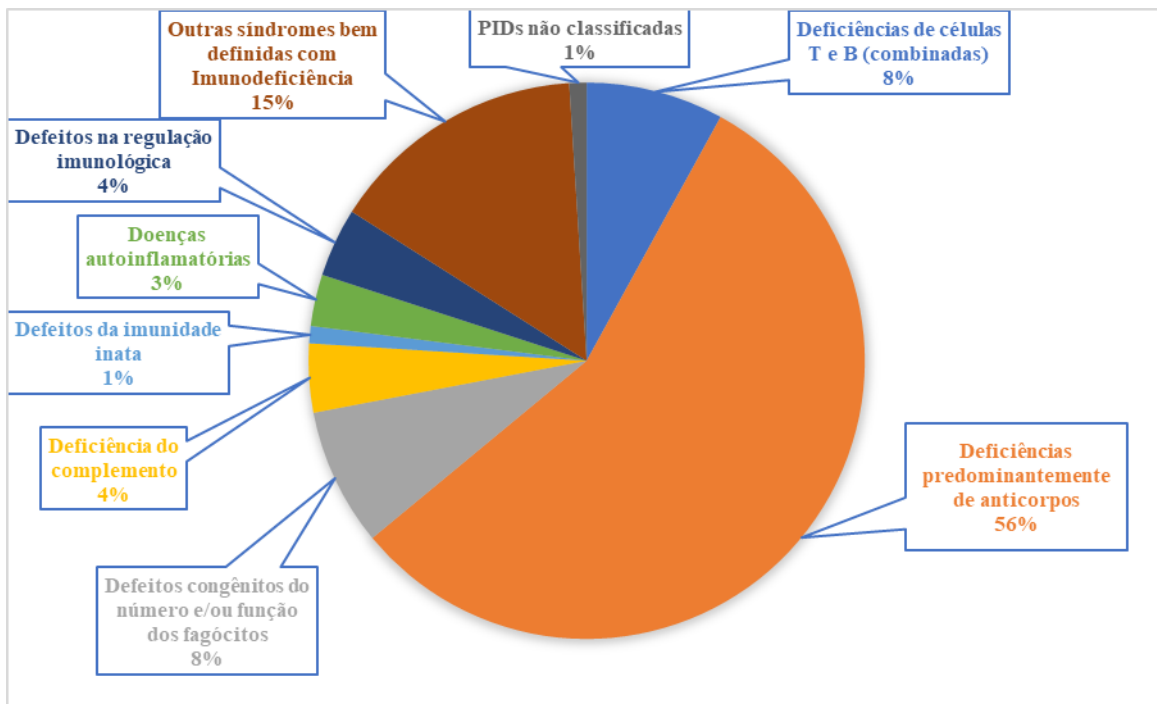


Fig. 01. Prevalência estimada das classificações das Imunodeficiências Primárias, segundo a *International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency (IUIS)*.

7.2. Imunodeficiências Primárias: Primeiros relatos

O primeiro relato de PID, foi no ano de 1952, que recebeu o nome de Agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X, descoberta por Bruton, que descreveu o caso de um menino de 8 anos que apresentava constantes quadros clínicos de infecções de repetição e quadros simultâneos de sepse causadas por diferentes cepas de pneumococo. Esse quadro clínico, resultou da redução dos níveis de todas as classes de imunoglobulinas, por não apresentar linfócito B na circulação e nos órgãos linfoides periféricos. Posteriormente, essa PID, foi associada a uma interrupção no processo de maturação dos linfócitos B, causado por um defeito genético no gene que codifica a molécula BTK restringindo a sua expressão no processo de maturação (11).

Após o primeiro relato de PID, 19 anos depois, em 1971, outra história ficou bastante conhecida, a de um menino nascido no Texas, David Vetter, que nasceu com um tipo grave de PID. Sua história foi acompanhada pela mídia e ficou conhecida como a doença do menino bolha (Bubble Boy Disease), devido ao seu modo de vida. David Vetter, nasceu com a Imunodeficiência Severa Combinada (SCID, do inglês Severe Combined Immunodeficiency), comprometendo gravemente a maturação das células T, B e/ou NK. Nessa patologia o paciente apresenta pouca quantidade ou ausência total de linfócitos T, associado ou não, a deficiências em linfócitos B e células NK. Uma criança ao nascer com essa doença, após sofrer exposição aos microrganismos do meio ambiente, apresenta infecções graves, como pneumonia e meningite, mesmo com patógenos facilmente combatidos por indivíduos imunocompetentes. Devido a essa complicação e a dificuldade de determinar o melhor tratamento para a doença naquela época, o Bubble Boy, foi colocado em uma bolha de plástico estéril produzida especialmente pela NASA (3,20).

7.3. Imunodeficiências Primárias: Avanço nas descobertas

Em geral, as PIDs são doenças monogênicas, com defeitos genéticos específicos que seguem os princípios de heranças mendeliana (1,2). Essas doenças possuem alta variedade quanto ao fenótipo clínico e a sua classificação é baseada na natureza da deficiência imunológica subjacente. Por serem de caráter genético e hereditário, podem afetar várias crianças de uma mesma família e em casos de casamentos consanguíneos a sua incidência é aumentada (2,3). Em geral, hoje são conhecidos mais de 300 genes, distribuídos ao longo dos 23 pares de cromossomos associados as imunodeficiências primárias (9,10).

Em 1970, foi constituído um comitê sob responsabilidade da Organização Mundial de Saúde (OMS) para catalogar e organizar as imunodeficiências primárias. Anos depois, esse comitê foi assumido pela União Internacional de Sociedades Imunológicas (IUIS), composto por médicos imunologistas que se reúnem periodicamente na busca de atualizar novas descobertas relacionadas as PIDs, como, erros imunológicos e novos genes (6).

Os estudos genômicos para PID, vêm evoluindo rapidamente e em 2015, foi publicada pela IUIS uma atualização com novos achados, relatando 34 novos defeitos genéticos, totalizando 388 genes como possíveis responsáveis para essas patologias. Ainda pela IUIS, em 2017, foi publicada uma atualização segundo os defeitos imunológicos associados a essas patologias, sendo categorizados e listados 354 erros inatos de imunidade (5).

Devido ao crescimento e aumento da complexidade do sistema imunológico, englobando

manifestações consideradas como graves para a saúde, como malignidade, desregulação do sistema imunológico, autoinflamação, autoimunidade e no aumento no número de defeitos genéticos que acometem o comprometimento desse sistema, vem sendo de extrema importância para os especialistas o diagnóstico precoce e rápido para essas patologias, sendo possível intervir com uma conduta terapêutica direcionada, melhorando a qualidade de vida desses pacientes e diminuindo assim, as taxas de morbidade e mortalidade (7).

7.4. Investigação Clínico-Laboratorial

Devido à grande similaridade dos sintomas clínicos com outras doenças infecciosas, do ponto de vista da saúde pública, toda criança que apresenta um quadro clínico de infecções de repetição, deve ser avaliada cuidadosamente, pois segundo dados referentes a faixa etária pediátrica, 50% desses pacientes são saudáveis, 30% são alérgicos, 10% apresentam infecções graves e 10% são portadores de imunodeficiência, seja ela primária ou secundária (3,6). As PIDs, compreendem mais de 300 desordens imunológicas, clinicamente diferentes e apesar da maioria iniciar-se na infância, algumas iniciam-se após alguns meses ou anos de vida (7).

Devido ao quadro clínico ser caracterizado inicialmente pela predisposição a infecções de repetição, é indispensável o histórico clínico-laboratorial do paciente suspeito, visando dimensionar a competência imunológica do mesmo. Sendo possível identificar a virulência dos patógenos, o sítio de infecção, a gravidade, a persistência ou a resistência à alguma conduta terapêutica, sugerindo a natureza do defeito imunológico (9,10).

Após primeiros relatos, foi preciso estabelecer estratégias de rastreamento para conseguir chegar a um diagnóstico mais eficiente. Sendo assim, em 2009, foi estabelecido, a priori, pela Jeffrey Modell Foundation em colaboração com a Cruz Vermelha Norte Americana os “10 sinais de alerta para PID” (Fig. 02) (21-23). Nesses sinais de alerta estão incluídas infecções de repetição (otites, sinusites, pneumonias), asma grave, doença autoimune, infecções graves (septicemia, meningite, osteoartrite), presença de abscessos cutâneos profundos ou em órgãos internos, atraso no desenvolvimento estatura-ponderal da criança, eventos adversos ao BCG ou infecções por micobactérias, infecções na mucosa ou pele, necessidade de tratamento prolongado de antibioticoterapia e histórico família de imunodeficiência primária (23).

10 Sinais de alerta para a Imunodeficiência Primária - IDP

<p>1</p>  <p>Quatro ou mais otites no último ano</p>	<p>2</p>  <p>Duas ou mais infecções de seios paranasais (sinusite) graves em um ano. Asma grave, doença auto-imune</p>	<p>3</p>  <p>Abscessos em órgãos ou abscessos cutâneos profundos recorrentes.</p>
<p>4</p>  <p>Duas ou mais pneumonias no último ano.</p>	<p>5</p>  <p>Dificuldade para a criança ganhar peso e crescer.</p>	<p>6</p>  <p>Evento adverso ao BCG e/ou infecção por micobactéria.</p>
<p>7</p>  <p>Aftas persistentes na boca, infecções micóticas na mucosa ou pele (monilíase/ candidíase).</p>	<p>8</p>  <p>Necessidade de receber antibióticos endovenosos para eliminar infecções.</p>	<p>9</p>  <p>Dois episódios de infecção sistêmica grave, por exemplo: septicemia, meningite e osteoartrite.</p>
<p>10</p>  <p>Antecedentes familiares de imunodeficiência primária.</p>		

Fig.02. “10 sinais de alertas para Imunodeficiência Primária, adaptado da Fundação Jeffrey Modell em colaboração com a Cruz Vermelha Americana.

Caso o paciente tenha 1 ou mais desses sinais clínicos de alerta, recomenda-se uma investigação laboratorial por meio de exames de primeira linha (Quadro 2), de baixo custo e de fácil acesso (8).

Hemograma Completo e contagem diferencial de células
Dosagem do nível sérico das Imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG e IgE)
Quantificação de subpopulações de linfócitos CD3, CD4, CD8, CD19 e CD20
Dosagem do complemento hemolítico total (CH50)
Velocidade de sedimentação e/ou Proteína C-Reativa (PCR)

Quadro 2. Principais exames de primeira linha para a investigação laboratorial de PID.

Segundo a ESID, existem 4 principais tipos de protocolos de triagem para PID (Quadro 3), que restringem e possibilitam a identificação do(s) acometimento(s) no sistema imunológico do paciente. Algumas causas de secundárias de Imunodeficiências, devem ser descartadas desde o início, como por exemplo, tuberculose, HIV e fibrose cística (24).

Protocolo 1: Investigação de deficiência de produção de anticorpos ou de complemento
Protocolo 2: Investigação de deficiência de linfócitos T
Protocolo 3: Investigação de neutropênias e de deficiência de fagócitos
Protocolos específicos

Quadro 3. Protocolos de triagem para PID, segundo ESID.

Apesar dos testes de triagem serem pouco específicos, são amplamente utilizados pelos imunologistas clínicos durante a avaliação da competência na imunidade humoral e/ou celular nos pacientes suspeitos. Além dessas avaliações, alguns testes mais específicos, auxiliam no processo diagnóstico, como antibiograma, cultura de bactérias, bioquímica geral, sorologia para antígenos vacinais (pneumococo, Hemophylus influenza tipo b, rubéola e antígeno de superfície do vírus de hepatite B), sorologia para HIV, teste de redução do nitroblue tetrazolium (NBT) ou dihidrorrodamina (DHR), testes cutâneos de hipersensibilidade tardia com PPD e candidina (levedurina) e Rx simples de tórax PA e perfil (para avaliar presença de sombra tímica) (8).

7.5. Investigação Molecular – Sequenciamentos de DNA

A descoberta de novas doenças e genes associados a PID, em especial a identificação dos defeitos genético-moleculares das PID ocorreu a passos muito rápidos nas últimas décadas graças ao mapeamento do genoma humano e avanço nas tecnologias de sequenciamento (25).

Em torno de 1990, foi iniciado formalmente o Projeto Genoma Humano, coordenado por 13 anos Departamento de Energia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, com o objetivo de mapear todo o genoma humano, estimando 25.000 genes e 3,2 bilhões de pares de bases que compõem o genoma do *Homo Sapiens*. Todo esse processo de mapeamento, só foi possível devido as técnicas de sequenciamento de DNA (26).

Desde a década de 70 as ferramentas de mapeamento do genoma completo e o desenvolvimento dos primeiros protótipos de sequenciadores semiautomáticos de DNA, permitiram um conhecimento mais amplo sobre as sequencias genéticas e as suas funções moleculares. Essas descobertas permitiram fornecer informações de extrema importância para o rastreamento de patologias, indicando precocemente o grau de risco dessas doenças em pessoas saudáveis e em seus descendentes (25,26).

A técnica convencional e considerada, até hoje, como padrão ouro, é o sequenciamento de Sanger, que utiliza uma metodologia baseada, na amplificação de fragmentos de interesse do DNA e a análise dos pares de base desses fragmentos, na busca de alguma alteração genética, sendo ela uma mutação específica para a suspeita clínica da doença no paciente (10). Sendo assim, essa ferramenta foi considerada um método prático e confiável que se espalhou mundialmente e é utilizado até hoje (27).

Embora seja considerada prática e confiável, essa metodologia apresenta limitações em projetos de alta demanda, pois permitiu a análise de fragmentos amplificados de interesse do DNA de apenas um paciente e a análise de individual de um gene associado a doença genética de interesse (26). Como uma solução para essas limitações, começaram a ser comercializados em 2005, novas tecnologias de sequenciamento, os Sequenciamentos de Nova Geração, que permitiram um conhecimento mais amplo sobre a sequência genética e a análise de vários genes ao mesmo tempo, em menor tempo (28).

Os sequenciamentos de Nova Geração (NGS do inglês, *Next-Generation Sequencing*), são processos de sequenciamento de alto desempenho, que utilizam uma metodologia diferente a do Sanger, de forma que acelera e baixa o custo desse processo de sequenciamento (28). Todos os sequenciadores de nova geração, possuem uma metodologia baseada na visualização paralela e simultânea de diversos fragmentos de DNA frente a análise de genes diferentes da doença genética de interesse, sendo assim denominada como uma técnica multigênica consiste no desenho de um painel com genes de interesse, a formação de uma biblioteca virtual e o sequenciamento de diversos pacientes ao mesmo tempo frente aos genes relacionados com a doença de interesse (29).

Essas técnicas são utilizadas, assim como o sequenciamento de Sanger, para descobrir diferenças entre o genoma humano como referência e o genoma de interesse (26). Cada sequenciador de nova geração possui uma metodologia, mas em geral possuem etapas comuns e com o mesmo princípio, a utilização de um painel genético desenhado, que contém os genes associados a doença genética de interesse para investigação identificados e adicionados a uma plataforma virtual, tendo como referência a versão do genoma humano referência, que pode variar GRCh 37 ou GRCh 38.p12 (29-30).

Desde 2005 as tecnologias NGS possibilitam o sequenciamento de milhões de bases em único experimento (29). Estes avanços tecnológicos podem ser observados claramente na publicação de Classificação das PID pela União Internacional de Sociedades de Imunologia (IUIS) (19). Entre os anos de 2011 e 2014, novos genes causadores de PID foram descritos, sendo estes sequenciados por NGS. A identificação dos defeitos genéticos das PID, além de importante para o aconselhamento genético familiar e, em muitos casos, definição de prognóstico, permite melhor compreensão das vias do sistema imunológico envolvidas na defesa contra patógenos específicos e pode orientar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (30,31).Dentre os sequenciamentos de DNA, existe a técnica do sequenciamento total do exoma (WES).

7.6. Sequenciamento Total do Exoma (WES)

O WES é caracterizado pelo sequenciamento do exoma, regiões no DNA codificadoras de proteína e que representam cerca de 2% do genoma, possuindo aproximadamente 85% das mutações causadoras de doença. O sequenciamento completo do exoma tem sido utilizado amplamente para a identificação de doenças de herança mendeliana. Porém o maior desafio é a identificação de variantes patogênicas diante de um amplo espectro de variantes não patogênicas funcionais (mutações missense/nonsense e variações de sítios de splice) encontradas em estudos de grupos familiares ou de

fenótipos semelhantes (32,33).

O WES, vêm possibilitando a descoberta de inúmeros genes causadores de PID através do sequenciamento de genes específicos baseados em hipóteses dirigidas de investigação (34-36). Sendo possível analisar a segregação parental desses pacientes, identificando quem é o portador e se outras crianças de uma mesma família correm o risco de desenvolver tal doença futuramente. Além disso, possibilita uma análise concomitante dos achados clínicos, e os achados genéticos, frente as variantes genéticas associadas a doença estudada, nesse caso as PIDs. (35,36)

O sequenciamento do exoma pode ser realizado em dois contextos diferentes: pesquisa e diagnóstico. Além de ser utilizado para identificar genes candidatos em doenças monogênicas, conforme exposto previamente, o sequenciamento do exoma vem sendo usado com sucesso na pesquisa para identificar variantes causais em desordens heterogêneas, em doenças comuns e desordens complexas e em estudos relacionados com o câncer. Já a análise de exoma para diagnóstico é indicada pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) para detecção de variantes raras em pacientes com fenótipo de doença mendeliana nos seguintes casos:

- a) Os dados fenotípicos ou a história familiar sugerem fortemente etiologia genética, mas o fenótipo não corresponde a uma desordem genética específica, para a qual um teste genético que tem como alvo um gene específico esteja disponível clinicamente;
- b) O paciente apresenta uma desordem genética definida que demonstra elevado grau de heterogeneidade genética, tornando a análise de exoma uma abordagem mais prática e barata (múltiplos genes são analisados simultaneamente);
- c) O paciente (ou o feto) apresenta uma doença genética provável, mas testes genéticos específicos disponíveis para o fenótipo não conseguiram chegar a um diagnóstico.

Para a realização da captura do exoma, são utilizados kits oferecidos por diversas empresas, como: Agilent, Illumina, Roche NimbleGen, entre outras.

7.7. Variantes Genéticas e Bancos de Dados

As variantes genéticas, são variações que ocorrem ao longo das 3,2 bilhões de pares de bases que compõem o DNA. Essas variações são denominadas como mutações e variam desde alteração de um único nucleotídeo (pontual) a alterações de um cromossomo inteiro (estrutural).

As mutações podem ser classificadas de acordo com o tamanho da alteração nas sequências de DNA e pela alteração no efeito funcional da mutação na expressão gênica. Essas mutações podem variar de acordo com o seu impacto no fenótipo clínico do paciente, variando de silenciosas até causadoras de sérias doenças (36).

Algumas variantes de base única vêm sendo identificadas e catalogadas em toda população humana, demonstrando a verdadeira extensão da diversidade da nossa espécie, denominadas como polimorfismos de base única (SNP, do inglês *Single nucleotide polymorphisms*). Os SNPs, são considerados como a forma mais comum de variações genéticas ao longo do genoma humano, e podem contribuir ou não para o desenvolvimento de algumas doenças. Como uma maneira de distinguir polimorfismos comuns na população de variantes raras, foi sugerida a utilização da frequência alélica como meio de seleção dessas variantes através do MAF (*Minor Allele Frequency*). Alelos muito comuns apresentam $MAF \geq 5\%$, e alelos raros apresentam $MAF \leq 1\%$ (37).

Além do SNP, as mutações são classificadas de acordo com o efeito que a alteração causa na expressão proteica, através de mutações de uma base única ou mais, alterando a sequência dos códons, interferindo ou não, na codificação da proteína, como (38):

(i) silenciosas, alteração de uma das bases de DNA, modifica a sequência do códon e mantém a codificação do mesmo aminoácido; (ii) missense, alteração de uma das bases de DNA, modifica a sequência do códon, passando a codificar um aminoácido; (iii) nonsense, alteração do códon, passando a codificar um códon de terminação, truncando a proteína prematuramente, preservando ou não a sua função; (iv) inserções, acréscimo de uma ou mais bases na sequência original do DNA; (v) deleções, perda de uma ou mais bases na sequência original do DNA, alterando a cadeia proteica que deveria ser formada ou a sua função; (vi) duplicações, regiões de DNA que surge copiado uma ou mais vezes relativamente à sequência original; (vii) repetições de expansão, alterações de pequenas sequências de DNA que se repetem em série (37-38).

A busca por variantes genéticas que sejam possíveis candidatas para o fenótipo clínico do paciente, é uma das etapas críticas ao processo de diagnóstico molecular. Algumas ferramentas são utilizadas para avaliar a importância dessas variantes, como: bancos de dados com anotações de variantes já descritas e/ou que avalia a partir de uma escala numérica a nocividade de variantes de nucleotídeo único (37).

As variantes podem ser identificadas com base na sua patogenicidade, ou seja, na alteração causada na proteína em questão. Por exemplo, variantes que causam mudança na matriz de leitura,

códons finalizadores e alterações em sítios de splice canônicos são mais patogênicas que variantes silenciosas. Ademais, os genes candidatos podem ser selecionados de acordo com a função do gene em questão, e genes com funções relacionadas com o fenótipo da doença (ou que codificam proteínas que interagem com outras, relacionado com o fenótipo) apresentam maior probabilidade de serem os genes responsáveis. Para fazer a busca pela função dos genes candidatos, podem-se utilizar sites como GeneCards, MalaCards, UniProt e Human Phenotype Ontology (HPO) (35-37).

Além da função dessas variantes, existem bancos de dados que permitem identificar se a variante achada é sabidamente patogênica, estando relacionada com a doença ou benigna. No caso da variante nunca ter sido descrita, ela é considerada uma variante com significado incerto (VUS, do inglês Variant of Uncertain Significance). Esses achados só são possíveis devido a bases de dados que contém inúmeras notações de variantes, sendo: (1) Database single nucleotide polymorphism - dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>); (2) Catalog of somatic mutations in cancer – COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>); (3) Clinical variants – ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>); (4) 1000 Genomes (<http://www.internationalgenome.org>); (5) National heart, lung, and blood exome variant server - NHLBI EVS (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>); (6) Exome aggregation consortium – ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>); (7) Scale-Invariant Feature Transform - SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg>); (8) Polymorphism Phenotyping - PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>); (9) Database of Genomic Variants - DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>); (10) Clinical Genome – ClinGen (<https://www.clinicalgenome.org>); (11) International Standards for Cytogenomic Arrays - ISCA (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000205.v2.p1).

Além das plataformas de análise, as variantes achadas e consideradas como possíveis patogênicas ou que possuíam alguma relevância na clínica do paciente, podem ser ranqueadas de acordo com o CADD (Combined Annotation Dependent Depletion). O CADD é utilizado para avaliar a nocividade de variantes de nucleotídeo único, a partir de escalas numéricas baseado em múltiplas anotações de variantes. Essas variantes se baseiam na diversidade alélica, na patogenicidade de variantes codificadores e não-codificadoras. A variante com SCORE >30 é uma variante com potencial de ser altamente patogênica, >20 patogênica, entre 15 e 20 potencialmente patogênica, <15 potencialmente benigna e <10 benigna (36,37).

Essa variedade de banco de dados contendo notações de variantes caracteriza as variantes encontradas e classifique-as de acordo com a sua predição, podendo ser Potencialmente Benignas,

Benignas, Potencialmente Patogênicas, Patogênicas ou Variantes com significado incerto (VUS), ou seja, que não foram descritas ainda em nenhum banco de dados (33).

7.8. Método do Sequenciamento WES - Illumina

O método do sequenciamento WES (Illumina), foi desenvolvido pela empresa Solexa, e vem sendo muito utilizado e aprimorado ao longo do tempo. Baseado no método de amplificação em ponte, utiliza a ligação de adaptadores em ambas às extremidades, que permite a fixação por hibridização a um dos oligonucleotídeos fixados na lâmina de sequenciamento e à amplificação por PCR, em uma superfície de sequenciamento que captam mais de 300 aglomerados compostos pelas cópias clonais de um único fragmento em cerca de 1000 vezes (39).

Sendo composta principalmente pelas etapas: Em (A) ligação de adaptadores em ambas as extremidades no fragmento de DNA de interesse. Em (B), estes fragmentos são colocados em uma placa (flowcell) contendo adaptadores complementares aos adaptadores ligados nas extremidades dos fragmentos, ligando esses fragmentos na placa. Em (C), ocorre a marcação do nucleotídeo incorporado por fluorescência, amplificando toda a extensão do fragmento. Em (D) tem-se a formação da estrutura em ponte. Em (E) ocorre a desnaturação e clonagem desse fragmento. Em (F) os adaptadores livres na placa se ligam a adaptadores livres, iniciando um novo ciclo de clonagem. Em (G), formação das milhares de cópias do mesmo fragmento. Em (H) adição de desoxinucleotídeos contendo fluoróforos, que junto com a atividade da enzima DNA polimerase, irá incorporar o didesoxinucleotídeo apropriado e através de emissões de feixes de laser faz com que o fluoróforos exerçam a liberação de um feixe de luz, diferenciando a base incorporada (Fig 03). Após essas etapas, ocorre a etapa da formação dos dados compilados e das imagens (37-39).

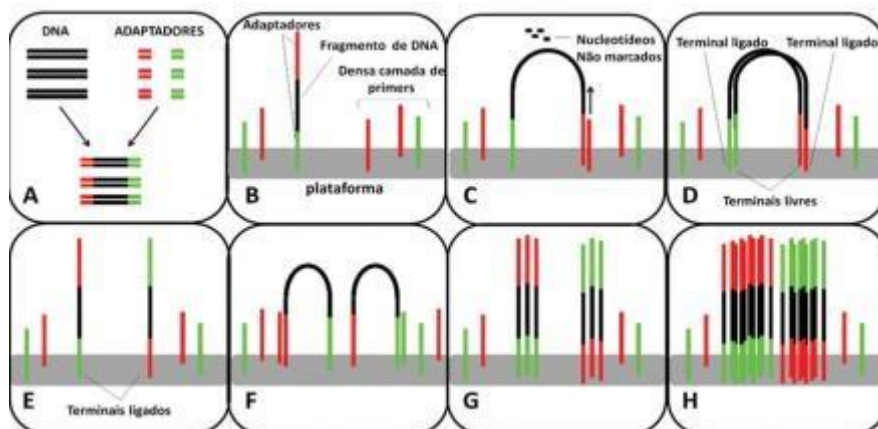


Fig.03. Princípios da metodologia do *Illumina*.

Durante o processo de sequenciamento, os dados brutos são convertidos em arquivos do tipo FASTQ. Esses arquivos são gravados em formato texto (txt) e contém informações sobre as sequências e o score de qualidade do sequenciamento (*Quality scores*). O score de qualidade revela se os dados de uma dada corrida podem ser considerados como dados utilizáveis ou não. Geralmente, os score variam de acordo com a corrida (Fig.03) e podem resultar em uma quantidade significativa de leituras inutilizáveis, como por exemplo, a presença de muitos fragmentos policlonais, otimizando assim o tempo e o custo (33).

Phred Quality Score	Probability of Incorrect Base Call	Base Call Accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1,000	99.9%
40	1 in 10,000	99.99%
50	1 in 100,000	99.999%

Fig.04. Valores referentes ao score de qualidade de que uma corrida pode ter, indicando a probabilidade de base errada dentre uma certa quantidade e a acurácia.

Além dos arquivos em formato .fastq, são originados, a partir de comandos de bioinformática, arquivos no formato .vcf., contendo as sequências de bases alinhadas ao genoma de referência GRCh38.p12 (GCA_000001405.27). Esses arquivos por sua vez, são inseridos na plataforma de análise online da própria empresa Illumina®, chamada de “BaseSpace Variant Interpreter” (<https://variantinterpreter.informatics.illumina.com/home>) que possibilita analisar os resultados individuais de cada exoma, selecionar as variantes de interesse a partir de filtros específicos e identificar possíveis genes como potenciais candidatos para a patogenicidade do paciente.

8. Metodologia

8.1. Tipo de Estudo e Aspectos Éticos

Este trabalho é um estudo experimental realizado no período de 01/03/2017 até 01/03/2019 e faz parte de um projeto guarda-chuva aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF): “Estratégia de terapia gênica em células tronco hematopoiéticas baseada no sistema CRISPR/Cas9 para imunodeficiências primárias” , correspondendo ao número de CAAE: 98936818.0.0000.5269 (*ANEXO 01*).

Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE específico para o projeto (*ANEXO 02*)

8.2. População e Local do Estudo

A partir da coorte de pacientes do projeto guarda-chuva mencionado anteriormente, foram selecionados 34 pacientes de diferentes unidades de saúde, que atenderam aos critérios clínicos da equipe para o sequenciamento para identificação de variantes genéticas para imunodeficiências primárias.

O estudo foi realizado no Laboratório de Alta Complexidade (NB2), do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF) em colaboração com a Unidade de Genômica Computacional Darcy Fontoura de Almeida (UGCFDA), do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC).

Para o processo de triagem, todo paciente incluído no projeto foi cadastrado pelo seu médico em um formulário online (<http://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSd-MDwLOYxUx9c9Zaye96KUDwwnhQ74fXNqspBqUBGUL-kRqWg/viewform>), criado para a descrição dos aspectos clínicos do paciente armazenados de forma codificada em banco de dados do projeto guarda-chuva. Neste questionário estão contidas informações do histórico do paciente, além dos sinais e sintomas clínicos relacionados a sua patologia, número de infecções, patógenos isolados, internações, histórico familiar, entre outras informações consideradas de relevância. Esse questionário foi desenvolvido em conjunto com profissionais dos hospitais participantes do estudo e foi produto do projeto de pesquisa da Rede Carioca de Imunodeficiências Primárias financiado pelo Edital de Políticas Públicas e Modelo de Atenção Fiocruz (*ANEXO 03*).

8.3. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no projeto, 34 pacientes que tiveram pelo menos, 1 dos sintomas clínicos enquadrados nos “10 sinais de alerta para imunodeficiência primária na criança” e que passaram por uma triagem clínico-laboratorial, por meio de exames que levaram a suspeita clínica dessa doença.

8.4. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do projeto, pacientes com HIV ou qualquer doença crônica secundária de origem genética não-relacionada, como fibrose cística.

8.5. Coleta de Amostras para o sequenciamento

Foram colhidos 1ml de sangue periférico em tubo com EDTA (tampa roxa) de cada paciente e enviados para o Laboratório de Alta Complexidade (NB2). No momento que foi recebida, para a realização do sequenciamento do exoma, a amostra foi cadastrada no sistema de gestão e foi gerado um código de barras com identificação única que foi utilizada em todo o estudo.

8.6. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir de 200uL de sangue periférico em tubo com EDTA de cada paciente, utilizando o kit “QIAmp DNA Mini Kit” da marca QUIAGEN. A extração é iniciada com a adição de 20uL de protease (QUIAGEN), 200uL do Tampão de Lise “AL” (QUIAGEN) em um eppendorf contendo 200uL de sangue periférico. O eppendorf então, é incubado a 10 minutos a 56°C. Em seguida, é adicionado 200uL de Etanol Absoluto (ETOH) e o mesmo é transferido para uma minicoluna e um tubo coletor, fornecidos pelo próprio kit QUIAGEN. O eppendorf é então centrifugado a 6000g por 1 minuto. É trocado o tubo coletor. Em seguida, é adicionado 500uL da solução “AW1” (QUIAGEN), sendo centrifugada a 6000g por 1 minuto. É trocado novamente o tubo coletor e em seguida, adicionado 500uL da solução “AW2” (QUIAGEN), sendo centrifugado a 20000g por 1 minuto. É trocado o tubo coletor e em seguida, o eppendorf é centrifugado novamente a 20000g por 3 minutos. É descartado o tubo coletor e a minicoluna é colocada em um eppendorf de 1,5mL. Em seguida, é adicionado 200uL do Tampão de Eluição “AE” (QUIAGEN). É feita então a última centrifugação a 6000g por 1 minuto. Após essa centrifugação, o DNA está extraído e o mesmo é armazenado no freezer a -20°.

8.7. Dosagem de DNA - Thermo Scientific NanoDrop™ 2000c

A concentração de DNA das amostras foi determinada pelo método de espectrofotometria utilizando o equipamento Thermo Scientific NanoDrop™ 2000c no laboratório de Alta Complexidade (NB2). Foram adicionados 2uL das amostras no equipamento, tendo como resultados: i) a concentração de DNA na amostra (ng/uL), baseada na absorbância a 260nm. ii) absorbâncias a 260nm e 280nm normalizadas para um comprimento de caminho de 10mm. iii) razão da absorbância a 260nm/280nm, usada para avaliar a pureza do DNA quanto a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que são fortemente absorvidos em ou perto de 280nm (~1,8). iv) razão da absorbância a 260nm/230nm, usada como uma medida secundária da pureza do DNA, quanto a presença de contaminantes presentes durante o processo de extração (1,8-2,2).

8.8. Dosagem de DNA – Invitrogen Qubit™ 4 Fluorometer

A concentração de DNA das amostras também foi determinada pelo método de fluorimetria utilizando o equipamento Invitrogen Qubit® 4 Fluorometer na Unidade de Genômica Computacional Darcy Fontoura de Almeida (UGCFDA). Foram feitas diluições de 1:200 das 34 amostras e 1 padrão. Para cada diluição foi preparada uma solução de trabalho, contendo 1uL do reagente (*Qubit™ Reagent*) e 199uL do tampão (*Qubit™ Buffer*). Na diluição das amostras, foram adicionados 198uL de solução de trabalho em um eppendorf contendo 2uL de DNA de cada amostra e na diluição do padrão, foram adicionados 190uL da solução de trabalho em um eppendorf contendo 10uL do padrão disponibilizado pelo kit.

8.9. Sequenciamento de Nova Geração - Plataforma Illumina TruSeq® 500

As bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando o kit “TruSeq® Exome Kit” de acordo com as instruções do fabricante (*Illumina*) e permitiu identificar de forma rápida regiões contendo apenas regiões de interesse, genes já descritos como responsáveis pelas PIDs. As amostras de DNA foram quantificadas e 50ng de DNA genômico foram fragmentados e marcados individualmente. Foram feitas duplicatas de cada biblioteca genômica, e foram utilizados primers específicos para a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando pares de primers específicos para a amostra. Foram misturados os dois pools de cada amostra, estando agrupadas em 6 amostras por protocolo. Os pools contendo as amostras foram submetidos a 2 ciclos de enriquecimento, a partir das sondas biotiniladas que foram hibridizadas no DNA, capturadas por esferas magnéticas revestidas com estreptavidina. Foram lavadas e eluídas, tendo assim uma biblioteca enriquecida. Essa biblioteca

enriquecida, foi amplificada por PCR. As etapas de purificação das bibliotecas foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e as bibliotecas preparadas foram desnaturadas e diluídas para 1,8pmol.

O sequenciamento foi realizado no sistema NextSeq® 500/550 e a análise dos 34 exomas foi realizada em 6 corridas, em sistemas multiplex, utilizando 6 exomas por reação, com o kit NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (300 ciclos) de acordo com a especificação do fabricante (*Illumina*). Após o final de cada corrida, os resultados são gerados no formato .fastq e .vcf.

8.10. Utilização de Filtros Específicos

Após cada corrida, os dados em formato .vcf foram importados para plataforma de análise virtual da Illumina (BaseSpace Variant Interpreter) sendo possível analisar e filtrar as possíveis variantes que se enquadraram como patogênicas ou que possuíam alguma relevância quanto a clínica do paciente.

Sendo assim, foram utilizados os seguintes filtros:

- (1) Painel Virtual PID c/ 334 genes;
- (2) Frequência do Alelo Menos Comum <0.01;
- (3) Variantes pequenas - SNV, MNV e Indels;
- (4) Todas as consequências de Codificação;
- (5) Predição –Patogênico, Potencialmente Patogênico e VUS;
- (6) Autossômico dominante, Homozigose Recessiva e Hemizigose Recessiva;

9. Resultados

9.1. Características da População Estudada – Distribuição por sexo e unidade de saúde

Foram estudados 34 pacientes, sendo 25 do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Dentre os 34 pacientes, 12 são do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira – IPPMG/UFRJ, 5 do Hospital Federal dos Servidores do Estado - HSE, 16 do setor de Alergia e Imunologia, do Departamento de neonatologia do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente – IFF e 1 do Hospital da Lagoa (Fig.05).

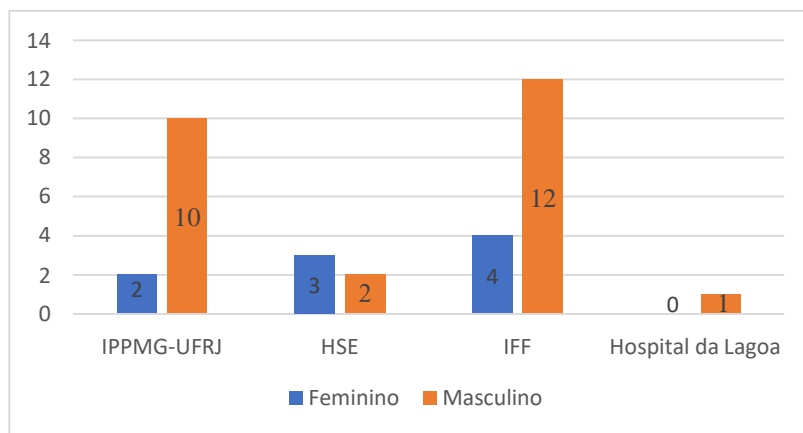


Fig 05. Distribuição dos 34 pacientes nas unidades de saúde participantes do RECIP, separados por sexo.

9.2. Características da População Estudada – Início dos sintomas e os 10 sinais de alerta

O início dos sintomas, usados como indicativos para a suspeita de PID, variou de acordo com a idade de cada paciente, como mostra a Fig.06. Dentre os 34 pacientes, 12% tiveram os primeiros sintomas entre o período do nascimento e os 4 primeiros meses de vida, 6% entre o período dos 6 aos 9 primeiros meses, 26% entre o período dos 11 primeiros meses aos 2 anos, 35% entre o período dos 3 aos 6 anos, 3% aos 9 anos e 18% não possível obter esses dados. Os primeiros sintomas foram distribuídos e analisados baseados nos 10 sinais de alerta para PID e como podemos observar na Fig.07, 25% dos pacientes investigados tiveram um ou mais quadros de Pneumonia, 9% quatro ou mais quadros de Otite no último ano, 13% quadros de sinusite recorrentes, 2% abscessos de repetição ou ectima, 9% pelo menos um episódio de infecção sistêmica, 10% asma grave, doença do colágeno ou doença autoimune, 29% fenótipo clínico sugestivo de síndrome associada a imunodeficiência e

3% histórico familiar de imunodeficiência

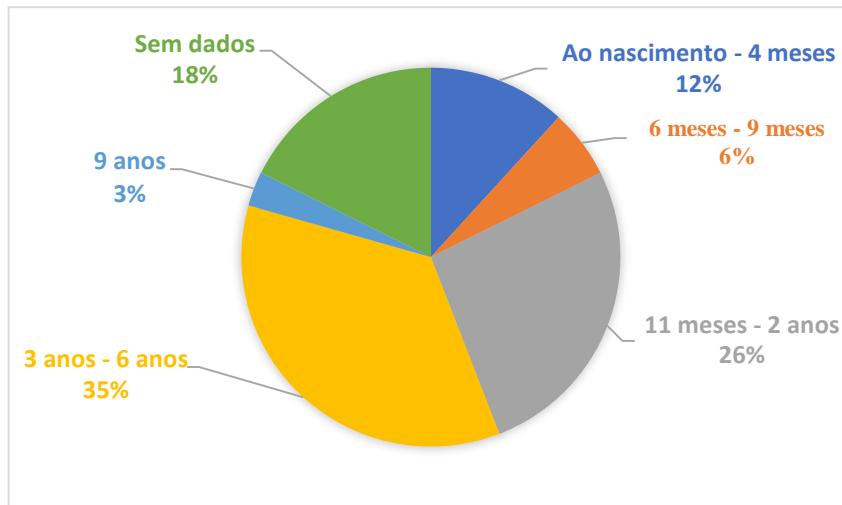


Fig 06. Distribuição dos pacientes de acordo com a idade que iniciaram os primeiros sintomas.

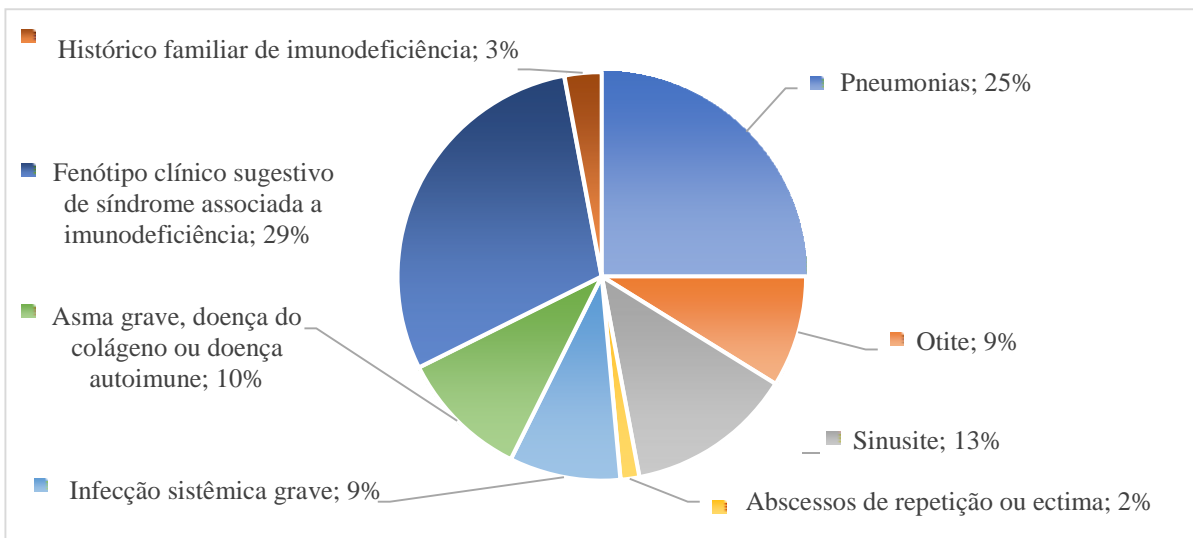


Fig 07. Distribuição dos pacientes de acordo os 10 sinais de alerta.

9.3. Dados Brutos – Plataforma Illumina NextSeq® 500/550 – Formato (.fastq)

Os dados brutos do sequenciamento foram exportados do sequenciador Illumina NextSeq® 500/550 em formato de arquivos .fastq (FASTA) em formato de texto e separados por pacientes, contendo informações sobre as reads (sequências curtas de ≈ 100 bases nucleotídicas) e sobre a qualidade (quality score) do sequenciamento para cada nucleotídeo sequenciado. Como podemos observar na Tabela 01, o número de reads sequenciados variou de 115.178.572 – 179.326.550 bases nucleotídicas com comprimento médio de 75,52. Além disso, foi utilizado um score de qualidade (qscore ≥ 30) para determinar a probabilidade de uma determinada base ter sido corretamente identificada durante o processo de sequenciamento, sendo possível observar que variou de 98,49% – 99% e utilizando uma cobertura de 5 vezes, para identificar quantas vezes uma única base repetiu pelo menos 5X, variou de 71.99% - 72.17% (Tabela 01).

Caso	Number of reads (F+R)	Mapped read mean length	Onred ≥ 30 (%)	Coverage $\geq 5X$ (%)
01	125990352	75.52	99	71.79
02	118997078	75.52	99.12	71.82
03	179326550	75.52	98.85	72.08
04	156989782	75.52	98.93	71.97
05	153007406	75.52	98.85	71.91
06	169929052	75.52	98.91	71.99
07	162039900	75.52	98.89	71.91
08	131211474	75.52	98.66	71.72
09	165971850	75.52	99.02	72.11
10	115178572	75.52	99.13	71.73
11	130041274	75.52	98.85	71.99
12	134837060	75.52	99.07	71.99
13	121319202	75.52	98.93	71.83
14	156542374	75.53	98.93	72.17
15	143183218	75.52	98.49	72.09
16	133750082	75.53	98.88	72.02
17	137212134	75.52	98.84	72.05
18	136491042	75.53	99.11	72
19	162382948	75.52	99.11	72.15
20	126398036	75.52	99.06	71.94
21	130096026	75.53	99.12	71.9
22	127986514	75.52	99	71.98
23	135434230	75.52	98.89	72.04
24	124457616	75.52	99.02	71.92
25	141310286	75.53	98.93	72.07
26	146422036	75.52	98.86	71.77
27	130847698	75.52	98.88	71.47
28	145651150	75.52	98.97	71.73
29	136495252	75.52	98.99	71.91
30	146653088	75.52	98.89	71.71
31	159817614	75.52	98.89	71.87
32	149350030	75.52	98.93	72.05
33	142666044	75.52	98.81	71.96
34	128004484	75.52	99.06	71.83

Tabela 01. Representação do resultado dos dados brutos de saída do sequenciador, como arquivo fastq no formato de texto e separados por pacientes, contendo informações sobre as reads (sequências curtas de ≈ 100 bases nucleotídicas) e sobre a qualidade (quality score) do sequenciamento para cada nucleotídeo sequenciado.

9.4. Etapa de Filtros Específicos

Como podemos observar na Fig.08, o número total de variantes encontradas nos 34 pacientes, sem o uso de filtros, variou de 80.188 – 135.715. Além disso, é possível observar que o número total de variantes diminui conforme a adição de um novo filtro: (1) Painel Virtual PID c/ 334 genes (1.800 – 2.709 variantes); (2) Frequência do Alelo Menos Comum <0.01 (486 - 728 variantes); (3) Variantes pequenas - SNV, MNV e Indels (486 – 728 variantes); (4) Todas as consequências de Codificação (52 – 84 variantes); (5) Predição – Patogênico, Potencialmente Patogênico e VUS (13 – 35 variantes); (6) Autossômico dominante, Homozigose Recessiva e Hemizigose Recessiva (04 – 13 variantes). Como mostra a Fig 07.

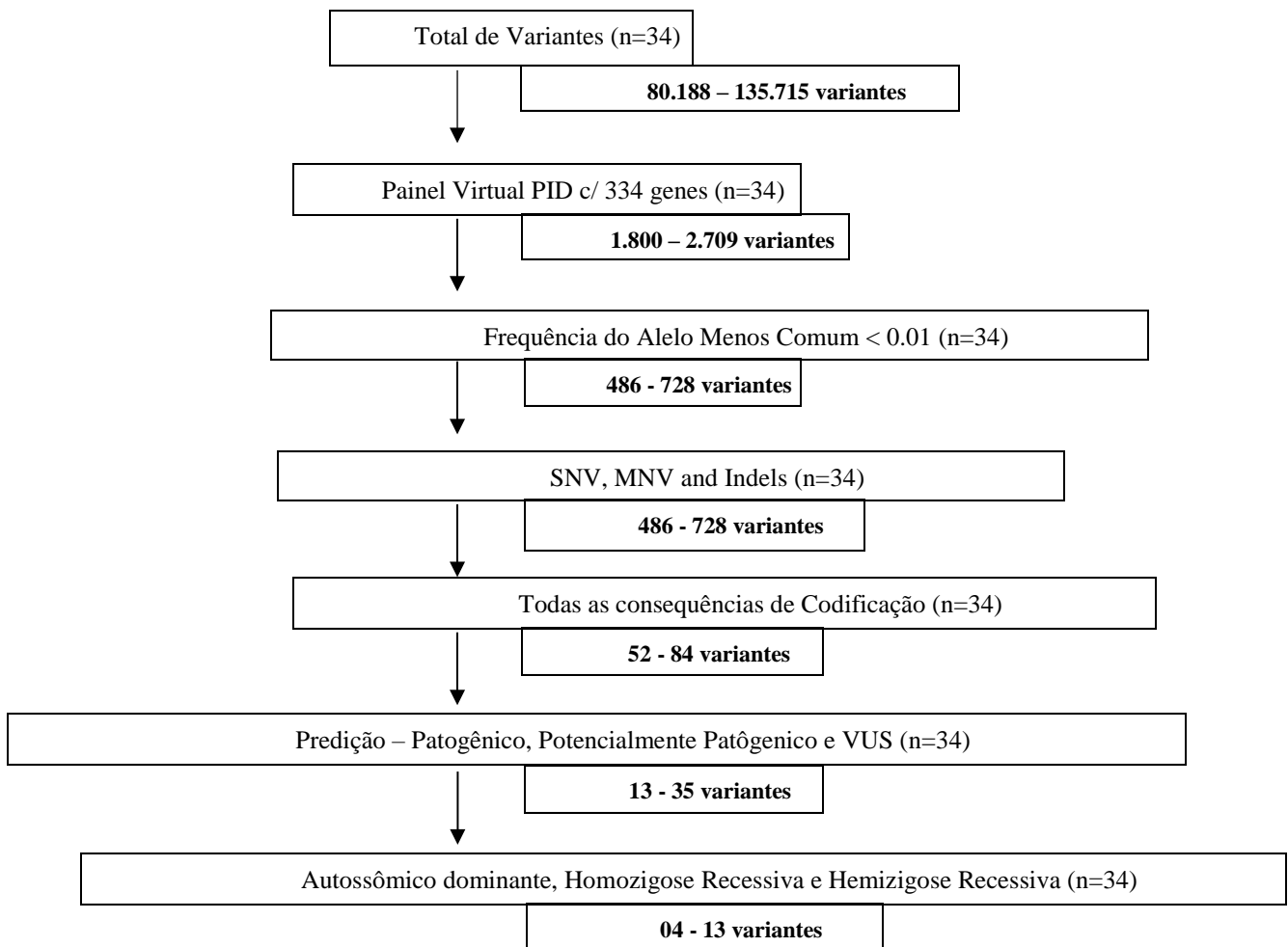


Fig 08. Representação do número total de variantes encontradas de acordo com o filtro de bioinformática utilizado.

9.5. Análise das variantes – Segundo a Predição

Após a etapa da filtragem foi feita uma busca por variantes que justificassem o fenótipo clínico e ranqueadas de acordo com o valor de score estipulado pelo CADD, com embasamentos na clínica desses pacientes. Inicialmente, foram priorizadas, variantes com predição de caráter patogênico em heterozigose (Tabela 02) e verificou-se que apenas 10 dos 34 pacientes possuíam variantes com essa predição. Essas variantes foram ranqueadas e apesar de serem variantes raras, foram encontradas: 9 variantes com score >20 (deletérias), 1 com score entre 15-20 (potencialmente deletérias), 2 com score <15 (potencialmente benignas), 2 com score <10 (benignas) e 2 variantes não tiveram score.

Paciente	Sexo	Gene em heterozigose	Score	Posição REF ALT	Transcrição (NM_)	Consequência
02	M	PTEN	PTEN 24.7	Chr10:87960892 A T	NM_000314.5	Splice Acceptor
12	M	TNFRSF1A	TNFRSF1A 14.59	Chr12:6333477 C T	NM_001065.3	Missense
16	M	ITGB2 VPS13B	ITGB2 0.010 VPS13B 25.2	Ch21:44903541 G A Chr08:99820031 A G	NM_001127491.2 NM_017890.4	Splice region Missense
20	M	TNFRSF1A VPS13B	TNFRSF1A 14.59 VPS13B 25.2	Ch12:6333477 C T Ch08:99820031 A G	NM_001065.3 NM_017890.4	Missense Missense
21	M	ITGB2 VPS13B	ITGB2 0.010 VPS13B 25.2	Chr21:44903541 G A Ch08:99820031 A G	NM_001127491.2 NM_017890.4	Splice region Missense
23	M	PTEN	PTEN 24.7	Chr10:87960892 A T	NM_000314.5	Splice Acceptor
27	F	FCN3	FCN3 *	Chr01:27373180 G -	NM_003665.2	Frameshift Indels
29	F	FCN3 MSH6 PTEN TNFRSF13B	FCN3 * MSH6 10.31 PTEN 24.7 TNFRSF13B 15.37	Chr01:27373180 G - Chr02:47800616 T C Chr10:87960892 A T Chr17:16940352 C T	NM_003665.2 NM_000179.2 NM_000314.5 NM_012452.2	Frameshift Indels Missense Splice acceptor Missense
31	F	LRBA PTEN DOCK8	LRBA * PTEN 24.7 DOCK8 28.5	Chr04:150471666 TC - Chr10:87960892 A T Chr09:271626 G T	NM_006726.4 NM_000314.5 NM_203447.3	Frameshift Indels Splice Acceptor Splice Acceptor
33	F	PTEN	PTEN 24.7	Chr10:87960892 A T	NM_000314.5	Splice Acceptor

Tabela 02. Listagem de variantes genéticas encontradas como patogênicas em 10 paciente

Embora algumas variantes sejam consideradas como variantes deletérias ou potencialmente deletérias, não possuíam características clínicas que justificassem o fenótipo clínico dos pacientes e apesar de serem variantes raras, se repetiam em mais de um paciente.

Posteriormente foram analisadas, variantes consideradas como **potencialmente patogênicas**, separadas por variantes em heterozigose e homozigose/hemizigose e verificou-se que 23 dos 34 pacientes possuíam pelo menos uma variante com essa predição. Após serem ranqueadas, foram encontradas 5 variantes com score >30 (altamente deletérias), 11 variantes com score >20 (deletérias), 3 com score <10 (benignas) e 13 variantes não tiveram score.

Assim como nos achados patogênicos, algumas variantes consideradas como potencialmente patogênicas foram encontradas em mais de um paciente, apesar de serem consideradas raras. Porém, foram encontradas 4 variantes que pudessem ter relação com a clínica dos pacientes. Foram encontradas três variantes

genéticas em hemizigose no gene *BTK*, possivelmente associadas ao fenótipo clínico de Agamaglobulinemia, nos pacientes 04, 19 e 20, ambos do sexo masculino. No paciente 19, a variante foi considerada altamente deletéria (score: 35). Além das variantes nesse gene, foi encontrada uma variante genética em hemizigose no gene *WAS*, possivelmente associada ao fenótipo clínico de Wiskott-Aldrich, no paciente 15 do sexo masculino, considerada altamente deletéria (score: 35).

Foram analisadas também, variantes com **significado incerto (VUS)**. Como todos os 34 pacientes obtiveram variantes com essa predição, a análise foi dividida em variantes encontradas apenas em homozigose e variantes encontradas apenas em heterozigose. Verificou-se que 18 pacientes dos 34, possuíam pelo menos uma variante VUS em heterozigose. Foram encontradas, assim como nos últimos achados, variantes repetidas em mais de um paciente e após serem ranqueadas, foram encontradas 9 variantes com score >20 (deletérias), 3 com score <15 (potencialmente benignas), 1 com score <10 (benignas) e 12 variantes não tiveram score.

Foram correlacionadas com a clínica dos pacientes, 6 variantes, sendo 4 variantes genéticas em hemizigose localizadas no gene *BTK*, possivelmente associadas ao fenótipo clínico de Agamaglobulinemia, nos pacientes, irmãos, 16 e 21 e nos pacientes 22 e 23, ambos do sexo masculino. Essas variantes foram consideradas deletérias segundo o CADD, sendo nos irmãos, pacientes 16 e 21 (score: 25.6), no paciente 22 (score: 28.5) e no paciente 23 (score: 25.8). Além das variantes nesse gene, foi encontrada uma variante genética em hemizigose localizada no gene *CYBB*, possivelmente associada ao fenótipo clínico de Doença Granulomatosa Crônica, no paciente 07 do sexo masculino, considerada deletéria (score: 20.3) e uma variante genética em hemizigose localizada no gene *CD40LG*, possivelmente associada ao fenótipo clínico de Síndrome de Hiper-IgM do Tipo I, no paciente 10 do sexo masculino, embora não tenha valor de score.

Após a análise das variantes VUS em heterozigose, foram analisadas as variantes VUS em homozigose e foi observado que todos os pacientes possuíam alteração genética no gene *ORAI1*.

Por fim, após todas as análises das variantes foi possível, em alguns dos casos, através da investigação parental, e do Sanger, fechar o diagnóstico de 34% dos casos sendo identificados 7 casos de Agamaglobulinemia ligada ao X (Pacientes 04, 16, 19, 20, 21, 22 e 23), 1 caso de Wiskott-Aldrich (Paciente 15), 1 caso de Doença Granulomatosa Crônica (07) e 1 caso de Síndrome de Hiper-IgM do Tipo I (Paciente 10). Além desses, foi possível indicar o caminho de 17% e 49% não apresentam correlação clara, devido a não possibilidade da segregação parental, sendo altamente importante para confirmar os achados encontrados.

9.6. Análise das variantes – Achados incertos

Após a análise de todos os genes encontrados vimos que o gene ORAI1 (REF:GCCCC/ALT:-) encontra-se alterado em todos os casos. Além desse gene, alguns genes apareceram alterados em mais de um caso, indicando um erro inerente da técnica de sequenciamento, são eles:

1. CARD14 (*SCORE*: 3.737) – Casos: 11 e 17;
2. SAMD9L (*SCORE*: 16.09) – Casos 24 e 33;
3. SAMD9 (*SCORE*: 3.590) – Casos 15 e 30;
4. SAMD9 (*SCORE*: 22.1) – Casos 02 e 27;
5. STAT1 (*SCORE*: 14.67) – Casos 09 e 31;
6. NFKB1 (*SCORE*: 2.720) – Casos 05 e 09;
7. IRF3 (*SCORE*: 22.4) – Casos 09 e 18;
8. NFAT5 (*SCORE*: 21.6) – Casos 16 e 21;
9. TICAM1 (*SCORE*: 1.599) – Casos 18 e 33;
10. TNFRSF1A (*SCORE*: 14.59) – Casos 12 e 20;
11. SH3BP2 (*SCORE*: 22.2) - Casos 16 e 21;
12. RTEL (*SCORE*: 13.19) – 01 e 07;
13. MEFV (*SCORE*: 13.19) – Casos 09 e 19;
14. TINF2 (*SCORE*: 22.5) – Casos 03 e 26;
15. GATA2 (*SCORE*: 24.7) – Casos 05 e 17;
16. FOXP3 (*SCORE*: 13.19) - Casos 16, 31 e 35;
17. PIK3R1 (*SCORE*: 10.11) – Casos 04,05, 08 e 31;
18. PTEN (*SCORE*: 24.7) – Casos 02, 23, 29, 32 e 34;
19. NLRP3 (*SCORE*: 23.4) – Casos 08, 09, 11, 14, 16, 19, 22 e 31;
20. NLPR3 (*SCORE*: 20.0) – Casos 08, 09, 11, 14, 15, 17, 19, 22 e 31;

21. PTEN (*SCORE*: 18.53) – Casos 04, 05, 09, 18, 19, 23, 24, 25, 28, 29, 31 e 32;
22. GFII (-/AGAG) – Casos 02, 09, 33 e 35;
23. GFII (AG/-) – Casos 02, 06, 15, 18, 19, 24, 28 e 35;
24. GFII (-/AGAGAG) – Casos 03, 07, 11, 13, 14, 21, 22, 25, 26, 30, 31 e 33;
25. DDX58 (A/-) – Casos 01, 02, 06, 07, 08, 09, 12, 13, 15, 17, 21, 23, 28, 30, 31 e 32;
26. DDX58 (-/A) – Casos 04, 11, 16, 14, 16, 20 e 29;
27. LYST (A/-) Casos 01, 16, 21, 28, 31, 33 e 35.

9.7. Casos diagnosticados

9.7.1. Discussão de casos de pacientes com fenótipo clínico de Agamaglobulinemia

Foram achadas 6 diferentes alterações genéticas em Hemizygous no gene BTK localizadas no cromossomo X. Essas variantes alteradas foram identificadas como responsáveis pelo fenótipo clínico de Agamaglobulinemia ligada ao X (de Bruton) em 7 casos, do sexo masculino, sendo 2 deles, irmãos (Tabela 03).

Caso	Gene	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
							cDNA	Proteína		
4	BTK	101357573	-	GA	001287344.1	Likely Path	c.1111_1112dupTC	p.(Arg372ProfsTer32)	AR	-
16*	BTK	101353351	C	T	001287344.1	VUS	c.1751G>A	p.(Gly584Glu)	AR	25.6
19	BTK	101370053	G	T	001287344.1	Likely Path	c.336C>A	p.(Tyr112Ter)	AR	35.0
20	BTK	101358418	-	T	001287344.1	Likely Path	c.993dupA	p.(Arg332ThrfsTer17)	AR	-
21*	BTK	101353351	C	T	001287344.1	VUS	c.1853G>A	p.(Gly618Glu)	AR	25.6
22	BTK	101353885	C	A	001287344.1	VUS	c.1735G>T	p.(Asp579Tyr)	AR	28.5
23	BTK	101374609	A	T	001287344.1	VUS	c.167T>A	p.(Ile56Lys)	AR	25.8

Tabela 03. Casos com mutações encontradas no gene caracterizando fenótipos clínicos de Agamaglobulinemia ligada ao X.

Legenda: (-) – Dado não informado
(*) – Casos com parentesco

Em alguns casos havia histórico familiar de imunodeficiência primária, como no caso 4, 16 e 21. Além disso, foi possível fazer investigação parental em todos esses casos, através do sequenciamento de Sanger da amostra da mãe, do pai e dos irmãos, caso tivesse, como por exemplo o caso 23 (Fig.09).

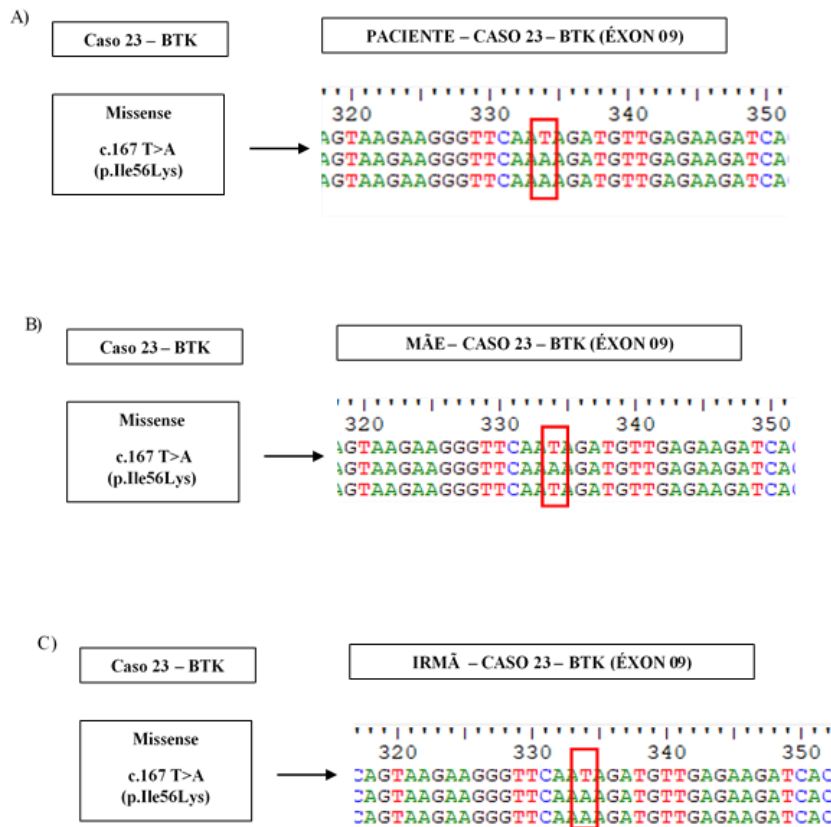


Fig. 09. Resultado do Sequenciamento de Sanger do gene *BTK* da mãe, do paciente e da irmã.

9.7.2. Discussão de casos de pacientes com fenótipo clínico de Wiskott-Aldrich (WASP)

Foi achada 1 alteração genética em Hemizygos no gene *WAS* localizada no cromossomo X. Essa variante alterada foi identificada como responsável pelo fenótipo clínico de Wiskott-Aldrich (WASP) em 1 caso, do sexo masculino (Tabela 04).

Caso	Gene	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
							cDNA	Proteína		
15	WAS	48688411	C	T	000377.2	Likely Path	c.889C>T	p.(Gln297Ter)	AR	35.0

Tabela 04. Caso com mutação encontrada no gene *WAS*, caracterizando fenótipo clínico de Wiskott-Aldrich.

Além desse caso, foi analisada, amostra de uma mãe, cuja o filho já havia sido diagnosticado como Wiskott-Aldrich (WASP). Como não foi achada e identificada nenhuma variante no gene *WAS* que caracteriza essa mãe como portadora, foi feito sequenciamento de Sanger para a região específica da mutação encontrada no filho e a mesma não foi encontrada na mãe (Fig.10).

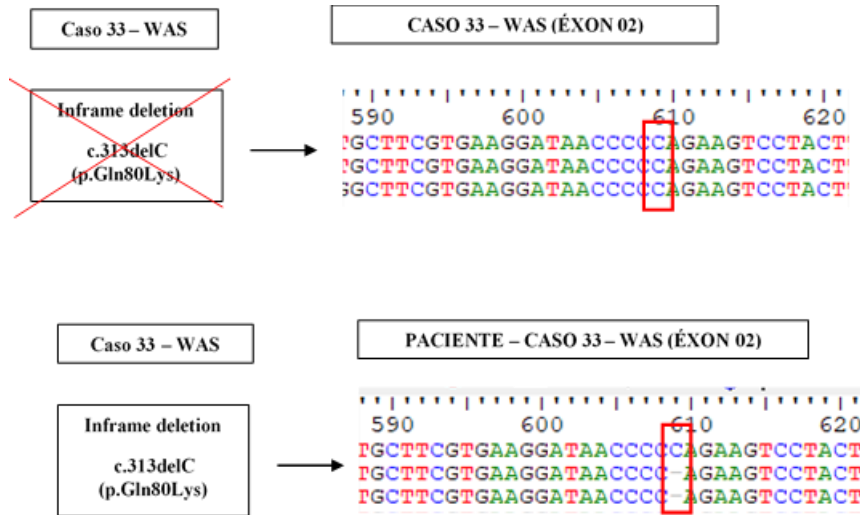


Fig.10. Resultado do Sequenciamento de Sanger do gene WAS da mãe e do filho.

9.7.3. Discussão de casos de pacientes com fenótipo clínico de Doença Granulomatosa Crônica (DGC)

Foi achada 1 alteração genética em Hemizygos no gene CYBB localizada no cromossomo X. Essa variante alterada foi identificada como responsável pelo fenótipo clínico de Doença Granulomatosa Crônica (CYBB) em 1 caso, do sexo masculino (Tabela 05).

Caso	Gene	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
							cDNA	Proteína		
7	CYBB	37793810	G	A	000377.2	VUS	c.483G>A	p.(Lys161=)	AR	20.3

Tabela 05. Caso com mutação encontrada no gene CYBB, caracterizando fenótipo clínico de Doença Granulomatosa Crônica.

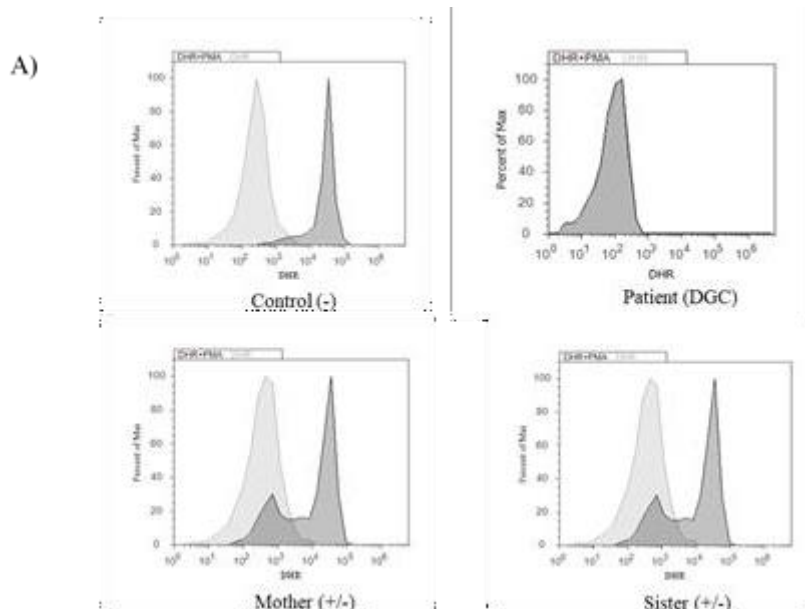
Nesse caso, havia histórico familiar de falecimento de um irmão na infância por pneumonia grave e uma irmã saudável (Fig.11A). Além disso, nesse caso em especial, foi realizado o cariótipo desse paciente, tendo como resultado uma monossomia do cromossomo 7 (Fig.11B).



Fig 11. Representação do heredograma da família do paciente e do resultado da monossomia do cromossomo 7, pelo cariótipo.

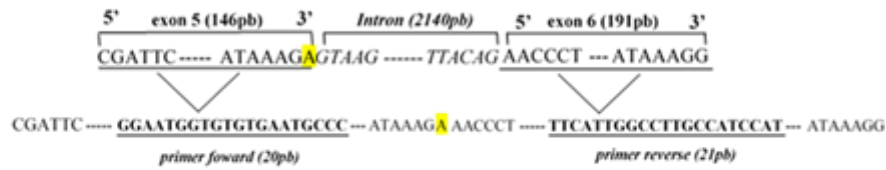
O diagnóstico de DGC, foi confirmado através de alguns testes laboratoriais. Foi feito o teste da oxidação da di-hidrorrodamina (DHR) na mãe, na irmã e no paciente. Tendo como resultado a não produção de espécimes reativas de oxigênio no paciente e a falha na produção desse espécime na mãe e na irmã, apesar de ainda produzirem (12A).

Após esses achados, foram desenhados dois primers (primer Forward e primer Reverse), nos quais continham as sequências de nucleotídeos específicos para a amplificação da região de splicing, região que continha a variante alterada. Sendo possível fazer um PCR para o a mãe, a irmã e o paciente (Fig.19C).



B)

CrhX: 37793810 – Gene CYBB



C)

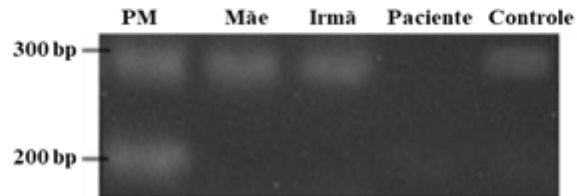


Fig 12. Resultado do DHR do paciente, da mãe (mother), da irmã (sister) e de um controle negativo (control), representação do de dos primers (forward e reverse) e do resultado do PCR.

9.7.4. Discussão de casos de pacientes com fenótipo clínico de Síndrome de Hiper-IgM do tipo I

Foi achada 1 alteração genética em Hemizygos no gene CD40LG localizada no cromossomo X. Essa variante alterada foi identificada como responsável pelo fenótipo clínico de Síndrome de Hiper-IgM do tipo I em 1 caso, do sexo masculino (Tabela 06).

Caso	Gene	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
							cDNA	Proteína		
10	CD40LG	136659062	TAC	-	000074.2	VUS	c.436_438delTAC	p.(Tyr146del)	AR	-

Tabela 06. Caso com mutação encontrada no gene CD40LG, caracterizando fenótipo clínico de Síndrome de Hiper do tipo I.

9.7.5. Discussão de alguns casos ainda em investigação parental

Caso 05

Paciente do sexo masculino, com quadro clínico de histoplasmose. O gene responsável pelo fenótipo, com embasamento nos achados clínicos e laboratoriais: **GATA2**, no éxon 03, com valor de phred de 24,7.

Foi feita investigação da variante encontrada no gene na mãe desse paciente, através do sequenciamento de sanger, tendo como resultado: **não alteração da variante**, como mostra a Fig.21.

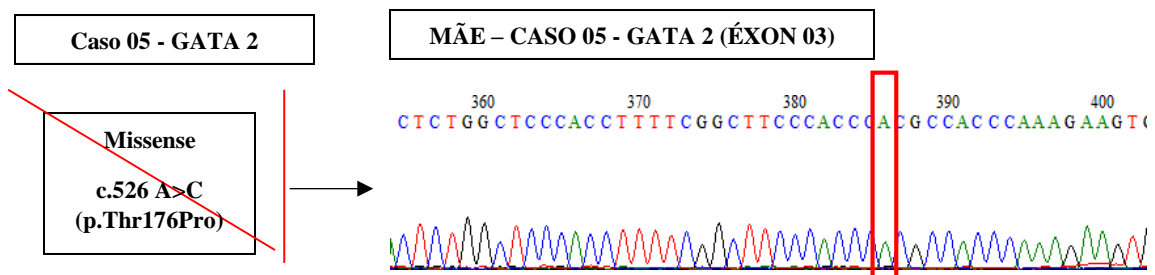


Fig 13. Resultado do Sequenciamento de Sanger do gene *GATA2* da mãe do CASO 05.

Caso 18

Paciente do sexo masculino, com suspeita clínica de Deficiência do Componente C6 do Complemento. As variantes foram ranqueadas e foi considerado como primeira possibilidade de gene responsável pelo fenótipo, com embasamento nos achados clínicos e laboratoriais: **C6**.

Foi realizado o cariótipo desse paciente para deleção do cromossomo 5, tendo como resultado cariótipo normal (46XY). Foram realizados também alguns testes laboratoriais desse paciente, da mãe e do pai, como o PCR em Tempo Real (qPCR), confirmando a amplificação da região dos genes **IL12B** (Fig.22A) e **C6** (Fig.22B), presentes no cromossomo 5. Foi feita a análise laboratorial do complemento hemolítico total CH50, tendo como resultado 1U/CAE e foi feita a dosagem sérica do C6, através do método de imunodifusão radial, que teve como resultado sem precipitação.

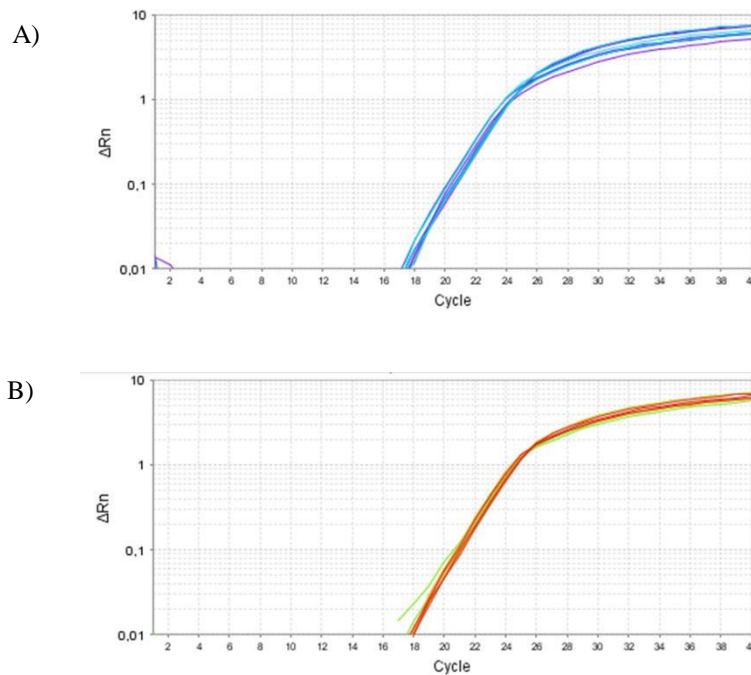


Fig 14. Resultado do PCR em Tempo Real da amplificação dos genes *IL12B* (A) e *C6* (B) localizados no cromossomo 5, do paciente, da mãe e do pai.

Caso 32

Paciente do sexo feminino, com suspeita clínica de doenças autoinflamatórias. As variantes foram ranqueadas e foi considerado como primeira possibilidade de gene responsável pelo fenótipo, com embasamento nos achados clínicos e laboratoriais: *MEFV*, no éxon 04, com valor de phred de 19,91.

Foi feita investigação da variante encontrada no gene na mãe (Fig.15A) no pai (Fig.15B) desse paciente, através do sequenciamento de sanger, tendo como resultado: **não alteração da variante**.

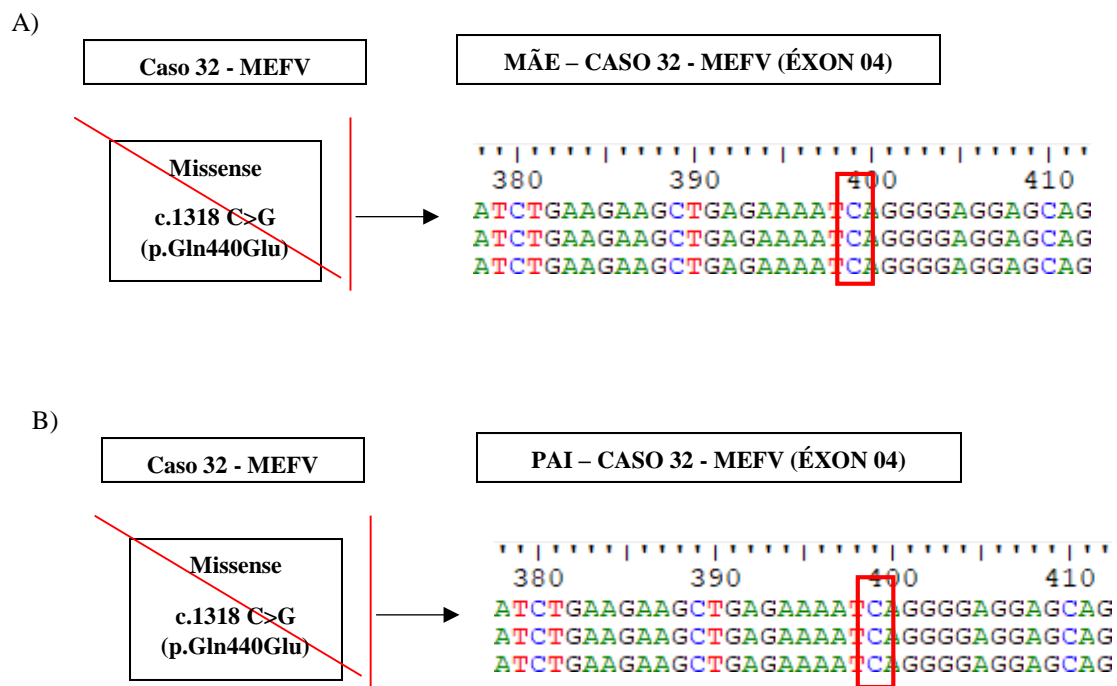


Fig 15. Resultado do Sequenciamento de Sanger do gene *MEFV* da mãe e do pai.

10. Discussão

Nesse trabalho, foi possível estabelecer uma estratégia de análise para a identificação das variantes consideradas como potencialmente candidatas para o fenótipo clínico dos pacientes estudados. Além disso, observamos que dentre todas as variantes encontradas, apenas 18% foram consideradas patogênicas e dentre essas, nenhuma justificava o fenótipo clínico do paciente e muitas foram encontradas em mais de um paciente. Dentre os achados de variantes, o número de variantes com significado incerto foi muito além do esperado, tendo uma estimativa de mais de 60% nos pacientes, que de forma multidisciplinar, foi possível selecionar a variante com potencial de patogenicidade e fechar o caso de 10 pacientes.

Foi possível identificar 6 novas alterações genéticas, consideradas 3 Potencialmente Patogênicas e 3 VUS, relacionadas com Agamaglobulinemia ligada ao X, sendo elas:

- (i) **Caso 04:** c.1111_1112dupTC – p(Arg372ProfsTer32)
- (ii) **Caso 16/Caso 21:** c.1751G>A – p(Gly584Glu)
- (iii) **Caso 19:** c.336C>A – p(Tyr112Ter)
- (iv) **Caso 20:** c.993dupA – p(Arg332ThrfsTer17)
- (v) **Caso 22:** c.1735G>T – p(Asp579Tyr)
- (vi) **Caso 23:** c.167T>A – p(Ile56Lys)

Foi possível identificar 1 nova alteração genética, considerada Potencialmente Patogênica, relacionada com Wiskott-Aldrich, sendo ela:

- (i) **Caso 15:** c.889C>T – p(Gln297Ter)

Foi possível identificar 1 nova alteração genética, considerada VUS, relacionada com Doença Granulomatosa Crônica, sendo ela:

- (i) **Caso 07:** c.483G>A – p(Lys161=)

E por fim, foi possível identificar 1 nova alteração genética, considerada VUS, relacionada com Síndrome de Hiper-IgM do tipo I, sendo ela:

- (i) **Caso 10:** c.436_438delTAC – p(Tyr146del)

Além desses achados, foi possível identificar algumas alterações presentes em mais de um paciente. Devido a esse grupo de doença ser considerado como raro ($<0,01\%$), esses achados foram considerados como erros do sequenciamento.

Nos casos que não foram dados como concluídos, está sendo feita ainda a investigação parental e é possível assim, excluir possíveis genes considerados como potenciais candidatos para o fenótipo clínico através do ranqueamento das mesmas pelo valor de phred.

11. Conclusão

A PID necessita de diagnósticos precisos que indiquem o tratamento mais eficaz. Foi demonstrado nesse estudo, que o uso de filtros específicos, como o uso de um painel virtual contendo genes relacionados com a doença, o uso do MAF, entre outros, facilitam na identificação das variantes consideradas como possíveis candidatas para aquele fenótipo clínico, sendo uma alternativa eficaz para os casos em que apenas a clínica e a genética nos levam ao seu diagnóstico final. Já nos casos em que a clínica não é específica, ou seja, sobreposição de sintomas, indicando mais de um tipo de PID, sem a investigação parental, dificulta ou muitas das vezes, inviabiliza o seu diagnóstico.

Por fim, foi possível concluir, que embora o WES seja uma ferramenta de sequenciamento muito utilizada no diagnóstico de PID, não pode ser usada sozinha, necessitando da ajuda dos médicos, residentes, para conseguir fechar o diagnóstico de forma rápida e eficaz.

12. Referências

1. MCCUSKER, C.; WARRINGTON, R. Primary immunodeficiency. *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, [s.l.], v. 7 Suppl 1, no Suppl 1, p. S11, 2011. ISSN: 1710-1492, DOI: 10.1186/1710-1492-7-S1-S11.
2. Locke BA, Dasu T, Verbsky JW. Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2016 Oct 14];46(2):154–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569953>.
3. BRAGID .: Grupo Brasileiro de Imunodeficiências .: Informações sobre Imunodeficiência Primária [Internet]. Available from: <http://www.imunopediatria.org.br/>
4. Dornas PB, Robazzi TCM V, Silva LR. Imunodeficiência primária: quando investigar, como diagnosticar. *Pediatr (São Paulo)*. 2010;51–62.
5. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. Capucine Picard^{1,2} & H. Bobby Gaspar³ & Waleed Al-Herz⁴, et al.
6. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* [Internet]. 2015 Nov 19 [cited 2016 Oct 14];35(8):696–726. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-015-0201-1>
7. Fudenberg H, Good RA, Goodman HC, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM, et al. Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee. *Pediatrics*. 1971;47:927–46.
8. Recomendações Sociedade de Pediatria de São Paulo Alameda Santos, 211, 5º andar 01419-000 São Paulo, SP (11) 3284-9809 Atualização de Condutas em Pediatria Departamentos Científicos da SPSP, nº 40 gestão 2007-2009.
9. Suavinho E, Napolis ACR de, Segundo GRS, Suavinho É, Napolis ACR de, Segundo GRS. Primary immunodeficiency investigation in patients during and after hospitalization in a pediatric Intensive Care Unit. *Rev Paul Pediatr* [Internet]. 2014 Mar [cited 2016 Oct 14];32(1):32–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-05822014000100032&lng=en&nrm=iso&tlng=en

10. Rosen F, Wedgewood R, Eibl M. Primary immunodeficiency diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 1986;40:166–96.
11. ROSKOSKI, R. Ibrutinib inhibition of Bruton protein-tyrosine kinase (BTK) in the treatment of B cell neoplasms. *Pharmacological Research*, [s.l.], v. 113, no Pt A, p. 395–408, 2016. ISSN: 10436618, DOI: 10.1016/j.phrs.2016.09.011. Murphy 2014
12. Bonilla FA, Geha RS. 12. Primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2017 Jan 12];111(2 Suppl):S571–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12592303>
13. Modell V. The impact of physician education and public awareness on early diagnosis of primary immunodeficiencies: Robert A. Good Immunology Symposium. *Immunol Res* [Internet]. 2007 [cited 2017 Jan 12];38(1-3):43–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917007>
14. Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol* [Internet]. 2007 Sep 23 [cited 2017 Mar 6];27(5):497–502. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-007-9103-1>
15. Smith CI. Experiments of nature: primary immune defects deciphered and defeated. *Immunol Rev.* 2000;178(8):5–7.
16. Modell V, Quinn J, Orange J, Notarangelo LD, Modell F. Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell
17. Centers Global Network. *Immunol Res.* 2016;64(3):736–53.
18. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015 Capucine Picard^{1,2} & Waleed Al-Herz^{3,4} & Aziz Bousfiha⁵ & Jean-Laurent Casanova^{1,6,7,8,9}
19. Locke BA, Dasu T, Verbsky JW. Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2016 Oct 14];46(2):154–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569953>
20. Imunodeficiências primárias (da suspeita clínica ao tratamento) - Serviço de Imunoalergologia, Centro Hospitalar de Sao Joao, EPE, Porto. [Autores] Teresa Vieira, Ana Leblanc, Natacha Santos e José Torres Costa
21. 10 Warning Signs of Primary Immunodeficiency – Jeffrey Model Foundation 2009
22. Modell V. The impact of physician education and public awareness on early diagnosis of primary immunodeficiencies: Robert A. Good Immunology Symposium. *Immunol Res*

- [Internet]. 2007 [cited 2017 Jan 12];38(1-3):43–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917007> Modell V, Quinn J, Orange J, Notarangelo LD, Modell F. Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell;
23. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update – Clinical and Experimental Immunology. E. de Vries in collaboration with European Society for Immunodeficiencies (ESID) members. Department of Pediatrics, Jeron Bosch Hospital, 's-Hertogenbosh, the Netherlands.
 24. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature [Internet]. 1977 Feb 24 [cited 2016 Oct 14];265(5596):687–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/870828>
 25. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. Science [Internet]. 2001 Feb 16 [cited 2016 Oct 14];291(5507):1304–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181995>
 26. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. Science [Internet]. 2001 Feb 16 [cited 2016 Oct 14];291(5507):1304–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181995>
 27. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Oct 14];11(1):31–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069>
 28. NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE, N. TOPMed Whole Genome Sequencing Project. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/GetPdf.cgi?id=phd006969.2>>. Acesso em: 11/fev./19.
 29. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Oct 14];11(1):31–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997069>
 30. FU, W. *et al.* Analysis of 6,515 exomes reveals a recent origin of most human protein-coding variants. v. 493, n. 7431, p. 216–220, 2013.
 31. GLENN T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. Mol. Ecol. Resour., v. 11, n. 5, p. 759-69. 2011.

32. O'ROAK, B. J. et al. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature Genetics*, [s.l.], v. 43, no 6, p.1585–589, 2011. ISSN: 1061-4036, DOI: 10.1038/ng.835.
33. Cock PJ, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res.* 2009;38(6):1767-71.
34. NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Human Mutation*, [s.l.], v. 38, no 7, p. 751–763, 2017b. ISSN: 10597794, DOI: 10.1002/humu.23220.
35. PARAMASIVAM, N. et al. Identification and prioritisation of causal variants in human genetic disorders from exome or whole genome sequencing data. *bioRxiv*, [s.l.], p. 209882, 2017. DOI: 10.1101/209882.
36. SELEMAN, M. et al. Uses of Next-Generation Sequencing Technologies for the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Frontiers in immunology*, [s.l.], v. 8, p.847, 2017. ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/fimmu.2017.00847
37. BAO, R. et al. Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer informatics*, [s.l.], v. 13, no Suppl 2, p. 67–82, 2014. ISSN: 1176-9351, DOI:10.4137/CIN.S13779.
38. ANTONARAKIS, S. E.; COOPER, D. N. Human Gene Mutation in Inherited Disease: Molecular Mechanisms and Clinical Consequences. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, [s.l.], p. 1–48, 2013. ISBN:9780123838346, DOI: 10.1016/B978-0-12-383834-6.00007-0.
39. BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, [s.l.], v. 30, no 15, p. 2114–2120, 2014. ISSN: 1460-2059, DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estratégia de terapia gênica em células tronco hematopoéticas baseada no sistema CRISPR/Cas9 para imunodeficiências primárias

Pesquisador: Zllton Farias Meira de Vasconcelos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 98936818.0.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.984.034

Apresentação do Projeto:

O presente projeto propõe o desenvolvimento de uma estratégia inovadora de terapia gênica, baseada no sistema CRISPR/Cas9, para inserção e correção genética sítio-dirigida em células tronco e progenitoras hematopoiéticas (CTPH), além de estratégias que visam um diagnóstico funcional e molecular dos pacientes com IDP em acompanhamento no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF). Tais estratégias envolvem a avaliação da eficácia, estabilidade e segurança do sistema CRISPR/Cas9 na inserção e correção genética guiada por RNA; a implementação de novas metodologias que contribuem para a determinação das subpopulações linfocitárias funcionais de maneira a auxiliar o processo de um diagnóstico fidedigno, e identificação de variantes genéticas em pacientes com suspeitas clínicas de IDP, utilizando sequenciamento de nova geração.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver uma nova estratégia de terapia gênica baseada no sistema CRISPR/Cas9 para imunodeficiências primárias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco inerente ao projeto está associado à coleta de sangue periférico do paciente, como

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Continuação do Parecer: 2.984.034

hematoma, dor ou outro desconforto no local da coleta.

Em relação a coleta de sangue de cordão umbilical de gestantes doadoras, por ser realizada após o parto, com a retirada da placenta, não apresenta risco à mãe ou ao recém-nascido.

Benefícios:

Como benefício o projeto apresenta a criação de uma plataforma de estudos pré-clínicos, utilizando estratégia de terapia genética eficiente, segura e estável, com uma base sólida no diagnóstico funcional e molecular das IDP, visando o desenvolvimento futuro de ensaios clínicos que promovam tratamentos curativos com a diminuição da taxa de mortalidade e melhor qualidade de vida das crianças afetadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com objetivos e metodologias muito bem descritos. Atende aos preceitos éticos de boas práticas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1074253.pdf	20/10/2018 18:43:01		Aceito
Outros	Carta_resposta_2.pdf	20/10/2018 18:41:07	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Moraes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pendencia.pdf	20/10/2018 18:40:41	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Moraes	Aceito

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 2.984.034

Outros	Declaracao.pdf	10/10/2018 16:44:00	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SCU1.pdf	10/10/2018 16:43:23	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	10/10/2018 16:42:06	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SCU.pdf	19/09/2018 14:02:34	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Outros	Carta_chefia_IFF.pdf	19/09/2018 14:02:08	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_IFF_pacientes.pdf	19/09/2018 14:01:37	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	19/09/2018 13:54:49	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Outros	Carta_de_Aprovacao.pdf	13/09/2018 10:01:38	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Outros	Declaracao2.pdf	13/09/2018 10:00:08	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Outros	Declaracao1.pdf	13/09/2018 09:58:40	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	13/09/2018 09:56:57	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Outros	Termo1.pdf	04/08/2018 17:56:31	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	04/08/2018 17:54:13	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	04/08/2018 17:53:58	Carla Cristina Pedrosa de Lira de Morais	Aceito

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Continuação do Parecer: 2.984.034

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 26 de Outubro de 2018

Assinado por:

**Ana Maria Aranha Magalhães Costa
(Coordenador(a))**

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

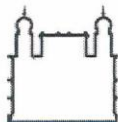
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



IFF

INSTITUTO NACIONAL | FERNANDES FIGUEIRA
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador Responsável

Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos
Pesquisador em Saúde Pública
Doutor em Ciências com ênfase em Imunologia
Unidade de Pesquisa Clínica
Laboratório de Alta Complexidade
Telefone: 21 2554-1918
e-mail: zvasconcelos@iff.fiocruz.br

Médico Responsável

Dra. Sandra Bastos
Ambulatório de Alergia e
Imunologia
Telefones: 21 2554-1772
e-mail: sandramebp@iff.fiocruz.br

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos CEP-IFF

Telefone: 21 2554-1730
e-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa intitulado: "Estratégia de terapia gênica em células tronco hematopoéticas baseada no sistema CRISPR/Cas9 para imunodeficiências primárias".

Esta pesquisa tem por finalidade implementar exames diagnósticos para doenças genéticas que afetam o sistema imunológico da criança e usar essa informação para testes laboratoriais de correção do defeito genético em células humanas. Os exames são baseados em testes de função das células no laboratório, análise da sequência do DNA, identificação do erro no código genético e correção desse erro através de uma terapia genética experimental em laboratório. Essa terapia genética será realizada no excedente de células do sangue ou urina colhido para realização dos exames diagnósticos. Com essa pesquisa poderemos não somente auxiliar no diagnóstico de pacientes portadores dessas patologias, mas também avaliar a segurança e estabilidade da manipulação do código genético em células humanas visando corrigir erros inatos que comprometam a função das células imunológicas. Futuramente, essas informações serão base para a aplicação dessa metodologia para alcançar a cura dos pacientes portadores de diversas patologias genéticas.

Para a sua participação nesta pesquisa você precisa somente permitir o uso do sangue ou urina coletados para exames diagnósticos. No excedente das células que já estão sendo coletadas para os exames, realizaremos modificações genéticas para corrigir o defeito genético. Dessa forma, participar deste estudo não causará nenhum prejuízo ou risco adicional para a sua saúde, além daqueles previstos durante os procedimentos normais para a obtenção de material biológico para a realização dos seus exames diagnósticos. O seu médico irá informá-la sobre os riscos associados à coleta de urina e sangue. **De maneira geral, não há qualquer risco ao paciente na coleta de urina e os riscos mais habituais da coleta de sangue são dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele).** É importante também dizer que a amostra enviada para este estudo não será utilizada para nenhuma outra finalidade. Em caráter informativo, as análises serão realizadas no Laboratório de Alta Complexidade do Instituto

TCLE versão 1

Rúbrica paciente

Rúbrica pesquisador

mk
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA

APROVADO VALIDADE
INÍCIO 26/10/18 FIM 02/11/20
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA-IFF/FIOCRUZ
Telefones 2554-1730 / Tel./Fax 2552-8491
E-mail cepiff@iff.fiocruz.br

Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira/FIOCRUZ (LACIFF).

Todas as informações referentes a esta pesquisa são confidenciais, estarão guardadas em segurança e só serão utilizadas pela equipe de pesquisa. Estas informações estão submetidas às normas de privacidade e confidencialidade do Comitê de Ética em pesquisa do Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ que é o setor responsável por assegurar as normas de pesquisa em seres humanos neste hospital. As informações só serão divulgadas em eventos e publicações científicas, assim como, para compor relatórios técnicos, sem revelar a sua identidade e/ou da família, sendo assegurado, portanto, o sigilo sobre sua participação.

Os resultados dos exames realizados com a sua amostra poderão ser requisitados, por escrito, por você (ou por algum responsável legal) a qualquer momento, e uma via fará parte do seu prontuário no IFF. Esclarecimentos serão fornecidos sempre que solicitados bastando para isso entrar em contato, com o pesquisador responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/IFF-FIOCRUZ). O conteúdo dessas informações não poderá ser usado em nenhum outro estudo ou para qualquer outro propósito sem a autorização por escrito das partes interessadas. Se alguma alteração for detectada você será imediatamente avisado para que a intervenção possa ser instituída.

Sua participação nessa pesquisa é voluntária, caso você decida, a qualquer momento, desligar-se deste estudo não haverá nenhum prejuízo a assistência médica dispensada ao seu bebê. Não há nenhum custo, a você, relacionado aos procedimentos previstos neste estudo assim como não há pagamento por sua participação. É garantido o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

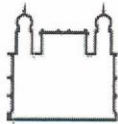
Se você (ou seu parente) tiver alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Pesquisador responsável pelo Projeto ou sua equipe. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira /FIOCRUZ.

Sendo assim, após a literatura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com profissional capacitado, para esclarecer detalhadamente todas as minhas dúvidas, estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades, expreso minha concordância de espontânea vontade em participar do projeto de pesquisa intitulado “Estratégia de terapia gênica em células tronco hematopoéticas baseada no sistema CRISPR/Cas9 para imunodeficiências primárias”. Estou ciente também dos objetivos da

TCLE versão 1

Rúbrica paciente

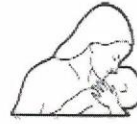
Rúbrica pesquisador



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



IFF

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar.

Declaro que recebi uma cópia assinada e datada deste termo de Consentimento Livre e esclarecido. E permito os pesquisadores deste projeto, me contatar por telefone ou através de mensagem de correio se informações adicionais forem necessárias, conforme informações que constam em meu prontuário no IFF-FIOCRUZ.

Nome do Paciente: _____

Prontuário: _____ Código: _____

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Assinatura do Voluntário (ou responsável legal): _____

Nome Completo (em letra legível): _____

Documento de Identidade: _____ Telefone para contato: _____

Assinatura de uma testemunha: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Instituições envolvidas:

Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Unidade de Pesquisa Clínica

Laboratório de Alta Complexidade

Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo – Rio de Janeiro - Brasil

Telefone/fax: (21) 2554-1918

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos CEP-IFF

Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Telefone: (21) 2554-1730

Email: cepiff@iff.fiocruz.br

TCLE versão 1

Rúbrica paciente

Rúbrica pesquisador

me

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos:
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

APROVADO VALIDADE
INÍCIO 26/10/18 FIM 02/11/18
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA- IFF/FIOCRUZ
Telefones 2554-1730 / Tel./Fax 2552-8491
Email cepiff@iff.fiocruz.br



Rede Carioca de Imunodeficiência Primária – Ficha de coleta de dados clínicos

NOME:			
D. NASC. ____ / ____ / ____	IDADE:	SEXO: () M () F	
NATURALIDADE:	RESPONSÁVEIS:		
SERVIÇO DE ORIGEM:			
MÉDICO RESPONSÁVEL:	CONTATO:		
Exame que deseja realizar:			

HDA:

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS:														
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	Sim		N° DE VEZES	IDADE ÚLTIMO EPISÓDIO	Não		Patógeno Isolado (Quando Pertinente) QUAL (IS)	Internação/N° de vezes			CTI/ N° de vezes			
	Não	Sim			Não	Sim		Não	Sim	N° DE VEZES	Não	Sim	N DE VEZES	
Otite														
PNM sem DP														
PNM com DP														
Tuberculose														
Sinusite														
Amigdalite														
Meningite														
Meningite asséptica														
Piodermite														
Celulite														
Abcesso														
Eczema														
BCGite														
Molusco														
Verruga														
Candidíase														
Vitiligo														
Estomatite														
Osteomielite														
Artrite séptica														
Artrite														
GEA														
Diarreia crônica														
ITU														
Angioedema sem urticária														


OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS:

Endocrinológicas:

Hematológicas:

Outras:

HISTÓRIA:
Gestação: G: _____ Para: _____ Aborto espontâneo (..) IG _____ Aborto provocado (..)

P: _____ C: _____ PC: _____ APGAR: _____

Intercorrências : _____

Uso de medicação na gestação: () Não () Sim Qual? _____

Queda do coto umbilical (dias): _____

H. Vac. completa: () Não () Sim

Hep. A () Varicela () Influenzae () Pnemo 7 ou 10 ou 13 () Pnemo 23 () HPV ()

Cicatriz da BCG? () Não () Sim

Reação vacinal? () Não () Sim Qual? _____

Desenvolvimento Normal? () Não () Sim Descrição: _____

HISTÓRIA FAMILIAR

Consanguinidade:	Mãe	Irmãos	Primos
(..)SIM (..) NÃO	Pai	Tios	Outros
Nacionalidade da Família			
<i>Pai:</i>	<i>Avô paterno:</i>	<i>Avô materno:</i>	
<i>Mãe:</i>	<i>Avó paterna:</i>	<i>Avó materna:</i>	

EXAMES REALIZADOS:

	Data	Data	Data		Data	Data	Data		Data	Data	Data
IgE				CD3 (absolute/relative)				SOROLOGIAS			
IgA				CD4 (absolute/relative)				HAV			
IgG				CD8 (absolute/relative)				HBV			
IgM				CD4/CD8				HCV			
IgD				CD19 (absolute/relative)				HIV			
IgG1				CD 16/56 (absolute/relative)				TOXO			
IgG2				CH50				CMV			
IgG3				DHR				EBV			
IgG4				C3				Herpes			
Isohemaglutininas:				C4				HTLV			
Inibidor C1 esterase				C1 q				Parv B19			

Preencher com NR para os exames não realizados



DATA:

HT:	Hb:	LEUCO: _____ / ___/___/___/___/___/___/___				Plaq.:
Teste de imunidade celular: Data:	PPD: ()	Candidina: ()	Tricofitina: ()	Estreptoquinase: ()	Estafilococcico: ()	Toxoide: ()
Alterações Triagem neonatal? () Não () Sim						
Quais:						

**OUTROS EXAMES REALIZADOS:
RESULTADO/DATA:**

EXAME FÍSICO:

IDADE: ___anos ___meses	PESO _____Kg	ESTATURA: _____cm Baixa estatura (..) Sim (..) Não	Magreza () Eutrófico ()	Sobrepeso () Obeso ()
Facies atípica: () SIM () NÃO				
Descrição:				
Pele e mucosas				
Palidez Cutâneo/Mucosa () Não () Sim	Eczema () Não () Sim		Petéquias () Não () Sim	
Telangiectasia () Não () Sim	Hematoma () Não () Sim			
Amígdalas () Não () Sim				
Alteração dentária () Não () Sim Descrição:				
Alteração em aparelho respiratório: () Não () Sim Descrição:				
Sopro cardíaco () Não () Sim				
Abdome VCM: () Fígado () Baço				
Adenomegalias ? () Não () Sim, Localização:				
Alterações ósseas () Não () Sim Descrição:				
Alteração articular () Não () Sim Descrição:				
Alteração em cabelos e unhas () Não () Sim Descrição:				
Alteração ocular: () Não () Sim Descrição:				
Alteração em genitália e períneo () Não () Sim Descrição:				
Alterações neurológicas () Não () Sim Descrição:				



OBSERVAÇÕES RELEVANTES:	
IMPRESSÃO/HIPÓTESE DIAGNÓSTICA:	Medicações utilizadas atualmente:

O PACIENTE PREENCHE CRITÉRIOS PARA INVESTIGAÇÃO DE IMUNODEFICIÊNCIA PRIMÁRIA? () NÃO () SIM Caso a resposta seja afirmativa, assinale quais.		
		Em menores de 1 ano também considerar os seguintes:
<input type="checkbox"/>	Duas ou mais pneumonias no último ano	<input type="checkbox"/> Infecções fúngicas, virais e/ou bacterianas persistentes ou graves
<input type="checkbox"/>	Quatro ou mais novas otites no último ano	<input type="checkbox"/> Diabetes mellitus persistente ou outra doença autoimune e/ou inflamatória
<input type="checkbox"/>	Estomatites de repetição ou monilíase por mais de dois meses	<input type="checkbox"/> Quadro de sepse, sem identificação de agente infeccioso
<input type="checkbox"/>	Abscessos de repetição ou ectima	<input type="checkbox"/> Lesões cutâneas extensas
<input type="checkbox"/>	Um episódio de infecção sistêmica grave (meningite, osteoartrite, septicemia)	<input type="checkbox"/> Linfopenia ou outra citopenia, ou leucocitose persistentes sem infecção
<input type="checkbox"/>	Infecções intestinais de repetição/diarréia crônica	<input type="checkbox"/> Atraso na queda do coto umbilical (>30 dias)
<input type="checkbox"/>	Asma grave, doença do colágeno ou doença autoimune	<input type="checkbox"/> Hipocalcemia com ou sem convulsão
<input type="checkbox"/>	Efeito adverso ao BCG e/ou infecções por micobactéria	<input type="checkbox"/> Diarréia persistente
<input type="checkbox"/>	Fenótipo clínico sugestivo de IDP	<input type="checkbox"/> Ausência de imagem tímica ao exame radiológico do tórax
<input type="checkbox"/>	História familiar de imunodeficiência	

Chromosome	Gene	Zygosity	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	C1QB	Heterozygous	22661168	G	A	000491.3	VUS	c.544G>A	p.(Val182Met)	AR	19.44
	CSF3R	Heterozygous	36467830	A	G	156039.3	VUS	c.1856T>C	p.(Leu619Ser)	AR	22.7
	LYST	Homozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
2	SMARCAL1	Heterozygous	216428691	A	G	014140.3	VUS	c.1243A>G	p.(Ser415Gly)	AR	5.014
4	TLR3	Heterozygous	186078846	A	G	003265.2	VUS	c.448A>G	p.(Ile150Val)	AD	16.43
5	C7	Heterozygous	40945322	C	G	000587.2	VUS	c.692C>G	p.(Ser231Cys)	AR	9.951
	TMEM173	Heterozygous	139478370	C	T	198282.3	VUS	c.659G>A	p.(Arg220His)	AD	20.9
6	BACH2	Heterozygous	89950371	T	C	021813.3	VUS	c.1735A>G	p.(Ile579Val)	AD	23.7
	TAPBP	Heterozygous	33313327	T	C	172208.2	VUS	c.359A>G	p.(Asp120Gly)	AR	24.8
	TNFAIP3	Heterozygous	137874923	C	T	006290.3	VUS	c.374C>T	p.(Ala125Val)	AD	14.35
8	IKBKB	Heterozygous	42316296	C	T	001556.2	VUS	c.887C>T	p.(Pro296Leu)	AD*	22.0
	VPS13B	Heterozygous	99778960	G	A	017890.4	VUS	c.7783G>A	p.(Asp2595Asn)	AR	24.7
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
	DOCK8	Heterozygous	286527	C	G	203447.3	VUS	c.223C>G	p.(Leu75Val)	AD	19.46
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	FERMT3	Heterozygous	64211367	C	T	178443.2	VUS	c.607C>T	p.(Pro203Ser)	AR	20.7
	TPP1	Heterozygous	6616508	AT	-	000391.3	VUS	c.887-6_887-5delAT	-	AR	-
12	MVK	Heterozygous	109579813	G	A	000431.3	VUS	c.238G>A	p.(Val80Ile)	AR	7.805
	TNFRSF1A	Heterozygous	6333731	A	C	001065.3	VUS	c.322+6T>G	-	AD	9.837
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	CLCN7	Heterozygous	1447000	G	C	001287.5	VUS	c.2331+6C>G	-	AR	4.568
	PARN	Heterozygous	14606479	G	A	002582.3	VUS	c.702+5C>T	-	AR	18.41
17	STAT3	Heterozygous	42324819	T	C	139276.2	VUS	c.1492A>G	p.(Ile498Val)	AD	18.97
18	EPG5	Heterozygous	45837611	C	G	213602.2	VUS	c.211C>G	p.(Arg71Gly)	AR	23.3
19	ELANE	Heterozygous	856145	C	T	001972.2	VUS	c.785C>T	p.(Pro262Leu)	AD	13.30
	STXBP2	Heterozygous	7647787	C	G	001272034.1	VUS	c.1792C>G	p.(Leu598Val)	AR	19.26
20	RTEL1	Heterozygous	63688532	G	A	001283009.1	VUS	c.1727G>A	p.(Arg576His)	AD	13.19
22	IL17RA	Heterozygous	17097910	G	A	014339.6	VUS	c.277G>A	p.(Val93Met)	AR	22.5
	IL17RA	Heterozygous	17109038	G	A	014339.6	VUS	c.1819G>A	p.(Glu607Lys)	AR	17.54

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 01, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Heterozygous	92478758	AG	-	005263.3	VUS	c.925-6_925-5delCT	-	AD	-
	GFI1	Heterozygous	92478759	-	AGAG	005263.3	VUS	c.925-8_925-5dupCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
2	AP1S3	Heterozygous	223765228	AG	-	001039569.1	Likely Path	c.413_414delCT	p.(Ser138Ter)	AR	-
	CTLA4	Heterozygous	203871370	T	A	005214.4	VUS	c.458-8T>A	-	AD	14.30
5	DOCK2	Heterozygous	169654449	G	C	004946.2	VUS	c.90G>C	p.(Gln30His)	AR	20.3
7	SAMD9	Heterozygous	93101365	A	G	017654.3	VUS	c.4733T>C	p.(Ile1578Thr)	AD	22.1
9	DDX58	Homozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
10	PTEN	Heterozygous	87960892	A	T	000314.5	Pathogenic	c.802-2A>T	-	AD	24.7
11	MS4A1	Heterozygous	60468329	C	A	021950.3	VUS	c.755C>A	p.(Thr252Lys)	AR	18.56
	TPP1	Heterozygous	6616508	AT	-	000391.3	VUS	c.887-6_887-5delAT	-	AR	-
12	AICDA	Heterozygous	8604926	-	AA	020661.2	VUS	c.428-6_428-5dupTT	-	AR	-
	KMT2D	Heterozygous	49030394	T	G	003482.3	VUS	c.13885A>C	p.(Thr4629Pro)	AD	33.0
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
17	G6PC3	Heterozygous	44071015	A	C	138387.3	VUS	c.50A>C	p.(Asn17Thr)	AR	19.65
	SLC46A1	Heterozygous	28405926	C	G	080669.5	VUS	c.189G>C	p.(Arg63Ser)	AR	14.0
	TNFRSF13B	Heterozygous	16948947	T	C	012452.2	VUS	c.236A>G	p.(Tyr79Cys)	AD	25.7
18	CCBE1	Heterozygous	59436065	T	G	133459.3	VUS	c.1064A>C	p.(Lys355Thr)	AR	25.2

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 02, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	AK2	Heterozygous	33014560	C	T	001625.3	VUS	c.460G>A	p.(Glu154Lys)	AR	23.3
	GFI1	Heterozygous	92478757	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT*	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	PTPRC	Heterozygous	198748106	C	A	002838.4	VUS	c.2848-3C>A	-	AR	8.619
3	IL17RC	Heterozygous	9920977	C	T	153461.3	VUS	c.835+8C>T	-	AR	13.72
5	DOCK2	Heterozygous	170008564	T	G	004946.2	VUS	c.3140T>G	p.(Phe1047Cys)	AR	33.0
	DOCK2	Heterozygous	170067575	G	T	004946.2	VUS	c.4533G>T	p.(Met1511Ile)	AR	22.8
	TERT	Heterozygous	1279454	G	A	198253.2	VUS	c.1967C>T	p.(Ser656Leu)	AD	17.25
6	TAP1	Heterozygous	32853309	G	C	000593.5	VUS	c.508C>G	p.(Leu170Val)	AR	23.4
8	PRKDC	Heterozygous	47807180	T	C	006904.6	VUS	c.9704A>G	p.(Lys3235Arg)	AR	20.7
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	TPP1	Heterozygous	6616508	AT	-	000391.3	VUS	c.887-6_887-5delAT	-	AR	-
12	MVK	Heterozygous	109576149	A	G	000431.3	VUS	c.226+4A>G	-	AR	17.35
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	POLE	Heterozygous	132661168	A	-	006231.3	VUS	c.2865-4delT	-	AR	-
14	TINF2	Heterozygous	24240759	G	A	001099274.1	VUS	c.721C>T	p.(Pro241Ser)	AD	22.5
16	CORO1A	Heterozygous	30186953	G	A	007074.3	VUS	c.451+8G>A	-	AR	2665
	CYBA	Heterozygous	88648118	C	T	000101.3	VUS	c.59-4G>A	-	AR	4.554
	PARN	Heterozygous	14606479	G	A	002582.3	VUS	c.702+5C>T	-	AR	18.41
17	CARD14	Heterozygous	80181623	G	A	024110.4	VUS	c.185G>A	p.(Arg62Gln)	AD	14.49
18	EPG5	Heterozygous	45870626	G	A	020964.2	VUS	c.6166C>T	p.(Arg2056Trp)	AR	25.2
	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
20	RTEL1	Heterozygous	63690799	C	T	001283009.1	VUS	c.2414-6C>T	-	AD	0.638
	RTEL1	Heterozygous	63694428	G	A	001283009.1	VUS	c.3049G>A	p.(Asp1017Asn)	AD	21.2
22	MKL1	Heterozygous	40418538	G	A	020831.4	VUS	c.1900C>T	p.(Pro634Ser)	AR	15.28
X	ATP6AP1	Hemizygous	154428787	-	GGCGGC	001183.5	VUS	c.111_116dupGGCGGC	p.(Ala40_Ala41dup)	AR	-

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 03, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	COPA	Heterozygous	160311950	T	C	001098398.1	VUS	c.994A>G	p.(Met332Val)	AD	21.5
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	PTPRC	Heterozygous	198748106	C	A	002838.4	VUS	c.2848-3C>A	-	AR	8619
3	IL17RC	Heterozygous	9920977	C	T	153461.3	VUS	c.835+8C>T	-	AR	13.72
4	FAT4	Heterozygous	125487508	A	G	001291303.1	VUS	c.12986A>G	p.(Asp4329Gly)	AR	22.8
5	DOCK2	Heterozygous	169702360	A	G	004946.2	VUS	c.1316A>G	p.(Asn439Ser)	AR	20.3
	PIK3R1	Heterozygous	68280521	C	A	181523.2	VUS	c.635-7C>A	-	AD	10.11
6	BACH2	Heterozygous	90008858	-	GAAA	021813.3	VUS	c.-12-6_-12-3dupTTTC	-	AD	-
7	SAMD9L	Heterozygous	93135196	G	A	152703.3	VUS	c.776C>T	p.(Ala259Val)	AD	9013
8	VPS13B	Heterozygous	99784355	T	C	017890.4	VUS	c.7895T>C	p.(Phe2632Ser)	AR	34.0
	VPS13B	Heterozygous	99832368	G	T	017890.4	Likely Path	c.9406-1G>T	-	AR	22.0
	VPS13B	Heterozygous	99832370	A	T	017890.4	VUS	c.9407A>T	p.(Tyr3136Phe)	AR	16.47
	VPS13B	Heterozygous	99854001	G	A	017890.4	VUS	c.10687G>A	p.(Gly3563Arg)	AR	10.06
9	DDX58	Heterozygous	32481502	-	A	014314.3	VUS	c.1481-6dupT	-	AD	-
10	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
11	ATM	Heterozygous	108326225	G	A	000051.3	VUS	c.6975G>A	p.(Ala2325=)	AR	22.4
	CTSC	Heterozygous	88335088	G	T	001814.4	VUS	c.173-6C>A	-	AR	5494
	TPP1	Heterozygous	6616509	T	-	000391.3	VUS	c.887-6delA	-	AR	-
12	KMT2D	Heterozygous	49031344	G	T	003482.3	VUS	c.13361C>A	p.(Pro4454His)	AD	23.7
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	POLE	Heterozygous	132661168	A	-	006231.3	VUS	c.2865-4delT	-	AR	-
14	TINF2	Heterozygous	24238656	C	G	001283022.1	VUS	c.1162C>G	p.(Leu388Val)	AD	26.5
16	CIITA	Heterozygous	10923332	A	C	001286402.1	VUS	c.*22+7A>C	-	AR	4181
17	CD79B	Heterozygous	63931394	T	G	001039933.1	VUS	c.68-6A>C	-	AR	10.80
18	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
20	RTEL1	Heterozygous	63695333	T	C	001283009.1	VUS	c.3505T>C	p.(Ser1169Pro)	AD	16.69
21	IFNAR2	Heterozygous	33260699	G	A	207585.2	VUS	c.812G>A	p.(Cys271Tyr)	AR	21.9
X	BTK	Hemizygous	101357573	-	GA	001287344.1	Likely Path	c.1111_1112dupTC	p.(Arg372ProfsTer32)	AR	-

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 04, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	C8A	Heterozygous	56874959	G	A	000562.2	VUS	c.182G>A	p.(Arg61Gln)	AR	29.9
	CD55	Heterozygous	207359543	C	A	001114752.2	VUS	c.1200-3C>A	-	AR	9569
	FCN3	Heterozygous	27370924	A	G	003665.2	VUS	c.442T>C	p.(Ser148Pro)	AR	18.42
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
3	GATA2	Heterozygous	128486072	T	G	032638.4	VUS	c.526A>C	p.(Thr176Pro)	AD	24.7
4	NFKB1	Heterozygous	102596306	C	T	003998.3	VUS	c.1469C>T	p.(Thr490Ile)	AD	2.720
5	C9	Heterozygous	39331792	G	A	001737.3	VUS	c.499C>T	p.(Pro167Ser)	AR	24.2
	PIK3R1	Heterozygous	68280521	C	A	181523.2	VUS	c.635-7C>A	-	AD	10.11
6	TAP2	Heterozygous	32822322	-	A	018833.2	VUS	c.1933-5dupT	-	AR	-
9	C8G	Heterozygous	136946694	G	A	000606.2	VUS	c.595+5G>A	-	AR	16.06
	CARD9	Heterozygous	136364501	CT	-	052813.4	Likely Path	c.1492_1493delAG	-	AR	-
10	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
	SLC29A3	Heterozygous	71351597	C	T	018344.5	VUS	c.419C>T	p.(Thr140Met)	AR	11.19
11	CTSC	Heterozygous	11:88335088	G	T	001814.4	VUS	c.173-6C>A	-	AR	5.494
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	POLE	Heterozygous	132661168	AAA	-	006231.3	VUS	c.2865-6_2865-4delTTT	-	AR	-
18	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
20	ITCH	Heterozygous	34445280	G	T	001257137.1	VUS	c.1089-7G>T	-	AR	9273
X	CSF2RA	Hemizygous	1288633	C	T	001161530.1	VUS	c.334C>T	p.(Pro112Ser)	AR	1267

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 05, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	C8A	Heterozygous	56908054	A	G	000562.2	VUS	c.1321A>G	p.(Ile441Val)	AR	12.93
	CFHR1	Heterozygous	196826969	C	T	002113.2	VUS	c.394C>T	p.(Arg132Trp)	AD	17.68
	CSF3R	Heterozygous	36466862	A	G	156039.3	VUS	c.2087T>C	p.(Met696Thr)	AR	3253
	GFI1	Heterozygous	92478758	AG	-	005263.3	VUS	c.925-6_925-5delCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	MASP2	Heterozygous	11045504	G	C	006610.3	VUS	c.448C>G	p.(Pro150Ala)	AR	5.046
	PTPRC	Heterozygous	198748106	C	A	002838.4	VUS	c.2848-3C>A	-	AR	8619
	VPS45	Heterozygous	150093545	A	G	007259.4	VUS	c.1390A>G	p.(Thr464Ala)	AR	24.6
6	BACH2	Heterozygous	89932532	G	A	021813.3	VUS	c.2402C>T	p.(Pro801Leu)	AD	21.1
8	VPS13B	Heterozygous	99193027	G	A	017890.4	VUS	c.2485G>A	p.(Ala829Thr)	AR	15.37
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
	DOCK8	Heterozygous	399245	C	A	203447.3	VUS	c.3220C>A	p.(His1074Asn)	AR	20.8
11	ATM	Heterozygous	108287685	G	A	000051.3	VUS	c.4079G>A	p.(Ser1360Asn)	AR	16.67
	IL10RA	Heterozygous	117988450	A	G	001558.3	VUS	c.136A>G	p.(Thr46Ala)	AR	13.76
	SERPING1	Heterozygous	57600110	A	C	000062.6	VUS	c.283A>C	p.(Thr95Pro)	AD	6485
	SERPING1	Heterozygous	57600113	A	C	000062.6	VUS	c.286A>C	p.(Thr96Pro)	AD	1571
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
15	INO80	Heterozygous	40983044	C	G	017553.2	VUS	c.4271G>C	p.(Arg1424Pro)	AR	32.0
	INO80	Heterozygous	41072066	G	T	017553.2	VUS	c.1396-8C>A	-	AR	4836
17	TMC6	Heterozygous	78121043	G	A	007267.6	VUS	c.1505C>T	p.(Pro502Leu)	AR	25.7
18	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
19	NLRP2	Heterozygous	54983434	C	T	001174081.1	VUS	c.1736C>T	p.(Pro579Leu)	AR	0.029
20	DNMT3B	Heterozygous	32792618	C	T	006892.3	VUS	c.922-8C>T	-	AR	12.74
X	KDM6A	Hemizygous	45059014	C	A	001291415.1	Likely Path	c.884C>A	p.(Ser295Ter)	AR	36.0

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 06, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Heterozygous	92478757	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	MYSM1	Heterozygous	58668978	T	C	001085487.2	VUS	c.1716+6A>G	-	AR	5478
	NCF2	Heterozygous	183560204	G	A	001127651.2	VUS	c.1360C>T	p.(Pro454Ser)	AR	8.070
	PTPRC	Heterozygous	198748106	C	A	002838.4	VUS	c.2848-3C>A	-	AR	8619
	RFX5	Heterozygous	151344722	A	C	000449.3	VUS	c.353+6T>G	-	AR	21.2
2	SP110	Heterozygous	230212913	G	T	080424.2	VUS	c.431C>A	p.(Pro144His)	AR	8101
4	CFI	Heterozygous	109760523	C	T	000204.3	VUS	c.772G>A	p.(Ala258Thr)	AR	23.2
	FAT4	Heterozygous	125416581	C	T	001297303.1	VUS	c.6977C>T	p.(Thr2326Ile)	AR	9111
5	TTC37	Heterozygous	95507015	A	-	014639.3	VUS	c.3015-4delT	-	AR	-
7	IKZF1	Heterozygous	50400287	A	C	006060.5	VUS	c.1220A>C	p.(Gln407Pro)	AD	23.3
	IKZF1	Heterozygous	50400288	G	C	006060.5	VUS	c.1221G>C	p.(Gln407His)	AD	18.58
8	VPS13B	Heterozygous	99102976	C	T	017890.4	Likely Path	c.436C>T	p.(Arg146Ter)	AR	35.0
9	DDX58	Heterozygous	32481480	G	T	014314.3	VUS	c.1498C>A	p.(Gln500Lys)	AD	22.3
	DDX58	Heterozygous	32481486	G	T	014314.3	VUS	c.1492C>A	p.(Gln498Lys)	AD	19.13
	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
10	BLNK	Heterozygous	96204095	G	A	013314.3	VUS	c.903-7C>T	-	AR	14.52
11	CTSC	Heterozygous	88335088	G	T	001814.4	VUS	c.173-6C>A	-	AR	5.494
	SLC37A4	Heterozygous	119027787	G	A	001164278.1	VUS	c.467C>T	p.(Ala156Val)	AR	22.9
12	AICDA	Heterozygous	8604926	C	A	020661.2	VUS	c.428-4G>T	-	AR	0.028
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
13	TNFSF11	Heterozygous	42574404	C	G	003701.3	VUS	c.101C>G	p.(Pro34Arg)	AR	22.3
16	CIITA	Heterozygous	10923332	A	T	001286402.1	VUS	c.*22+7A>T	-	AR	3862
17	TMC6	Heterozygous	78126611	C	T	007267.6	VUS	c.94G>A	p.(Asp32Asn)	AR	10.82
18	MALT1	Heterozygous	58681179	C	G	006785.3	VUS	c.219C>G	p.(Asp73Glu)	AR	19.18
	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
19	LIG1	Heterozygous	48157104	G	A	000234.2	VUS	c.280C>T	p.(Arg94Cys)	AR	14.66
20	RTEL1	Heterozygous	63688532	G	A	001283009.1	VUS	c.1727G>A	p.(Arg576His)	AD	13.19
X	CYBB	Hemizygous	37793810	G	A	000397.3	VUS	c.483G>A	p.(Lys161=)	AR	20.3

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 07, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	NLRP3	Heterozygous	247424287	G	C	001079821.2	VUS	c.844G>C	p.(Asp282His)	AD	23.4
	NLRP3	Heterozygous	247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
	PTPRC	Heterozygous	198748106	C	A	002838.4	VUS	c.2848-3C>A	-	AR	8619
2	IFIH1	Heterozygous	162277580	C	A	022168.3	Likely Path	c.1879G>T	p.(Glu627Ter)	AD	36.0
	SP110	Heterozygous	230212926	-	GC	080424.2	Likely Path	c.417_418insGC	p.(Pro140AlafsTer32)	AR	-
	SP110	Heterozygous	230212928	A	C	080424.2	VUS	c.416T>G	p.(Leu139Arg)	AR	15.78
3	IL17RC	Heterozygous	9928379	G	A	153461.3	VUS	c.1165G>A	p.(Ala389Thr)	AR	22.8
5	PIK3R1	Heterozygous	68280521	C	A	181523.2	VUS	c.635-7C>A	-	AD	10.11
	TTC37	Heterozygous	95507014	-	A	014639.3	VUS	c.3015-4dupT	-	AR	-
6	TRAF3IP2	Homozygous	111591268	G	C	147686.3	VUS	c.819C>G	p.(His273Gln)	AR	22.1
7	PMS2	Heterozygous	5997426	G	-	000535.5	VUS	c.706-3delC	-	AR	-
	PMS2	Heterozygous	5997427	A	T	000535.5	VUS	c.706-4T>A	-	AR	8.600
8	PRKDC	Heterozygous	47789225	A	T	006904.6	VUS	c.10684T>A	p.(Leu3562Met)	AR	23.2
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
	DDX58	Heterozygous	32526147	C	T	014314.3	VUS	c.20G>A	p.(Arg7His)	AD	8910
12	TBK1	Heterozygous	64497641	G	T	013254.3	VUS	c.1960-7G>T	-	AD	10.89
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
18	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
19	LIG1	Heterozygous	48136117	C	T	000234.2	VUS	c.1340G>A	p.(Ser447Asn)	AR	22.1
20	RTEL1	Heterozygous	63661503	C	T	001283009.1	VUS	c.301+7C>T	-	AD	10.73
22	TNFRSF13C	Homozygous	41925447	G	A	052945.3	VUS	c.475C>T	p.(His159Tyr)	AR	27.0

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 08, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	ADAR	Heterozygous	154602598	T	G	001111.4	VUS	c.44A>C	p.(His15Pro)	AR	6968
	FCN3	Heterozygous	27370971	A	C	003665.2	VUS	c.395T>G	p.(Val132Gly)	AR	23.8
	GFI1	Heterozygous	92478757	-	AGAG	005263.3	VUS	c.925-8_925-5dupCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	NLRP3	Heterozygous	247424287	G	C	001079821.2	VUS	c.844G>C	p.(Asp282His)	AD	23.4
	NLRP3	Heterozygous	247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
2	SMARCAL1	Heterozygous	216428691	A	G	014140.3	VUS	c.1243A>G	p.(Ser415Gly)	AR	5014
	STAT1	Heterozygous	190974932	A	C	007315.3	VUS	c.2136T>G	p.(Val712=)	AD	14.67
4	NFKB1	Heterozygous	102596306	C	T	003998.3	VUS	c.1469C>T	p.(Thr490Ile)	AD	2720
5	DOCK2	Heterozygous	169712179	G	A	004946.2	VUS	c.1615G>A	p.(Gly539Arg)	AR	31.0
6	PSMB8	Heterozygous	32842772	C	T	148919.3	VUS	c.307G>A	p.(Val103Met)	AD	7811
	C8G	Heterozygous	136945926	C	T	000606.2	VUS	c.276-3C>T	-	AR	9.841
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
11	CTSC	Heterozygous	88312454	T	C	001814.4	VUS	c.419A>G	p.(Lys140Arg)	AR	19.72
	CTSC	Heterozygous	88335088	G	T	001814.4	VUS	c.173-6C>A	-	AR	5494
	TPP1	Heterozygous	6616509	T	-	000391.3	VUS	c.887-6delA	-	AR	-
	UNC93B1	Heterozygous	67999234	G	A	030930.3	VUS	c.626C>T	p.(Pro209Leu)	AR	23.9
	UNC93B1	Heterozygous	68003029	G	T	030930.3	VUS	c.385C>A	p.(Leu129Ile)	AR	27.9
12	KMT2D	Heterozygous	49031704	G	A	003482.3	VUS	c.13001C>T	p.(Ala4334Val)	AD	19.51
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
15	NSMCE3	Heterozygous	29269402	T	C	138704.3	VUS	c.304A>G	p.(Lys102Glu)	AR	24.9
16	MEFV	Heterozygous	3254482	C	A	000243.2	VUS	c.586G>T	p.(Gly196Trp)	AD	13.19
17	TNFRSF13B	Heterozygous	16939675	C	T	012452.2	VUS	c.754G>A	p.(Asp252Asn)	AD	9367
18	EPG5	Heterozygous	45865758	T	A	020964.2	VUS	c.6623A>T	p.(Asp2208Val)	AR	34.0
19	CFD	Heterozygous	860780	G	T	001928.2	VUS	c.212+7G>T	-	AR	10.70
	IRF3	Heterozygous	49659723	G	A	001197122.1	VUS	c.1225C>T	p.(His409Tyr)	AD	22.4
20	ITCH	Heterozygous	34445285	A	T	001257137.1	Likely Path	c.1089-2A>T	-	AR	26.4
22	NCF4	Heterozygous	36864973	C	T	013416.3	VUS	c.172C>T	p.(Arg58Cys)	AR	31.0

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 09, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygosity	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
3	TFRC	Heterozygous	196065436	TC	-	001128148.1	VUS	c.1198+6_1198+7delGA	-	AR	-
5	DOCK2	Heterozygous	170079145	G	A	004946.2	VUS	c.5165G>A	p.(Arg1722Gln)	AR	24.6
	OTULIN	Heterozygous	14681484	G	T	138348.4	VUS	c.345G>T	p.(Gln115His)	AR	16.48
8	MCM4	Heterozygous	47970029	G	C	005914.3	VUS	c.1406G>C	p.(Ser469Thr)	AR	29.6
12	KMT2D	Heterozygous	49053044	G	A	003482.3	VUS	c.983C>T	p.(Ala328Val)	AD	13.99
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	POLE	Heterozygous	132626154	C	T	006231.3	VUS	c.6494G>A	p.(Arg2165His)	AR	27.3
15	INO80	Heterozygous	41072066	G	T	017553.2	VUS	c.1396-8C>A	-	AR	4.836
19	JAK3	Heterozygous	17834887	C	T	000215.3	VUS	c.2164G>A	p.(Val722Ile)	AR	15.49
20	ITCH	Heterozygous	34445285	A	T	001257137.1	Likely Path	c.1089-2A>T	-	AR	26.4
	RTEL1	Heterozygous	63694435	A	G	001283009.1	VUS	c.3056A>G	p.(Gln1019Arg)	AD	10.93
X	CD40LG	Hemizygous	136659062	TAC	-	000074.2	VUS	c.436_438delTAC	p.(Tyr146del)	AR	-

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 10, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Heterozygous	Chr01:92478757	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	Chr01:235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	NLRP3	Heterozygous	Chr01:247424287	G	C	001079821.2	VUS	c.844G>C)	p.(Asp282His)	AD	23.4
	NLRP3	Heterozygous	Chr01:247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
	NLRP3	Heterozygous	Chr01:247424302	A	C	001079821.2	VUS	c.859A>C	p.(Ile287Leu)	AD	9144
	NLRP3	Heterozygous	Chr01:247424303	T	A	001079821.2	VUS	c.860T>A	p.(Ile287Asn)	AD	21.2
2	NBAS	Heterozygous	Chr02:15167106	G	T	015909.3	VUS	c.7058C>A	p.(Thr2353Asn)	AR	24.6
6	BACH2	Heterozygous	Chr06:89950854	C	T	021813.3	VUS	c.1252G>A	p.(Ala418Thr)	AD	18.35
	TAP2	Heterozygous	Chr06:32822322	-	A	018833.2	VUS	c.1933-5dupT	-	AR	-
	TNFAIP3	Heterozygous	Chr06:137880103	A	C	006290.3	VUS	c.1939A>C	p.(Thr647Pro)	AD	13.07
8	VPS13B	Heterozygous	Chr08:99115693	A	G	017890.4	VUS	c.9337-4delT	-	AR	10.25
	PRKDC	Heterozygous	Chr08:47819514	A	-	006904.6	VUS	c.9337-4delT	-	AR	-
9	DDX58	Heterozygous	Chr09:32481502	-	A	014314.3	VUS	c.1481-6dupT	-	AD	-
	DOCK8	Heterozygous	Chr09:463555	C	T	203447.3	VUS	c.6107C>T	p.(Thr2036Met)	AR	19.06
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	MEFV	Heterozygous	Chr16:3256491	C	A	000243.2	VUS	c.97G>T	p.(Val33Leu)	AD	10.76
	USB1	Heterozygous	Chr16:58009998	G	A	024598.3	VUS	c.335G>A	p.(Arg112Gln)	AR	18.93
17	CARD14	Heterozygous	Chr17:80184162	G	A	024110.4	VUS	c.599G>A	p.(Ser200Asn)	AD	3.737
	TMC6/TMC8	Heterozygous	Chr17:78132339	A	C	152468.4 007267.6	Likely Path	c.-75+2T>G c.299-20A>C	-	AR	7.734
19	IL12RB1	Heterozygous	Chr19:18063933	G	C	001290024.1	VUS	c.1681C>G	p.(Arg561Gly)	AR	27.1

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 11, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Heterozygous	92478758	AGAGAGAGAG	-	005263.3	VUS	c.925-14_925-5delCTCTCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
2	CDCA7	Heterozygous	173363252	T	G	031942.4	VUS	c.411T>G	p.(Cys137Trp)	AR	21.6
	TTC7A	Heterozygous	46941717	C	G	001288951.1	VUS	c.176C>G	p.(Pro59Arg)	AR	10.30
4	LRBA	Heterozygous	150851989	T	A	006726.4	VUS	c.3721A>T	p.(Ile1241Phe)	AR	25.2
7	SNX10	Heterozygous	26371813	T	A	013322.2	VUS	c.312-8T>A	-	AR	0.127
9	C5	Heterozygous	120974795	A	G	001735.2	VUS	c.4001T>C	p.(Leu1334Pro)	AR	29.9
	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	IL10RA	Heterozygous	117989590	G	A	001558.3	VUS	c.337G>A	p.(Val113Ile)	AR	0.002
	IL10RA	Heterozygous	117998976	G	A	001558.3	VUS	c.1072G>A	p.(Asp358Asn)	AR	8.476
	IL10RA	Heterozygous	117999139	G	A	001558.3	VUS	c.1235G>A	p.(Arg412Gln)	AR	7.663
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	TNFRSF1A	Heterozygous	6333477	C	T	001065.3	Pathogenic	c.362G>A	p.(Arg121Gln)	AD	14.59
18	CCBE1	Heterozygous	59697320	C	T	133459.3	VUS	c.23G>A	p.(Arg8Gln)	AR	25.5
19	IL12RB1	Heterozygous	18072285	C	T	001290024.1	VUS	c.968G>A	p.(Arg323Gln)	AR	3.138
20	ITCH	Heterozygous	34445280	-	TT	001257137.1	VUS	c.1089-7_1089-6insTT	-	AR	-
22	ITCH	Heterozygous	34445281	A	T	001257137.1	VUS	c.1089-6A>T	-	AR	11.68
	MKL1	Heterozygous	40419119	C	T	020831.4	VUS	c.1319G>A	p.(Gly440Glu)	AR	22.4

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 12, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	CFHR4	Heterozygous	196902462	T	C	001201550.2	VUS	c.103T>C	p.(Tyr35His)	AD	15.65
	CFHR4	Heterozygous	196907398	G	C	001201550.2	VUS	c.699G>C	p.(Trp233Cys)	AD	17.45
	FCN3	Heterozygous	27370969	A	C	003665.2	VUS	c.397T>G	p.(Phe133Val)	AR	23.4
	GFI1	Heterozygous	92478757	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	RFX5	Heterozygous	151343848	C	T	000449.3	VUS	c.590G>A	p.(Arg197Gln)	AR	22.7
4	CFI	Heterozygous	109761645	T	A	000204.3	VUS	c.530A>T	p.(Asn177Ile)	AR	21.3
5	C6	Heterozygous	41153995	G	A	001115131.2	VUS	c.2105C>T	p.(Thr702Met)	AR	12.07
7	CARD11	Heterozygous	2939861	A	G	032415.5	VUS	c.752T>C	p.(Leu251Pro)	AD	23.0
8	PRKDC	Heterozygous	47819514	AA	-	006904.6	VUS	c.9337-5_9337-4delITT	-	AR	-
	PRKDC	Heterozygous	47859751	A	G	006904.6	VUS	c.6067T>C	p.(Ser2023Pro)	AR	17.96
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
10	NFKB2	Heterozygous	102401177	C	T	001077494.3	VUS	c.2072-3C>T	-	AD	14.25
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	TPP1	Heterozygous	6616508	AT	-	000391.3	VUS	c.887-6_887-5delAT	-	AR	-
12	AICDA	Heterozygous	8604926	-	AA	020661.2	VUS	c.428-6_428-5dupTT	-	AR	-
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	CLCN7	Heterozygous	1447000	G	C	001287.5	VUS	c.2331+6C>G	-	AR	4568
17	CARD14	Heterozygous	80189840	C	T	024110.4	VUS	c.931C>T	p.(Arg311Trp)	AD	23.5
	NLRP1	Heterozygous	5559354	T	C	033004.3	VUS	c.1342A>G	p.(Ile448Val)	AR	8.327
19	PEPD	Heterozygous	33391353	G	A	000285.3	VUS	c.1094C>T	p.(Pro365Leu)	AR	33.0

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 13, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	C8A	Heterozygous	56917684	C	T	000562.2	VUS	c.1723C>T	p.(Pro575Ser)	AR	17.12
	GFI1	Heterozygous	92478757	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	NLRP3	Heterozygous	247424287	G	C	001079821.2	VUS	c.844G>C	p.(Asp282His)	AD	23.4
	NLRP3	Heterozygous	247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
2	CASP8	Heterozygous	201266475	C	A	001080125.1	VUS	c.166C>A	p.(Pro56Thr)	AD	4557
	NBAS	Heterozygous	15186776	G	A	015909.3	VUS	c.6677C>T	p.(Ser2226Phe)	AR	26.5
9	DDX58	Heterozygous	32481502	-	A	014314.3	VUS	c.1481-6dupT	-	AD	-
	ERCC6L2	Heterozygous	96012640	A	C	020207.4	VUS	c.4123A>C	p.(Thr1375Pro)	AR	21.7
11	CTSC	Heterozygous	88335088	-	A	001814.4	VUS	c.173-7dupT	-	AR	-
	TPP1	Heterozygous	6616509	T	-	000391.3	VUS	c.887-6delA	-	AR	-
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	POLE	Heterozygous	132661162	T	A	006231.3	VUS	c.2867A>T	p.(Tyr956Phe)	AR	24.6
14	MTHFD1	Heterozygous	64449480	G	A	005956.3	VUS	c.2315G>A	p.(Arg772His)	AR	19.6
16	CLCN7	Heterozygous	1447000	G	C	001287.5	VUS	c.2331+6C>G	-	AR	4568
18	EPG5	Heterozygous	45865766	AA	-	020964.2	VUS	c.6622-8_6622-7delTT	-	AR	-
22	NCF4	Heterozygous	36875695	G	A	013416.3	VUS	c.670G>A	p.(Val224Met)	AR	26.6

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 14, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Homozygous	92478758	AG	-	005263.3	VUS	c.925-6_925-5delCT	-	AD	-
	NLRP3	Heterozygous	247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
	NLRP3	Heterozygous	247424298	A	-	001079821.2	Likely Path	c.855delA	p.(Ile287SerfsTer5)	AD	-
	NLRP3	Heterozygous	247424302	AT	-	001079821.2	Likely Path	c.859_860delAT	p.(Ile287ProfsTer19)	AD	-
2	NLRC4	Heterozygous	32224763	C	A	021209.4	VUS	c.2785G>T	p.(Ala929Ser)	AD	15.94
5	TTC37	Heterozygous	95507014	-	A	014639.3	VUS	c.3015-4dupT	-	AR	-
	TTC37	Heterozygous	95525618	C	T	014639.3	VUS	c.1190G>A	p.(Arg397Gln)	AR	16.55
6	TAP1	Heterozygous	32845644	G	T	000593.5	VUS	c.2362C>A	p.(Gln788Lys)	AR	23.1
	TAP1	Heterozygous	32849038	G	T	000593.5	VUS	c.1509C>A	p.(Asn503Lys)	AR	21.1
	TAP2	Heterozygous	32830070	T	C	000544.3	VUS	c.1655A>G	p.(Glu552Gly)	AR	34.0
7	SAMD9	Heterozygous	93101432	C	T	017654.3	VUS	c.4666G>A	p.(Ala1556Thr)	AD	3.590
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
	DOCK8	Heterozygous	215060	G	T	203447.3	VUS	c.53+31G>T	-	AR	12.95
11	ATM	Heterozygous	108272593	A	C	000051.3	VUS	c.3139A>C	p.(Lys1047Gln)	AR	22.7
	TPP1	Heterozygous	6616509	T	-	000391.3	VUS	c.887-6delA	-	AR	-
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
15	BLM	Heterozygous	90760275	A	G	000057.3	VUS	c.1216A>G	p.(Ile406Val)	AR	9451
X	POLA1	Hemizygous	24826487	G	C	016937.3	VUS	c.3604G>C	p.(Asp1202His)	AR	25.3
	WAS	Hemizygous	48688411	C	T	000377.2	Likely Path	c.889C>T	p.(Gln297Ter)	AR	35.0

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 15, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	LYST	Homozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	NLRP3	Heterozygous	247424287	G	C	001079821.2	VUS	c.844G>C	p.(Asp282His)	AD	23.4
2	CD8A	Heterozygous	86789660	C	A	001145873.1	VUS	c.494G>T	p.(Arg165Leu)	AR	20.7
	IFIH1	Heterozygous	162276684	T	C	022168.3	VUS	c.2304+3A>G	-	AD	13.6
	IL1RN	Heterozygous	113132866	G	A	173841.2	VUS	c.538G>A	p.(Glu180Lys)	AR	8488
3	PRKCD	Heterozygous	53188866	G	A	006254.3	VUS	c.1554+8G>A	-	AR	1771
4	FAT4	Heterozygous	125320565	T	C	001291303.1	VUS	c.4154T>C	p.(Leu1385Ser)	AR	22.9
	SH3BP2	Heterozygous	2829549	C	A	001145856.1	VUS	c.814C>A	p.(Pro272Thr)	AD	22.2
8	VPS13B	Heterozygous	99820031	A	G	017890.4	Pathogenic	c.8978A>G	p.(Asn2993Ser)	AR	25.2
9	C5	Heterozygous	121023460	G	T	001735.2	VUS	c.1060C>A	p.(Leu354Met)	AR	23.0
	DDX58	Heterozygous	32481502	-	A	014314.3	VUS	c.1481-6dupT	-	AD	-
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	NFAT5	Heterozygous	69695273	C	T	138713.3	VUS	c.4552C>T	p.(Pro1518Ser)	AD	21.6
17	NLRP1	Heterozygous	5559485	C	T	033004.3	VUS	c.406G>A	p.(Val136Ile)	AR	8182
	NLRP1	Heterozygous	5582712	C	T	033004.3	VUS	c.1211G>A	p.(Arg404Gln)	AR	4.279
	NLRP1	Heterozygous	5558978	G	C	033004.3	VUS	c.1718C>G	p.(Ser573Cys)	AR	24.5
	TMC6	Heterozygous	78121043	G	A	007267.6	VUS	c.1505C>T	p.(Pro502Leu)	AR	25.7
19	FAAP24	Heterozygous	32976521	G	A	152266.4	VUS	c.487G>A	p.(Val163Met)	AR	33.0
20	DNMT3B	Heterozygous	32787405	C	T	006892.3	VUS	c.608C>T	p.(Pro203Leu)	AR	16.06
21	ITGB2	Heterozygous	44903541	G	A	001127491.2	Pathogenic	c.329-6C>T	-	AR	0.010
22	IL17RA	Heterozygous	17098819	C	A	014339.6	VUS	c.355C>A	p.(Leu119Met)	AR	15.69
X	BTK	Hemizygous	101353351	C	T	001287344.1	VUS	c.1751G>A	p.(Gly584Glu)	AR	25.6
	FOXP3	Hemizygous	49264848	A	G	*	VUS	-	-	AR	13.19

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 16, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	CR2	Heterozygous	207472819	G	T	001006658.2	VUS	c.1618G>T	p.(Gly540Trp)	AR	16.49
	CSF3R	Heterozygous	36468067	A	G	156039.3	VUS	c.1723+8T>C	-	AR	16.66
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	LYST	Heterozygous	235808915	C	T	001301365.1	VUS	c.1903G>A	p.(Ala635Thr)	AR	23.6
	NLRP3	Heterozygous	247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
2	NHEJ1	Heterozygous	219147683	T	C	024782.2	VUS	c.503A>G	p.(Gln168Arg)	AR	15.90
	TTC7A	Heterozygous	46995189	G	A	001288951.1	VUS	c.1055G>A	p.(Ser352Asn)	AR	26.4
3	GATA2	Heterozygous	128486072	G	T	128486072	VUS	c.526A>C	p.(Thr176Pro)	AD	24.7
	RNF168	Heterozygous	196472054	G	A	152617.3	VUS	c.1481C>T	p.(Pro494Leu)	AR	14.0
6	TAPBP	Heterozygous	33305295	T	G	172208.2	VUS	c.562A>C	p.(Thr188Pro)	AR	21.7
8	PRKDC	Heterozygous	47935841	G	T	006904.6	VUS	c.1338C>A	p.(Phe446Leu)	AR	22.3
	VPS13B	Heterozygous	99832368	G	T	001115131.2	Likely Path	c.9406-1G>T	-	AR	22.0
	VPS13B	Heterozygous	99832370	A	T	017890.4	VUS	c.9407A>T	p.(Tyr3136Phe)	AR	16.47
	VPS13B	Heterozygous	99832375	C	G	017890.4	VUS	c.9412C>G	p.(Arg3138Gly)	AR	20.9
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
	ERCC6L2	Heterozygous	95881197	C	G	020207.4	VUS	c.408C>G	p.(Asp136Glu)	AR	20.3
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	IRF7	Heterozygous	613325	-	TGCCCA	004031.2	VUS	c.1151_1156dupTGGGCA	p.(Met384_Gly385dup)	AR	-
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
17	CARD14	Heterozygous	80184162	G	A	024110.4	VUS	c.599G>A	p.(Ser200Asn)	AD	3.737
	TNFSF12	Heterozygous	7556823	G	T	003809.2	VUS	c.419G>T	p.(Ser140Ile)	AD	26.6
19	IRF3	Heterozygous	49659714	G	T	49659714	VUS	c.1234C>A	p.(Pro412Thr)	AD	22.9
	TICAM1	Heterozygous	4817899	G	A	182919.3	VUS	c.479C>T	p.(Ser160Phe)	AD	25.6
X	POLA1	Hemizygous	24814979	C	G	016937.3	VUS	c.3279C>G	p.(Asn1093Lys)	AR	20.1

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 17, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	C8B	Heterozygous	56949674	C	T	000066.3	VUS	c.745G>A	p.(Ala249Thr)	AR	1.710
	CD55	Heterozygous	207359538	A	T	001300904.1	VUS	c.*20-8A>T	-	AR	6.043
	GFI1	Heterozygous	92478758	AG	-	005263.3	VUS	c.925-6_925-5delCT	-	AD	-
	MYSM1	Heterozygous	58682127	T	G	001085487.2	VUS	c.917A>C	p.(Lys306Thr)	AR	11.94
2	ADAM17	Heterozygous	9490409	G	A	003183.4	VUS	c.2243C>T	p.(Ala748Val)	AR	7678
5	C6	Homozygous	41176505	G	-	001115131.2	Likely Path	c.1138delC	p.(Gln380SerfsTer7)	AR	-
6	CFB	Heterozygous	31949564	A	C	001710.5	VUS	c.1408+7A>C	-	AD	2.293
	TRAF3IP2	Heterozygous	111591896	T	G	47686.3	VUS	c.191A>C	p.(His64Pro)	AR	7.242
8	PRKDC	Heterozygous	47774382	A	-	006904.6	VUS	c.12183-5delT	-	AR	-
9	DOCK8	Heterozygous	215060	G	T	203447.3	VUS	c.53+31G>T	-	AR	12.95
10	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
11	CD3G	Heterozygous	118349035	G	A	000073.2	VUS	c.64G>A	p.(Ala22Thr)	AR	14.44
	CTSC	Heterozygous	88335088	G	T	001814.4	VUS	c.173-6C>A	-	AR	5.494
	TPP1	Heterozygous	6616509	T	-	000391.3	VUS	c.887-6delA	-	AR	-
12	KMT2D	Heterozygous	49046429	T	C	003482.3	VUS	c.4419-5A>G	-	AD	9154
	KMT2D	Heterozygous	49051760	T	A	003482.3	VUS	c.1923A>T	p.(Glu641Asp)	AD	11.43
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
13	TPP2	Heterozygous	102597171	A	C	003291.2	VUS	c.133A>C	p.(Thr45Pro)	AR	27.5
	TPP2	Heterozygous	102597178	T	G	003291.2	VUS	c.140T>G	p.(Val47Gly)	AR	28.2
16	CORO1A	Heterozygous	30186953	G	A	007074.3	VUS	c.451+8G>A	-	AR	2.665
	IL21R	Heterozygous	27430090	G	A	181079.4	VUS	c.85G>A	p.(Ala29Thr)	AR	9213
17	UNC13D	Heterozygous	75835401	G	C	199242.2	VUS	c.1848+8C>G	-	AR	7.275
19	IRF3	Heterozygous	49659723	G	A	001197122.1	VUS	c.1225C>T	p.(His409Tyr)	AD	22.4
	TICAM1	Heterozygous	4817645	C	T	182919.3	VUS	c.733G>A	p.(Gly245Ser)	AD	1.599
22	MKL1	Heterozygous	40418538	G	A	020831.4	VUS	c.1900C>T	p.(Pro634Ser)	AR	15.28

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 18, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Heterozygous	92478758	AG	-	005263.3	VUS	c.925-6_925-5delCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	NLRP3	Heterozygous	247424287	G	C	001079821.2	VUS	c.844G>C	p.(Asp282His)	AD	23.4
	NLRP3	Heterozygous	247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
2	NBAS	Heterozygous	15394267	G	A	015909.3	VUS	c.3217C>T	p.(Arg1073Cys)	AR	24.1
4	WDR1	Heterozygous	10083112	G	C	017491.3	VUS	c.1106C>G	p.(Ser369Cys)	AR	23.7
5	TTC37	Heterozygous	95523746	C	T	014639.3	VUS	c.1541G>A	p.(Arg514His)	AR	25.2
6	C2	Heterozygous	31934247	C	G	000063.5	VUS	c.797C>G	p.(Ser266Trp)	AR	21.4
9	DOCK8	Heterozygous	312088	C	A	203447.3	VUS	c.663C>A	p.(Asp221Glu)	AR	18.36
	ERCC6L2	Heterozygous	95897979	C	T	020207.4	VUS	c.627+8C>T	-	AR	0.532
10	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	UNC93B1	Heterozygous	68003181	G	A	030930.3	VUS	c.239-6C>T	-	AR	10.04
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
13	LIG4	Heterozygous	108209530	C	T	001098268.1	VUS	c.1739G>A	p.(Arg580Gln)	AR	32.0
16	MEFV	Heterozygous	3254482	C	A	000243.2	VUS	c.586G>T	p.(Gly196Trp)	AD	13.19
17	FOXN1	Heterozygous	28529118	C	T	003593.2	VUS	c.724C>T	p.(Pro242Ser)	AR	19.35
	NLRP1	Heterozygous	5521616	C	T	033004.3	VUS	c.3691G>A	p.(Val123Ile)	AR	0.243
	TMC8/TMC6	Heterozygous	78132339	A	C	152468.4 007267.6	Likely Path	c.-75+2T>G c.299-20A>C	-	AR	7734
18	EPG5	Heterozygous	45954662	G	A	020964.2	VUS	c.740C>T	p.(Pro247Leu)	AR	27.8
19	IL12RB1	Heterozygous	18072300	G	A	001290024.1	VUS	c.953C>T	p.(Thr318Met)	AR	4105
X	BTK	Hemizygous	101370053	G	T	001287344.1	Likely Path	c.336C>A	p.(Tyr112Ter)	AR	35.0
	KMD6A	Hemizygous	45069832	C	T	001291415.1	VUS	c.2333C>T	p.(Thr778Met)	AR	8.443

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 19, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
2	CD8A	Heterozygous	86790780	G	A	001145873.1	VUS	c.46C>T	p.(Leu16Phe)	AR	26.3
	IL36RN	Heterozygous	113062223	T	G	173170.1	VUS	c.215T>G	p.(Val72Gly)	AR	14.83
	NBAS	Heterozygous	15402172	A	G	015909.3	VUS	c.3067T>C	p.(Tyr1023His)	AR	22.7
4	FAT4	Heterozygous	125446324	A	T	001291303.1	VUS	c.7231A>T	p.(Thr2411Ser)	AR	22.4
6	CFB	Heterozygous	31951881	G	A	001710.5	VUS	c.2146G>A	p.(Val716Ile)	AD	22.9
8	MCM4	Heterozygous	47973030	G	A	005914.3	VUS	c.2102G>A	p.(Arg701Gln)	AR	17.25
	VPS13B	Heterozygous	99820031	A	G	017890.4	Pathogenic	c.8978A>G	p.(Asn2993Ser)	AR	25.2
9	DDX58	Heterozygous	32481503	-	A	014314.3	VUS	c.1481-6dupT	-	AD	-
	DOCK8	Heterozygous	215060	G	T	203447.3	VUS	c.53+31G>T	-	AR	12.95
12	KMT2D	Heterozygous	49052082	G	A	003482.3	VUS	c.1601C>T	p.(Thr534Met)	AD	22.2
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	TNFRSF1A	Heterozygous	6333477	C	T	001065.3	Pathogenic	c.362G>A	p.(Arg121Gln)	AD	14.59
13	LIG4	Heterozygous	108209471	C	T	001098268.1	VUS	c.1798G>A	p.(Glu600Lys)	AR	20.3
15	NSMCE3	Heterozygous	29268836	CTC	-	138704.3	VUS	c.868_870delGAG	p.(Glu290del)	AR	-
17	TMC8	Heterozygous	78137997	C	T	152468.4	VUS	c.1350-8C>T	-	AR	0.019
	TNFRSF13B	Heterozygous	16952527	A	G	012452.2	VUS	c.118T>C	p.(Trp40Arg)	AD	25.6
18	CCBE1	Heterozygous	59469550	C	T	133459.3	VUS	c.323G>A	p.(Arg108Gln)	AR	33.0
20	ITCH	Heterozygous	34445285	A	T	001257137.1	Likely Path	c.1089-2A>T	-	AR	26.4
21	AIRE	Heterozygous	44286146	C	G	000383.3	VUS	c.132+8C>G	-	AD	5.575
22	IL17RA	Heterozygous	17108712	C	T	014339.6	VUS	c.1493C>T	p.(Thr498Ile)	AR	22.5
X	BTK	Hemizygous	101358418	-	T	001287344.1	Likely Path	c.993dupA	p.(Arg332ThrfsTer17)	AR	-
	CSF2RA	Hemizygous	1303323	T	C	001161530.1	VUS	c.1009T>C	p.(Ser337Pro)	AR	1076
	CSF2RA	Hemizygous	1303332	C	T	001161530.1	VUS	c.1018C>T	p.(Leu340Phe)	AR	0.077
	CSF2RA	Hemizygous	1303338	C	T	001161530.1	Likely Path	c.1024C>T	p.(Arg342Ter)	AR	28.1

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 20, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Heterozygous	92478758	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Homozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
2	IL1RN	Heterozygous	113132866	G	A	173841.2	VUS	c.538G>A	p.(Glu180Lys)	AR	8182
	NHEJ1	Heterozygous	219157620	C	T	024782.2	VUS	c.242G>A	p.(Arg81His)	AR	14.29
4	FAT4	Heterozygous	125320565	T	C	001291303.1	VUS	c.4154T>C	p.(Leu1385Ser)	AR	22.9
	FAT4	Heterozygous	125320630	G	A	001291303.1	VUS	c.4219G>A	p.(Val1407Ile)	AR	21.9
	SH3BP2	Heterozygous	2829549	C	A	001145856.1	VUS	c.814C>A	p.(Pro272Thr)	AD	22.2
6	TAPBP	Heterozygous	33313727	C	A	172208.2	VUS	c.175G>T	p.(Asp59Tyr)	AR	23.6
8	VPS13B	Heterozygous	99820031	A	G	017890.4	Pathogenic	c.8978A>G	p.(Asn2993Ser)	AR	25.2
9	C5	Heterozygous	121030401	C	T	001735.2	VUS	c.754G>A	p.(Ala252Thr)	AR	24.0
	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
10	STN1	Heterozygous	103892213	T	G	024928.4	VUS	c.793A>C	p.(Ser265Arg)	AR	21.5
11	CLPB	Heterozygous	72293375	T	C	030813.4	VUS	c.2116A>G	p.(Thr706Ala)	AR	22.0
	CLPB	Heterozygous	72434263	C	G	030813.4	VUS	c.212G>C	p.(Gly71Ala)	AR	19.93
12	C1R	Heterozygous	7091446	C	T	001733.4	VUS	c.231+6G>A	-	AR	6661
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delICCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	CYBA	Heterozygous	88646816	C	T	000101.3	VUS	c.226G>A	p.(Val76Met)	AR	23.2
	NFAT5	Heterozygous	69695273	C	T	138713.3	VUS	c.4552C>T	p.(Pro1518Ser)	AD	21.6
19	FAAP24	Heterozygous	32976521	G	A	152266.4	VUS	c.487G>A	p.(Val163Met)	AR	33.0
21	ITGB2	Heterozygous	44903541	G	A	001127491.2	Pathogenic	c.329-6C>T	-	AR	0.010
22	IL17RA	Heterozygous	17105960	C	T	014339.6	VUS	c.1045+6C>T	-	AR	2154
X	BTK	Hemizygous	101353351	C	T	001287344.1	VUS	c.1853G>A	p.(Gly618Glu)	AR	25.6

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 21, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	ISG15	Heterozygous	1014122	C	T	005101.3	VUS	c.142C>T	p.(His48Tyr)	AR	8.361
	GFI1	Heterozygous	92478758	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	NLRP3	Heterozygous	247424287	G	C	001079821.2	VUS	c.844G>C	p.(Asp282His)	AD	23.4
	NLRP3	Heterozygous	247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
2	AP1S3	Heterozygous	223758735	T	G	001039569.1	VUS	c.445A>C	p.(Met149Leu)	AR	22.6
	ZAP70	Heterozygous	97734618	C	T	001079.3	VUS	c.988C>T	p.(Leu330Phe)	AR	22.8
4	SH3BP2	Heterozygous	2833722	A	G	001145856.1	VUS	c.1745A>G	p.(Glu582Gly)	AD	23.9
5	C6	Heterozygous	41186146	A	G	001115131.2	VUS	c.650T>C	p.(Ile217Thr)	AR	17.05
	DNAJC21	Heterozygous	34944907	G	A	194283.3	VUS	c.1024G>A	p.(Val342Met)	AR	29.1
6	DOPEY1	Heterozygous	83167947	T	C	001199942.1	VUS	c.7211T>C	p.(Met2404Thr)	AR	21.7
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	IRF7	Heterozygous	613353	-	C	004031.2	Likely Path	c.1128dupG	p.(Pro377AlafsTer38)	AR	-
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	TBK1	Heterozygous	64480104	T	C	013254.3	VUS	c.794T>C	p.(Val265Ala)	AD	22.0
17	MAP3K14	Heterozygous	45287272	C	T	003954.4	VUS	c.419G>A	p.(Ser140Asn)	AR	21.1
19	LIG1	Heterozygous	48132975	C	T	000234.2	VUS	c.1725+7G>A	-	AR	3622
20	STK4	Heterozygous	45001263	A	G	006282.2	VUS	c.1057A>G	p.(Thr353Ala)	AR	27.9
22	IL17RA	Heterozygous	17109170	G	A	014339.6	VUS	c.1951G>A	p.(Glu651Lys)	AR	21.0
X	BTK	Hemizygous	101353885	C	A	001287344.1	VUS	c.1735G>T	p.(Asp579Tyr)	AR	28.5

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 22, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygosity	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	CD55	Heterozygous	207359538	A	T	001300904.1	VUS	c.*20-8A>T	-	AR	6.043
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
3	TFRC	Heterozygous	196065437	C	G	001128148.1	VUS	c.1198+6G>C	-	AR	9318
7	CFTR	Heterozygous	117592008	A	G	000492.3	VUS	c.1841A>G	p.(Asp614Gly)	AR	28.2
8	VPS13B	Heterozygous	99832368	G	T	017890.4	Likely Path	c.9406-1G>T	-	AR	22.0
	VPS13B	Heterozygous	99832370	A	T	017890.4	VUS	c.9407A>T	p.(Tyr3136Phe)	AR	16.47
	VPS13B	Heterozygous	99832375	C	G	017890.4	VUS	c.9412C>G	p.(Arg3138Gly)	AR	20.9
9	C8G	Heterozygous	136945403	G	A	000606.2	VUS	c.83G>A	p.(Arg28Gln)	AR	5.483
	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
10	PTEN	Heterozygous	87960892	A	T	000314.5	Pathogenic	c.802-2A>T	-	AD	24.7
	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
	STN1	Heterozygous	103892197	G	A	024928.4	VUS	c.809C>T	p.(Ala270Val)	AR	25.8
11	IL10RA	Heterozygous	117986542	T	C	001558.3	VUS	c.67+8T>C	-	AR	12.91
	RNASEH2C	Heterozygous	65720045	C	A	032193.3	VUS	c.468G>T	p.(Ala156=)	AR	19.37
	TPP1	Heterozygous	6616509	T	-	000391.3	VUS	c.887-6delA	-	AR	-
12	C1S	Heterozygous	7066566	C	T	001734.3	VUS	c.920C>T	p.(Ala307Val)	AR	12.92
	KMT2D	Heterozygous	49037694	G	T	003482.3	VUS	c.9662C>A	p.(Thr3221Asn)	AD	21.3
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	CLCN7	Heterozygous	1447000	G	C	001287.5	VUS	c.2331+6C>G	-	AR	4568
18	EPG5	Heterozygous	45944089	G	C	020964.2	VUS	c.1708C>G	p.(Leu570Val)	AR	25.9
	MALT1	Heterozygous	58745675	A	G	006785.3	VUS	c.1921A>G	p.(Ile641Val)	AR	22.0
20	DNMT3B	Heterozygous	32802379	C	T	006892.3	VUS	c.2146-6C>T	-	AR	2.054
21	AIRE	Heterozygous	44294411	C	T	000383.3	VUS	c.1411C>T	p.(Arg471Cys)	AD	22.3
	ITGB2	Heterozygous	44901683	G	A	001127491.2	VUS	c.550C>T	p.(Pro184Ser)	AR	25.6
	ITGB2	Heterozygous	44891801	C	T	001127491.2	VUS	c.1412+8G>A	-	AR	0.091
22	CSF2RB	Heterozygous	36930707	C	G	000395.2	VUS	c.889C>G	p.(Leu297Val)	AR	3335
X	BTK	Hemizygous	101374609	A	T	001287344.1	VUS	c.167T>A	p.(Ile56Lys)	AR	25.8

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 23, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	CD55	Heterozygous	207359538	A	T	001300904.1	VUS	c.*20-8A>T	-	AR	6.043
	GFI1	Heterozygous	92478758	AG	-	005263.3	VUS	c.925-6_925-5delCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
5	C6	Heterozygous	41149429	G	A	001115131.2	VUS	c.2435C>T	p.(Thr812Ile)	AR	24.6
	C6	Heterozygous	41160271	C	T	001115131.2	VUS	c.1555G>A	p.(Asp519Asn)	AR	24.7
	SPINK5	Heterozygous	148133867	G	A	001127698.1	VUS	c.3256G>A	p.(Ala1086Thr)	AR	8401
6	TAP1	Heterozygous	32852214	C	T	000593.5	VUS	c.919G>A	p.(Gly307Arg)	AR	23.3
	TAPBP	Heterozygous	33304360	G	A	172208.2	Likely Path	c.1147C>T	p.(Arg383Ter)	AR	7.555
7	SAMD9L	Heterozygous	93134276	C	T	152703.3	VUS	c.1696G>A	p.(Ala566Thr)	AD	16.09
	SAMD9L	Heterozygous	93135686	A	G	152703.3	VUS	c.286T>C	p.(Ser96Pro)	AD	7489
8	VPS13B	Heterozygous	99766810	A	C	017890.4	VUS	c.7162A>C	p.(Lys2388Gln)	AR	22.8
10	PRF1	Heterozygous	70600500	C	T	005041.4	VUS	c.403G>A	p.(Val135Met)	AR	14.62
	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	HYOU1	Heterozygous	119052102	T	C	006389.4	VUS	c.1193A>G	p.(Lys398Arg)	AR	25.5
	TPP1	Heterozygous	6617120	G	A	000391.3	VUS	c.542C>T	p.(Ser181Phe)	AR	16.03
12	C1R	Heterozygous	7080550	C	T	001733.4	VUS	c.829G>A	p.(Arg277Lys)	AR	6645
	C1R	Heterozygous	7089465	G	A	001733.4	VUS	c.596C>T	p.(Thr199Met)	AR	23.5
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
13	TPP2	Heterozygous	102622929	A	G	003291.2	VUS	c.673A>G	p.(Arg225Gly)	AR	22.4
15	BLM	Heterozygous	90754819	A	G	000057.3	VUS	c.968A>G	p.(Lys323Arg)	AR	21.9
	PSTPIP1	Heterozygous	77032355	A	G	003978.3	VUS	c.799A>G	p.(Ser267Gly)	AD	10.82
16	CLCN7	Heterozygous	1447000	G	C	001287.5	VUS	c.2331+6C>G	-	AR	4568
	CLCN7	Heterozygous	1447002	T	A	001287.5	VUS	c.2331+4A>T	-	AR	15.59
17	CTC1	Heterozygous	8228619	C	G	025099.5	VUS	c.3398G>C	p.(Arg1133Thr)	AR	12.01
	TMC8/TMC6	Heterozygous	78132333	T	A	007267.6	VUS	c.-75+8A>T c.299-26T>A	-	AR	7463
18	EPG5	Heterozygous	45865766	AA	-	020964.2	VUS	c.6622-8_6622-7delTT	-	AR	-
	EPG5	Heterozygous	45865767	A	-	020964.2	VUS	c.6622-7delT	-	AR	-
19	PEPD	Heterozygous	33387940	C	T	000285.3	VUS	c.1294G>A	p.(Ala432Thr)	AR	23.3
X	XIAP	Hemizygous	23907095	A	T	001204401.1	VUS	c.1408A>T	p.(Thr470Ser)	AR	22.6

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 24, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Heterozygous	92478758	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	MYSM1	Heterozygous	58668978	T	C	001085487.2	VUS	c.1716+6A>G	-	AR	5478
	PTPRC	Heterozygous	198748106	C	A	002838.4	VUS	c.2848-3C>A	-	AR	8.619
2	MOGS	Heterozygous	74461964	G	A	006302.2	VUS	c.1825C>T	p.(Arg609Cys)	AR	25.3
	NHEJ1	Heterozygous	219077371	T	A	024782.2	VUS	c.707-7A>T	-	AR	11.86
	RANBP2	Heterozygous	108765265	A	T	006267.4	VUS	c.4726A>T	p.(Thr1576Ser)	AD	6.915
3	IL17RC	Heterozygous	9917356	G	A	153461.3	VUS	c.41G>A	p.(Arg14Gln)	AR	23.8
4	FAT4	Heterozygous	125487544	A	G	001291303.1	VUS	c.13022A>G	p.(Asp4341Gly)	AR	22.0
	LRBA	Heterozygous	150852021	C	T	006726.4	VUS	c.3689G>A	p.(Gly1230Asp)	AR	1205
5	C7	Heterozygous	41009995	T	C	173489.4	VUS	c.2351-5731T>C	-	AR	9.897
	DOCK2	Heterozygous	170080290	C	T	004946.2	VUS	c.5287+7C>T	-	AR	4.951
7	SAMD9	Heterozygous	93102554	A	T	017654.3	VUS	c.3544T>A	p.(Tyr1182Asn)	AD	7.283
8	VPS13B	Heterozygous	99135698	C	T	017890.4	VUS	c.1528C>T	p.(Arg510Cys)	AR	24.7
	VPS13B	Heterozygous	99642480	T	C	017890.4	VUS	c.5965T>C	p.(Ser1989Pro)	AR	22.6
9	ERCC6L2	Heterozygous	95881229	G	A	020207.4	VUS	c.440G>A	p.(Gly147Glu)	AR	18.02
10	NFKB2	Heterozygous	102400325	C	A	001077494.3	VUS	c.1632C>A	p.(Ser544Arg)	AD	22.7
	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
13	TPP2	Heterozygous	102597178	T	G	003291.2	VUS	c.140T>G	p.(Val47Gly)	AR	28.2
17	STAT3	Heterozygous	42337861	C	T	139276.2	VUS	c.551-4G>A	-	AD	5.669
18	EPG5	Heterozygous	45837611	C	G	213602.2	VUS	c.211C>G	p.(Arg71Gly)	AR	23.3
20	RTEL1	Heterozygous	63690334	G	A	001283009.1	VUS	c.2306G>A	p.(Arg769His)	AD	20.1

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 25, do sexo masculino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygosity	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	CFHR5	Heterozygous	196995755	A	T	030787.3	VUS	c.646A>T	p.(Asn216Tyr)	AD	22.0
	CFHR5	Heterozygous	196995756	A	T	030787.3	VUS	c.647A>T	p.(Asn216Ile)	AD	22.4
	GFI1	Heterozygous	92478758	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
2	APIS3	Heterozygous	223777778	G	A	001039569.1	VUS	c.95C>T	p.(Thr32Ile)	AR	16.92
3	IL17RC	Heterozygous	9928379	G	A	153461.3	VUS	c.1165G>A	p.(Ala389Thr)	AR	22.8
5	TTC37	Heterozygous	95507015	A	-	014639.3	VUS	c.3015-4delT	-	AR	-
7	CFTR	Heterozygous	117540282	C	G	000492.3	VUS	c.1052C>G	p.(Thr351Ser)	AR	23.3
	SAMD9	Heterozygous	93104549	T	-	017654.3	Likely Path	c.1549delA	p.(Arg517GlufsTer8)	AD	-
8	MCM4	Heterozygous	47970029	G	C	005914.3	VUS	c.1406G>C	p.(Ser469Thr)	AR	29.6
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
	TNFRSF1A	Heterozygous	6329904	G	A	001065.3	VUS	c.931C>T	p.(Arg311Cys)	AD	15.23
14	PNP	Heterozygous	20476410	G	A	000270.3	VUS	c.679G>A	p.(Val227Ile)	AR	22.5
	TINF2	Heterozygous	24240759	G	A	001099274.1	VUS	c.721C>T	p.(Pro241Ser)	AD	22.5
16	CARMIL2	Heterozygous	67651997	C	T	001013838.1	VUS	c.2665C>T	p.(Arg889Trp)	AR	23.0
18	EPG5	Heterozygous	45839057	T	G	213602.2	VUS	c.836T>G	p.(Leu279Arg)	AR	25.7
	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
19	TICAM1	Heterozygous	4817821	G	A	182919.3	VUS	c.557C>T	p.(Ser186Leu)	AD	13.06
22	IL17RA	Heterozygous	17097075	C	T	014339.6	VUS	c.152C>T	p.(Thr51Met)	AR	16.06
	IL17RA	Heterozygous	17105867	T	C	014339.6	VUS	c.958T>C	p.(Trp320Arg)	AR	26.5
	MKL1	Heterozygous	40418538	G	A	020831.4	VUS	c.1900C>T	p.(Pro634Ser)	AR	15.28
X	IRAK1	Heterozygous	154013099	G	A	001569.3	VUS	c.1874C>T	p.(Thr625Met)	AR	14.14

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 26, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	CFH	Heterozygous	196672990	T	C	000186.3	VUS	c.71T>C	p.(Leu24Pro)	AD	14.02
	FCN3	Heterozygous	27373180	G	-	003665.2	Pathogenic	c.349delC	p.(Leu117SerfsTer65)	AR	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
3	IL17RC	Heterozygous	9933235	C	T	153461.3	VUS	c.2018C>T	p.(Ala673Val)	AR	14.60
4	NFKB1	Heterozygous	102596302	G	-	003998.3	Likely Path	c.1466delG	p.(Gly489GlufsTer15)	AD	-
6	TAP1	Heterozygous	32850520	G	A	000593.5	VUS	c.1231-3C>T	-	AR	13.02
	TAPBP	Heterozygous	33313727	C	A	172208.2	VUS	c.175G>T	p.(Asp59Tyr)	AR	23.6
7	SAMD9	Heterozygous	93101365	A	G	017654.3	VUS	c.4733T>C	p.(Ile1578Thr)	AD	22.1
8	VPS13B	Heterozygous	99818837	C	T	017890.4	VUS	c.8645C>T	p.(Pro2882Leu)	AR	22.8
	VPS13B	Heterozygous	99832368	G	T	017890.4	Likely Path	c.9406-1G>T	-	AR	22.0
	VPS13B	Heterozygous	99832370	A	T	017890.4	VUS	c.9407A>T	p.(Tyr3136Phe)	AR	16.47
	PRKDC	Heterozygous	47807283	G	A	006904.6	VUS	c.9601C>T	p.(Pro3201Ser)	AR	6.687
11	CD3D	Heterozygous	118339234	GAG	-	000732.4	VUS	c.451-9_451-7delCTC	-	AR	-
	RNASEH2C	Heterozygous	65720045	C	A	032193.3	VUS	c.468G>T	p.(Ala156=)	AR	19.37
	TPP1	Homozygous	6616509	T	-	000391.3	VUS	c.887-6delA	-	AR	-
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	USB1	Heterozygous	58001528	G	T	024598.3	VUS	c.45G>T	p.(Glu15Asp)	AR	23.4
19	ELANE	Heterozygous	853384	A	G	001972.2	VUS	c.347A>G	p.(Asn116Ser)	AD	21.5
	LIG1	Heterozygous	48121298	C	T	000234.2	VUS	c.2257G>A	p.(Val753Met)	AR	22.1
	STXBP2	Heterozygous	7645248	C	T	001272034.1	VUS	c.1331C>T	p.(Ala444Val)	AR	17.62
X	CYBB	Heterozygous	37809689	T	C	000397.3	VUS	c.1584T>C	p.(Pro528=)	AR	16.05

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 27, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	GFI1	Heterozygous	92478758	AG	-	005263.3	VUS	c.925-6_925-5delCT	-	AD	-
	LYST	Homozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
2	PTPRC	Heterozygous	198718211	A	T	002838.4	VUS	c.1568A>T	p.(Glu523Val)	AR	3080
	SMARCAL1	Heterozygous	216428691	A	G	014140.3	VUS	c.1243A>G	p.(Ser415Gly)	AR	5.014
4	FAT4	Heterozygous	125318238	C	A	001291303.1	VUS	c.1827C>A	p.(Asp609Glu)	AR	19.37
	FAT4	Heterozygous	125450612	A	G	001291303.1	VUS	c.9602A>G	p.(Tyr3201Cys)	AR	32.0
5	TTC37	Heterozygous	95522099	G	T	014639.3	VUS	c.1966C>A	p.(Gln656Lys)	AR	22.8
6	C2	Heterozygous	31935950	G	A	000063.5	VUS	c.877G>A	p.(Val293Ile)	AR	21.5
7	PMS2	Heterozygous	5997426	G	T	000535.5	VUS	c.706-3C>A	-	AR	8.663
9	C5	Heterozygous	120976794	G	C	001735.2	VUS	c.3770C>G	p.(Thr1257Ser)	AR	22.3
	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
10	HELLS	Heterozygous	94574051	C	T	NM_001289067.	VUS	c.569C>T	p.(Thr190Met)	AR	24.3
	HELLS	Heterozygous	94592225	T	G	NM_001289067.	VUS	c.1906-4T>G	-	AR	16.65
	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
	TPP1	Heterozygous	6616508	A	-	000391.3	VUS	c.887-5delT	-	AR	-
	TPP1	Heterozygous	6616509	T	-	000391.3	VUS	c.887-6delA	-	AR	-
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
13	TNFSF11	Heterozygous	42574404	C	G	003701.3	VUS	c.101C>G	p.(Pro34Arg)	AR	22.3
	TPP2	Heterozygous	102597178	T	G	003291.2	VUS	c.140T>G	p.(Val47Gly)	AR	28.2
16	CLCN7	Heterozygous	1447000	G	C	001287.5	VUS	c.2331+6C>G	-	AR	4.568
	IRF8	Heterozygous	85918417	C	T	002163.2	VUS	c.602C>T	p.(Ala201Val)	AD	10.07
17	TMC6	Heterozygous	78125882	G	A	007267.6	VUS	c.274C>T	p.(Arg92Cys)	AR	29.1
18	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
19	TYK2	Heterozygous	10361922	C	T	003331.4	VUS	c.1807G>A	p.(Val603Met)	AR	23.8
20	RTEL1	Heterozygous	63678186	A	G	001283009.1	VUS	c.958+3A>G	-	AD	19.31
X	ATP6AP1	Heterozygous	154428788	-	GGCGGC	001183.5	VUS	c.111_116dupGGCGGC	-	AR	-

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 28, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	FCN3	Heterozygous	27373180	G	-	003665.2	Pathogenic	c.349delC	p.(Leu117SerfsTer65)	AR	-
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	NLRP3	Heterozygous	247424287	GA	-	001079821.2	Likely Path	c.844_845delGA	p.(Asp282ProfsTer24)	AD	-
	NLRP3	Heterozygous	247424288	-	CCC	001079821.2	VUS	c.846_848dupCCC	p.(Pro283dup)	AD	-
	NLRP3	Heterozygous	247424294	A	C	001079821.2	VUS	c.851A>C	p.(Asn284Thr)	AD	15.75
2	ADAM17	Heterozygous	9543235	T	C	003183.4	VUS	c.148A>G	p.(Ile50Val)	AR	22.1
	CASP10	Heterozygous	201209349	-	GCCAAGG	032977.3	Likely Path	c.1202_1208delGCCAAGG	p.(Cys401LeufsTer15)	AD	-
	MSH6	Heterozygous	47800616	T	C	000179.2	Pathogenic	c.2633T>C	p.(Val878Ala)	AR	10.31
	TTC7A	Heterozygous	46956966	T	C	001288951.1	VUS	c.476T>C	p.(Leu159Pro)	AR	23.1
5	ITK	Heterozygous	157211350	G	A	005546.3	VUS	c.307G>A	p.(Val103Met)	AR	27.7
6	C2	Heterozygous	31934247	C	G	000063.5	VUS	c.797C>G	p.(Ser266Trp)	AR	21.4
	TAPBP	Heterozygous	33313727	C	A	172208.2	VUS	c.175G>T	p.(Asp59Tyr)	AR	23.6
9	DDX58	Heterozygous	32481503	-	A	014314.3	VUS	c.1481-6dupT	-	AD	-
	DOCK8	Heterozygous	215060	G	T	203447.3	VUS	c.53+31G>T	-	AR	12.95
10	PTEN	Heterozygous	87960892	A	T	000314.5	Pathogenic	c.802-2A>T	-	AD	24.7
	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
11	CTSC	Heterozygous	88335088	G	C	001814.4	VUS	c.173-6C>G	-	AR	5728
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
17	TNFRSF13B	Heterozygous	16940352	C	T	012452.2	Pathogenic	c.605G>A	p.(Arg202His)	AD	15.37
19	PSENE1	Heterozygous	35746421	G	T	172341.2	VUS	c.64G>T	p.(Gly22Trp)	AD	28.8
	TICAM1	Heterozygous	4818140	C	T	182919.3	VUS	c.238G>A	p.(Val80Met)	AD	0.255
20	ITCH	Heterozygous	34445285	A	T	001257137.1	Likely Path	c.1089-2A>T	-	AR	26.4
X	XIAP	Homozygous	123907095	A	T	001204401.1	VUS	c.1408A>T	p.(Thr470Ser)	AR	22.6

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 29, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	CR2	Heterozygous	207485478	A	C	001006658.2	VUS	c.3203A>C	p.(Asp1068Ala)	AR	22.3
	GFI1	Heterozygous	92478758	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	LYST	Homozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	NLRP3	Heterozygous	247424287	G	C	001079821.2	VUS	c.844G>C	p.(Asp282His)	AD	23.4
	NLRP3	Heterozygous	247424288	A	C	001079821.2	VUS	c.845A>C	p.(Asp282Ala)	AD	20.0
	PIK3CD	Heterozygous	9722244	C	T	005026.3	VUS	c.2235C>T	p.(Cys745=)	AD	0.904
2	PTPRC	Heterozygous	198748106	C	A	002838.4	VUS	c.2848-3C>A	-	AR	8.619
	STAT1	Heterozygous	190974932	A	C	007315.3	VUS	c.2136T>G	p.(Val712=)	AD	14.67
3	TRNT1	Heterozygous	3140550	A	G	182916.2	VUS	c.383A>G	p.(Asp128Gly)	AR	29.1
5	PIK3R1	Heterozygous	68280521	C	A	181523.2	VUS	c.635-7C>A	-	AD	10.11
6	IFNGR1	Heterozygous	137203643	C	T	000416.2	VUS	c.589G>A	p.(Glu197Lys)	AD	19.74
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
10	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	CLCN7	Heterozygous	1447000	G	C	001287.5	VUS	c.2331+6C>G	-	AR	4568
	CORO1A	Heterozygous	30187231	G	A	007074.3	VUS	c.636+8G>A	-	AR	8.301
17	NLRP1	Heterozygous	5517738	G	C	033004.3	VUS	c.4057+8C>G	-	AR	4493
	TMC6	Heterozygous	78121702	C	G	007267.6	VUS	c.1237G>C	p.(Ala413Pro)	AR	24.5
18	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
20	ITCH	Heterozygous	34445280	G	T	001257137.1	VUS	c.1089-7G>T	-	AR	9.273
X	FOXP3	Homozygous	49264848	A	G	-	VUS	-	-	AR	13.19

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 30, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	C8B	Heterozygous	56960119	G	C	000066.3	VUS	c.150C>G	p.(Ser50Arg)	AR	11.44
	GFI1	Heterozygous	92478758	-	AG	005263.3	VUS	c.925-6_925-5dupCT	-	AD	-
2	CASP10	Heterozygous	201209067	C	A	032977.3	VUS	c.923-3C>A	-	AD	11.49
	MOGS	Heterozygous	74462185	C	T	006302.2	VUS	c.1604G>A	p.(Arg535Gln)	AR	18.07
3	PRKCD	Heterozygous	53185614	G	A	006254.3	VUS	c.899G>A	p.(Arg300Gln)	AR	13.95
	TFRC	Heterozygous	196065437	C	G	001128148.1	VUS	c.1198+6G>C	-	AR	9318
	TRNT1	Heterozygous	3147450	G	C	182916.2	VUS	c.803G>C	p.(Gly268Ala)	AR	25.9
4	FAT4	Heterozygous	125490387	G	C	001291303.1	VUS	c.13571G>C	p.(Ser4524Thr)	AR	25.6
	LRBA	Heterozygous	150325808	C	A	006726.4	Likely Path	c.7485+1G>T	-	AR	22.2
	LRBA	Heterozygous	150471666	TC	-	006726.4	Pathogenic	c.6657_6658delGA	p.(Glu2219AspfsTer3)	AR	-
	TLR3	Heterozygous	186082696	G	A	003265.2	VUS	c.1010G>A	p.(Ser337Asn)	AD	12.18
5	C6	Heterozygous	41154986	T	C	001115131.2	VUS	c.2087A>G	p.(Asp696Gly)	AR	21.2
	C7	Heterozygous	41008675	G	A	173489.4	VUS	c.3539C>T	p.(Thr1180Ile)	AR	13.26
7	CFTR	Heterozygous	117509089	C	T	000492.3	VUS	c.220C>T	p.(Arg74Trp)	AR	23.3
8	PRKDC	Heterozygous	47849230	G	A	006904.6	VUS	c.7204C>T	p.(Leu2402Phe)	AR	21.0
	VPS13B	Heterozygous	99170073	A	G	017890.4	VUS	c.2243A>G	p.(Asp748Gly)	AR	23.1
9	DDX58	Heterozygous	32481503	A	-	014314.3	VUS	c.1481-6delT	-	AD	-
	DOCK8	Heterozygous	271626	G	T	203447.3	Pathogenic	c.54-1G>T	-	AR	28.5
10	PTEN	Heterozygous	87960892	A	T	000314.5	Pathogenic	c.802-2A>T	-	AD	24.7
	PTEN	Heterozygous	87960896	C	A	000314.5	VUS	c.804C>A	p.(Asp268Glu)	AD	18.53
11	CTSC	Heterozygous	88335088	G	T	001814.4	VUS	c.173-6C>A	-	AR	5.494
	TPP1	Heterozygous	6617746	T	C	000391.3	VUS	c.260A>G	p.(Asp87Gly)	AR	22.2
12	KMT2D	Heterozygous	49037487	C	G	003482.3	VUS	c.9869G>C	p.(Gly3290Ala)	AD	16.76
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
14	PSEN1	Heterozygous	73192661	A	G	000021.3	VUS	c.566A>G	p.(Tyr189Cys)	AD	33.0
16	IL21R	Heterozygous	27444639	C	T	181079.4	VUS	c.671C>T	p.(Ala224Val)	AR	25.0
	PLCG2	Heterozygous	81937830	G	C	002661.4	VUS	c.3125G>C	p.(Ser1042Thr)	AD	22.5
17	MAP3K14	Heterozygous	45287272	C	T	003954.4	VUS	c.419G>A	p.(Ser140Asn)	AR	21.1
	SMARCD2	Heterozygous	63833154	A	G	001098426.1	VUS	c.1457T>C	p.(Ile486Thr)	AR	22.1
	SMARCD2	Heterozygous	63833426	G	A	001098426.1	VUS	c.1318-6C>T	-	AR	4.319
	TMC6	Heterozygous	78120836	C	T	007267.6	VUS	c.1536-4G>A	-	AR	0.001
18	TNFRSF11A	Heterozygous	62358241	C	A	003839.3	VUS	c.428-7C>A	-	AR	0.745
19	JAK3	Heterozygous	17834887	C	T	000215.3	VUS	c.2164G>A	p.(Val722Ile)	AR	15.49
	NLRP12	Heterozygous	53795966	G	C	001277126.1	VUS	c.2994C>G	p.(Asn998Lys)	AD	22.9
X	ATP6AP1	Heterozygous	154428788	-	GGCGGC	001183.5	VUS	c.111_116dupGGCGGC	p.(Ala40_Ala41dup)	AR	-

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 31, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromossome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	C8A	Heterozygous	56876130	G	A	000562.2	VUS	c.385G>A	p.(Asp129Asn)	AR	5.141
	GFI1	Heterozygous	92478758	-	AGAGAG	005263.3	VUS	c.925-10_925-5dupCTCTCT	-	AD	-
	GFI1	Heterozygous	92478758	-	AGAG	005263.3	VUS	c.925-8_925-5dupCTCT	-	AD	-
	LYST	Homozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
	RFX5	Heterozygous	151343848	C	T	000449.3	VUS	c.590G>A	p.(Arg197Gln)	AR	22.7
2	MSH6	Heterozygous	47798801	G	T	000179.2	VUS	c.818G>T	p.(Gly273Val)	AR	20.2
	SP110	Heterozygous	230172840	T	A	080424.2	VUS	c.1706+4A>T	-	AR	4258
	TTCTA	Heterozygous	46956927	G	T	001288951.1	VUS	c.437G>T	p.(Arg146Leu)	AR	22.5
6	TAP1	Heterozygous	32852223	C	A	000593.5	VUS	c.910G>T	p.(Val304Leu)	AR	0.003
	TAP2	Heterozygous	32822323	-	A	018833.2	VUS	c.1933-5dupT	-	AR	-
7	SAMD9L	Heterozygous	93134276	C	T	152703.3	VUS	c.1696G>A	p.(Ala566Thr)	AD	16.09
11	CTSC	Heterozygous	88335088	G	C	001814.4	VUS	c.173-6C>G	-	AR	5.728
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
14	CEBPE	Heterozygous	23117795	A	C	001805.3	VUS	c.538T>G	p.(Cys180Gly)	AR	22.3
16	CLCN7	Heterozygous	1447000	G	C	001287.5	VUS	c.2331+6C>G	-	AR	4.568
	CLCN7	Heterozygous	1447002	T	A	001287.5	VUS	c.2331+4A>T	-	AR	15.59
	MEFV	Heterozygous	3248947	G	C	000243.2	VUS	c.1318C>G	p.(Gln440Glu)	AD	19.91
	NOD2	Heterozygous	50699878	T	A	022162.2	VUS	c.464T>A	p.(Leu155Gln)	AD	17.32
	PLCG2	Heterozygous	81923501	A	G	002661.4	VUS	c.2324A>G	p.(Lys775Arg)	AD	23.6
17	MAP3K14	Heterozygous	45287170	C	T	003954.4	VUS	c.521G>A	p.(Cys174Tyr)	AR	25.5
	TMC6	Heterozygous	78124912	G	A	007267.6	VUS	c.610C>T	p.(Arg204Trp)	AR	13.99
	TMC8	Heterozygous	78134538	A	G	152468.4	VUS	c.961A>G	p.(Thr321Ala)	AR	26.3
18	EPG5	Heterozygous	45865766	-	A	020964.2	VUS	c.6622-7dupT	-	AR	-
19	IRF3	Heterozygous	49662101	C	T	001197122.1	VUS	c.829G>A	p.(Ala277Thr)	AD	12.17
	LIG1	Heterozygous	48137671	C	T	000234.2	VUS	c.1105G>A	p.(Val369Ile)	AR	0.718
	TICAM1	Heterozygous	4817645	C	T	182919.3	VUS	c.733G>A	p.(Gly245Ser)	AD	1.599
X	ATP6AP1	Heterozygous	154428788	-	GGCGGC	001183.5	VUS	c.111_116dupGGCGGC	p.(Ala40_Ala41dup)	AR	-
	CSF2RA	Heterozygous	1274819	G	A	172245.2	Likely Path	c.-27+1G>A	-	AR	3.818

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 32, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygosity	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	CSF3R	Heterozygous	36473569	T	G	156039.3	VUS	c.539A>C	p.(Lys180Thr)	AR	12.69
	LYST	Heterozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	*
	LYST	Heterozygous	235775089	-	A	001301365.1	VUS	c.5461-3dupT	-	AR	*
	PTPRC	Heterozygous	198722434	G	A	002838.4	VUS	c.1678G>A	p.(Asp560Asn)	AR	0.079
2	STAT1	Heterozygous	190995212	T	C	007315.3	VUS	c.793A>G	p.(Ile265Val)	AD	8.717
3	PRKCD	Heterozygous	53187401	A	C	006254.3	VUS	c.1414A>C	p.(Arg472=)	AR	21.3
	PRKCD	Heterozygous	53187404	T	G	006254.3	Likely Path	c.1415+2T>G	-	AR	26.6
10	HELLS	Heterozygous	94574138	C	G	001289067.1	VUS	c.656C>G	p.(Thr219Ser)	AR	22.4
	PTEN	Heterozygous	87960892	A	T	000314.5	Pathogenic	c.802-2A>T	-	AD	24.7
11	CTSC	Heterozygous	88335088	G	C	001814.4	VUS	c.173-6C>G	-	AR	5.728
	SLC37A4	Heterozygous	119027787	G	A	001164278.1	VUS	c.467C>T	p.(Ala156Val)	AR	22.9
	TCIRG1	Heterozygous	68049122	C	T	006019.3	VUS	c.1715C>T	p.(Pro572Leu)	AR	24.8
12	C1S	Heterozygous	7062569	A	G	001734.3	VUS	c.100A>G	p.(Ser34Gly)	AR	24.1
	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
16	CARMIL2	Heterozygous	67646765	T	C	001013838.1	VUS	c.518T>C	p.(Phe173Ser)	AR	29.2
	CLCN7	Heterozygous	1460534	C	T	001287.5	VUS	c.485-7G>A	-	AR	1.362
	CYBA	Heterozygous	88648118	C	T	000101.3	VUS	c.59-4G>A	-	AR	4.554
	NOD2	Heterozygous	50725529	C	G	022162.2	VUS	c.2923C>G	p.(Leu975Val)	AD	22.7
17	NLRP1	Heterozygous	5532913	G	A	033004.3	VUS	c.3205C>T	p.(His1069Tyr)	AR	14.19
	UNC13D	Heterozygous	75840504	C	T	199242.2	VUS	c.753+3G>A	-	AR	10.61

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 33, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.

Chromosome	Gene	Zygoty	Location	REF	ALT	NM_	Classification	Consequence		GeneCards	PHRED
								cDNA	Proteína		
1	FCN3	Heterozygous	27370971	A	C	003665.2	VUS	c.395T>G	p.(Val132Gly)	AR	23.8
	GFI1	Heterozygous	92478758	AG	-	NM_005263.3	VUS	c.925-6_925-5delCT	-	AD	-
	GFI1	Heterozygous	92478759	-	AGAG	NM_005263.3	VUS	c.925-8_925-5dupCTCT	-	AD	-
	LYST	Homozygous	235663083	A	-	001301365.1	VUS	c.11268-5delT	-	AR	-
2	ICOS	Heterozygous	203956715	G	C	012092.3	VUS	c.451G>C	p.(Val151Leu)	AR	15.36
4	FAT4	Heterozygous	125491482	G	A	001291303.1	VUS	c.14666G>A	p.(Arg4889Lys)	AR	23.9
	LRBA	Heterozygous	150310289	G	A	006726.4	VUS	c.7822C>T	p.(Arg2608Cys)	AR	34.0
5	TTC37	Heterozygous	95507015	-	A	014639.3	VUS	c.3015-4dupT	-	AR	-
7	SNX10	Heterozygous	26371813	T	A	013322.2	VUS	c.312-8T>A	-	AR	0.127
9	C5	Heterozygous	121025465	A	G	001735.2	VUS	c.989T>C	p.(Ile330Thr)	AR	18.02
	DOCK8	Heterozygous	215060	G	T	203447.3	VUS	c.53+31G>T	-	AR	12.95
11	CTSC	Heterozygous	88335089	A	-	001814.4	VUS	c.173-7delT	-	AR	-
12	ORAI1	Homozygous	121626866	GCCCC	-	032790.3	Likely Path	c.132_136delCCGCC	p.(Arg45ProfsTer258)	AR	-
14	MTHFD1	Heterozygous	64419844	A	G	005956.3	VUS	c.646A>G	p.(Thr216Ala)	AR	16.84
16	PLCG2	Heterozygous	81905484	T	C	002661.4	VUS	c.1444T>C	p.(Tyr482His)	AD	25.7
	PLCG2	Heterozygous	81908570	A	G	002661.4	VUS	c.1712A>G	p.(Asn571Ser)	AD	22.2
19	ACP5	Heterozygous	11577169	T	C	001111035.1	VUS	c.149A>G	p.(Asn50Ser)	AR	18.64
	FAAP24	Heterozygous	32974193	C	T	152266.4	VUS	c.377C>T	p.(Ser126Phe)	AR	26.9
	LIG1	Heterozygous	48121298	C	T	000234.2	VUS	c.2257G>A	p.(Val753Met)	AR	22.1
X	ATP6AP1	Heterozygous	154428788	-	GGCGGC	001183.5	VUS	c.111_116dupGGCGGC	p.(Ala40_Ala41dup)	AR	-
	FOXP3	Homozygous	49264848	A	G	-	VUS	c.115T>C	p.(Ser39Pro)	AR	13.19

Apêndice 01. Variantes genéticas encontradas no caso 34, do sexo feminino, divididas de acordo com a sua localização.

Legenda: (-) – Dado não informado.