



Protocolo de investigação de defeitos nos Receptores Semelhantes ao *Toll* (*Toll-like receptors*) – citometria de fluxo (*CD62L shedding*)

Responsável: Dr. Antonio Condino Neto

Os *Toll-like receptors* (TLR) são uma família de receptores envolvidos com o reconhecimento direto de componentes de patógenos (fungos, bactérias e vírus). Pacientes com defeitos nesse receptores ou suas vias de sinalização vem sendo descritos dentro das Imunodeficiências Primárias. Atualmente podemos dividir essas falhas em: defeitos dos receptores em si, como TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, e TLR9; defeitos nas vias de sinalização, como MyD88, Mal, IRAK1, IRAK4, NEMO, e IRF5; e ainda defeitos nos receptores do tipo NOD.

O diagnóstico está fundamentado principalmente nos seguintes critérios:

- História familiar para imunodeficiência caracterizada por infecções de repetição ou óbitos precoces nos tios e/ou primos;
- Quadro de infecções de repetição por micobactérias, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*;
- Outras manifestações: doença de Crohn, síndromes febris periódicas, desordens autoimunes sistêmicas.

Este método baseia-se na avaliação da expressão da molécula CD62L por citometria de fluxo, após estímulo com os agonistas de TLR. Por ele podemos definir a porcentagem da população celular que é ativada pelos ligantes de TLR (diminuição da expressão de CD62L). Esse método diagnóstico é sensível e rápido, além de demandar de um volume menor de sangue do paciente para sua realização.

Procedimentos

Etapa 1 – Identificação e encaminhamento do paciente

Enviar por e-mail o formulário de encaminhamento do paciente (Anexo) preenchido, com todos os resultados de exames realizados e quadro clínico do paciente.

Aguardar confirmação e agendamento por e-mail para envio das amostras de sangue.

Etapa 2 – Encaminhamento de amostras de sangue para exames laboratoriais

- Coletar do paciente e de um indivíduo controle (sem parentesco):
 - 5 mL de sangue em tubo com **heparina** para citometria de fluxo
- Serão aceitas amostras que forem entregues nos volumes e tubos solicitados.
- Identificar os tubos com caneta própria para escrita em tubos, que seja resistente à água.
- As amostras devem ser acondicionadas em temperatura ambiente.

Aguardar os resultados dessa etapa para envio de amostras de sangue para diagnóstico molecular.

Etapa 3 – Encaminhamento de amostras de sangue para diagnóstico molecular de DGC

- Coletar do paciente e de um indivíduo controle (sem parentesco):
 - 5 mL de sangue em tubo com **heparina** para extração de RNA
 - 5 mL de sangue em tubo com **EDTA** para extração de DNA
- Serão aceitas amostras que forem entregues nos volumes e tubos solicitados.
- Identificar os tubos com caneta própria para escrita em tubos, que seja resistente à água.
- As amostras devem ser acondicionadas em temperatura ambiente.

Mais informações, por favor, entrar em contato com Angela Falcai (afalcai@gmail.com); (11) 3091-7435; (11) 3091-7387)



Protocolo de investigação de defeitos nos Receptores Semelhantes ao *Toll* (*Toll-like receptors*) – produção de citocina (TNF- α)

Responsável: Dr. Antonio Condino Neto

Os *Toll-like receptors* (TLR) são uma família de receptores envolvidos com o reconhecimento direto de componentes de patógenos (fungos, bactérias e vírus). Pacientes com defeitos nesse receptores ou suas vias de sinalização vem sendo descritos dentro das Imunodeficiências Primárias. Atualmente podemos dividir essas falhas em: defeitos dos receptores em si, como TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, e TLR9; defeitos nas vias de sinalização, como MyD88, Mal, IRAK1, IRAK4, NEMO, e IRF5; e ainda defeitos nos receptores do tipo NOD.

O diagnóstico está fundamentado principalmente nos seguintes critérios:

- História familiar para imunodeficiência caracterizada por infecções de repetição ou óbitos precoces nos tios e/ou primos;
- Quadro de infecções de repetição por micobactérias, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*;
- Outras manifestações: doença de Crohn, síndromes febris periódicas, desordens autoimunes sistêmicas.

As vias envolvidas na ativação por TLR geram a sinalização necessária para a produção da citocina TNF- α . Este método baseia-se em estimular as células dos pacientes com os ligantes de TLR e dosar o TNF- α no sobrenadante dessas culturas. Esse é um método diagnóstico com alto grau de sensibilidade e especificidade para a função dos TLR.

Procedimentos

Etapa 1 – Identificação e encaminhamento do paciente

Enviar por e-mail o formulário de encaminhamento do paciente (Anexo) preenchido, com todos os resultados de exames realizados e quadro clínico do paciente.

Aguardar confirmação e agendamento por e-mail para envio das amostras de sangue.

Etapa 2 – Encaminhamento de amostras de sangue para exames laboratoriais

- Coletar do paciente e de um indivíduo controle (sem parentesco):
 - 15 mL de sangue em tubo com **heparina** para dosagem de TNF- α nas culturas celulares
- Serão aceitas amostras que forem entregues nos volumes e tubos solicitados.
-
- Identificar os tubos com caneta própria para escrita em tubos, que seja resistente à água.
- As amostras devem ser acondicionadas em temperatura ambiente.

Aguardar os resultados dessa etapa para envio de amostras de sangue para diagnóstico molecular.

Etapa 3 – Encaminhamento de amostras de sangue para diagnóstico molecular de DGC

- Coletar do paciente e de um indivíduo controle (sem parentesco):
 - 5 mL de sangue em tubo com **heparina** para extração de RNA
 - 5 mL de sangue em tubo com **EDTA** para extração de DNA
- Serão aceitas amostras que forem entregues nos volumes e tubos solicitados.
- Identificar os tubos com caneta própria para escrita em tubos, que seja resistente à água.

As amostras devem ser acondicionadas em temperatura ambiente.

Mais informações, por favor, entrar em contato com Angela Falcai (afalcai@gmail.com); (11) 3091-7435; (11) 3091-7387)