

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO INÉDITA c.21G>A (W7X) NO GENE
IL12RB1 EM PACIENTES COM DOENÇA MENDELIANA DE
SUSCETIBILIDADE ÀS MICOBACTERIOSES NO NORTE FLUMINENSE

THAIS LOUVAIN DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO DE 2016

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO INÉDITA c.21G>A (W7X) EM
PACIENTES COM DOENÇA MENDELIANA DE SUSCETIBILIDADE ÀS
MICOBACTERIOSES EM CAMPOS DOS GOYTACAZES

THAIS LOUVAIN DE SOUZA

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro como parte das
exigências para obtenção do título de
doutor em Biociências e Biotecnologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO DE 2016

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO INÉDITA c.21G>A (W7X) EM
PACIENTES COM DOENÇA MENDELIANA DE SUSCETIBILIDADE ÀS
MICOBACTERIOSES EM CAMPOS DOS GOYTACAZES

THAIS LOUVAIN DE SOUZA

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia e Biotecnologia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Clemax Couto Sant'anna (Doutor em Doenças Infecciosas e
Parasitárias). UFRJ.

Prof^a. Elena Lassounskaia (Doutora em imunologia). UENF

Prof^a. Andrea Cristina Vetö Arnholdt (Doutora em Ciências Biológicas –
Biofísica). UENF

Prof^a. Regina Célia de Souza Campos Fernandes (Doutora em Doenças
Infecciosas e Parasitárias) – FMC. (Co-orientadora).

Prof. Enrique Medina-Acosta (Doutor em Parasitologia Médica e Molecular) –
UENF. (Orientador)

Dedico esse trabalho a minha família, por sempre me darem força para lutar e seguir os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos orientadores Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta e Prof^ª. Dra. Regina Célia de Souza Campos Fernandes, por todos os ensinamentos, amizade, confiança, paciência e pelo exemplo de dedicação científica, que me inspiram a continuar na pesquisa.

Aos pacientes e seus familiares pela boa vontade em participar desse projeto.

A Dra. Elizabeth Passebon Soares por toda paciência, gentileza e colaboração com o encaminhamento de pacientes com histórico de reação adversa à vacina BCG ao nosso grupo de pesquisa.

A companheira Juliana Azevedo da Silva por compartilhar os seus conhecimentos de citometria, pela importante contribuição na elaboração dessa tese além da amizade.

Em especial a Thiago Barbosa de Souza, Filipe Brum Machado e Antonio Francisco Alves da Silva pela amizade, atenção, paciência, confiança e conselhos que contribuíram de maneira efetiva para a realização deste projeto.

Aos Professores Dr. Clemax Couto Sant'Anna, Dra. Elena Lasonkaia e Dra Andreia Arnholdt por aceitarem prontamente o convite para a participação como membros titulares na banca para defesa desta tese.

A Dra. Mariana Novo Nunes Campos, por aceitar revisar minha tese. E à professora Dra Alba Lucínia Peixoto Rangel por aceitar ser membro suplente.

A todo o corpo docente da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, que direta ou indiretamente participou efetivamente da minha formação acadêmica, em especial às coordenadoras da pós, professores Dra Kátia Valevski Sales Fernandes e Dra Olga Lima Tavares Machado.

A toda equipe do NUDIM: Maria Emilce da Rosa Francelino, Luísa Mignoni, Juliana Ywasaki, Cinthya Neves, Diego Sá, Zila Macedo, Graziela Araújo, Katrine Leonardo, Pedro Thiago, Rita Pestaña e Viviane Lamin Lovatel pelo convívio, companheirismo e aprendizado mútuo.

Aos amigos e alunos de iniciação científica Leonardo Nominato, Vladimir Gomes e Thiago Barcellos pela energia e aprendizado que contribuíram de maneira efetiva para a realização deste projeto.

Aos amigos: Fabrício Moreira Almeida, Giliane da Silva de Souza, Paula Magnelli, Liliane Barroso, Thayssa Barreto, Claudia Letícia da Silva, Monique Camila da Silva, David Gitirana da Rocha pela amizade, convívio e momentos de lazer.

Aos meus pais pelo incentivo, apoio e educação.

À minha irmã e meu cunhado pelo incentivo e exemplo de determinação.

A Amaro pelo amor pela compreensão, incentivo e apoio.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, pela oportunidade concedida.

A FAPERJ, NUDIM, Hospital Escola Álvaro Alvim e Fundação Benedito Pereira Nunes, por todo auxílio técnico e financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTAS DE TABELAS.....	V
1. Introdução	1
1.1 Reação adversa à vacina BCG.....	1
1.2 Doença Mendeliana de Suscetibilidade às micobactérias.....	2
1.2.1 Mutações no gene IL12RB1 causadoras da DMSM.....	4
1.2.2 Características fenotípicas	6
1.2.3 Distribuição geográfica das mutações.....	9
1.3 Hipótese.....	10
2 Justificativa	11
3 Objetivos gerais.....	11
3.1 Objetivos específicos	11
4 Materiais e Métodos	12
4.1 Desenho.....	12
4.2 Aspectos éticos	13
4.3 Metodologia de análise de dados.....	15
4.4 Material biológico, extração de DNA e RNA e PCR	15
4.5 Isolamento e cultivo de PBMC.....	16
4.6 Detecção de IL12Rβ1, IFN-γR1 e quantificação de citocinas	16
4.7 Teste da oxidação da diidrorodamina (DHR).....	16
4.8 Sequenciamento de genes alvos.....	17
4.9 Análise dos dados	17
5. Resultados	18
5.1 Implementação da pesquisa translacional.....	18
5.1.1 Caracterização da Coorte.....	18
5.1.2 Relatos de Casos	20
5.2 Painel imunofenotípico.....	31
5.2.1 Avaliação da expressão de IL-12Rβ1 nas crianças com episódios de reação adversa ao BCG	31
5.2.2 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultivo de PBMCs. 34	
5.2.3 Quantificação da expressão de IFNGR1 nas crianças com episódios de reação adversa a BCG.....	37
5.2.4 Avaliação da produção de espécies reativas de O ₂ -	40
5.2.5 Quantificação da expressão ex vivo de marcadores para outras células do sistema imune.....	42
5.2.6 Sequenciamento do gene IL12RB1.....	44
5.2.7 Sequenciamento dos genes IFNGR1 e IFNGR2.....	45
5.3 Caracterização da DMSM nos pacientes com a mutação c.21G>A	49
5.3.1 Determinação da frequência da mutação c.21G>A	49
5.3.2 Rastreamento da origem da mutação c.21G>A	51
5.3.3 Duffy	55
6. Discussão	56

7. Conclusão	63
8. Referências	64
Apêndice A	71
Apêndice B.....	78
Apêndice C.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos 17 exons codificantes de IL12R β 1.	5
Figura 2. As frequências das infecções por Salmonela, fúngicas e por micobactérias juntamente com as respectivas taxas de mortalidade..	6
Figura 3. Mapa representativo dos números de casos diagnosticados com deficiência de IL12R β 1..	10
Figura 4. Fluxograma do acompanhamento dos casos com reação adversa à vacina BCG.	14
Figura 5. Painel descritivo das crianças incluídas no estudo e seus desfechos clínicos.	19
Figura 6. Diagnóstico de Histoplasmose com acometimento de laringe e linfonodos no paciente 830F1.....	20
Figura 7. Heredrogama representativo da família 830..	22
Figura 8. Abscesso na região subcostal esquerda do paciente 830F2.	22
Figura 9. Heredrogama representativo da família 1212.	24
Figura 10. Exame histopatológico sugestivo de ptíriase líquen (biópsia da mão esquerda) e vasculite leucocitoclástica (biópsia da perna esquerda) no paciente 1212F..	24
Figura 11. Heredrogama representativo da família 1286F.	25
Figura 12. Fotografia da reação adversa à vacina BCG no paciente 1286F.	25
Figura 13. Heredrogama representativo da família 1528.	26
Figura 14. Heredrogama representativo da família 1620F.	27
Figura 15. Fotografia da reação adversa à vacina BCG na paciente 1620F.	27
Figura 16. Heredrogama representativo da família 1635F..	28
Figura 17. Fotografia da reação adversa à vacina BCG na paciente 1635F.	28
Figura 18. Heredrogama representativo da família 1668F.	29
Figura 19. Fotografia da reação adversa à vacina BCG no paciente 1668F.	29
Figura 20. Heredrogama representativo da família 1692F.	30
Figura 21. Fotografia da reação adversa à vacina BCG no paciente 1692F.	30
Figura 22. Histogramas representativos da quantificação de expressão de IL-12R β 1 (CD212).	31
Figura 23. Diferença na porcentagem de células que expressam IL-12R β 1 (CD212) <i>ex vivo</i>	32

Figura 24. Diferença na porcentagem de células que expressam IL-12R β 1 (CD212) após estímulo <i>in vitro</i> das PBMCs com PHA.....	33
Figura 25. Produção <i>in vitro</i> de IFN- γ por PBMCs estimulados com PHA.....	35
Figura 26. Produção <i>In vitro</i> de IFN- γ por PBMCs estimulados com lisado de BCG <i>in vitro</i>	36
Figura 27. Produção <i>in vitro</i> IL-17A por PBMCs estimulados com lisado de BCG <i>in vitro</i>	37
Figura 28. Histogramas representativos da quantificação de expressão de IFNGR1 (CD119) no paciente 1212F diagnosticado com DMSM e no controle 301F.	38
Figura 29. Diferentes níveis de expressão <i>ex vivo</i> de IFNGR1 (CD119+).	39
Figura 30. Diferença na porcentagem de células que expressam IFNGR1 (CD119) após estímulo <i>in vitro</i> das PBMCs com PHA.....	40
Figura 31. Histograma representativo do teste de Dihidrorodamina.	41
Figura 32. Diferença na porcentagem de células T CD4+, T CD8+ e a razão CD4+/CD8+ em análise <i>ex vivo</i>	43
Figura 33. Diferença na porcentagem de linfócitos B (CD45+CD19+) e células NK (CD16+/CD56+) em análise <i>ex vivo</i>	43
Figura 34. Sequenciamento de DNA revela mutação c.21G>A (c.21C>T, W7X) no gene <i>IL12RB1</i>	46
Figura 35. Produtos de PCR de éxons dos genes IFNGR1 e IFNGR2.	47
Figura 37. Alinhamento do exon 4 do gene <i>IFNGR1</i> do paciente 1667F com a sequência referência.	48
Figura 38. Eletroferograma representativo da genotipagem da mutação c.21G>A do gene <i>IL-12Rβ1</i> por RFLP-QF-PCR.....	49
Figura 39. Eletroferograma representativo da genotipagem por minissequenciamento de único nucleotídeo da mutação c.21G>A do gene <i>IL12Rβ1</i>	50
Figura 40. Eletroferograma representativo da genotipagem por minissequenciamento de único nucleotídeo dos 8 SNPs alvos no gene <i>IL12Rβ1</i>	54
Figura 41. Sequenciamento de DNA para identificação do SNP rs2814778 em amostra do paciente 1212F.....	55

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos pacientes participantes do projeto e as respectivas condições diagnósticas em relação à DMSM ou DGC.	18
Tabela 2. SNPs no gene <i>IL-12Rβ1</i> alvos do estudo.	51
Tabela 3. Possíveis haplótipos a serem obtidos com a genotipagem dos SNPs no gene <i>IL-12Rβ1</i> alvos do estudo.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG Bacillus Calmette-Guérin (*Mycobacterium bovis* atenuada)

bp pares de base

CAGMG Colégio Americano de Genética Médica e Genômica

DGC Doença Granulomatosa Crônica

DHR Dihidrorodamina

DNA Ácido desoxirribonucleico

IL10 Interleucina 10

IL12 Interleucina 12

IL17A Interleucina 17^a

MSMD Doença Mendeliana de Suscetibilidade às Micobactérias

MTB *Mycobacterium tuberculosis*

NCBI National Center for Biotechnology Information

NUDIM Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular.

OMS Organização Mundial da Saúde

PCR Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PCR-RFLP Ensaio enzimático de digestão de polimorfismo no comprimento do fragmento após PCR (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)

PHA fitohemaglutinina, lectina de *Phaseolus vulgaris*

QF-PCR quantitativa fluorescente (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction)

SNP Polimorfismo de Único Nucleotídeo

SNPdb Banco de dados de Polimorfismos de Único Nucleotídeo do NCBI

TCD4+ Linfócito T helper

TCD8+ Linfócito T Citotóxico

UCSC University of California Santa Cruz; Universidade Santa Cruz da Califórnia.

Resumo

A reação adversa à vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) acomete crianças com resposta imunológica celular deficiente. Essa deficiência é desencadeada por um número reduzido de linfócitos ou macrófagos, incapacidade em produzir O_2^- ou comprometimento da via IL12-IFN- γ . A diminuição da produção de IFN- γ é uma das causas da Doença de Susceptibilidade Mendeliana às Micobactérias (DSMM) inclusive ao BCG vacinal. O objetivo dessa pesquisa foi investigar as populações celulares em sangue periférico (PBMC) de crianças com episódios de reação adversa ao BCG vacinal, e a expressão de proteínas envolvidas no eixo IL-12/IFN- γ . **Métodos:** Foram incluídas no estudo nove crianças da região Norte Fluminense com reação adversa ao BCG vacinal. Os níveis de expressão dos marcadores celulares de linfócito T (CD45+CD3+CD4+CD8+), linfócitos B (CD19+), células NK (CD16+CD56+) e receptores IL-12R β 1 (CD212+) e IFNGR1 (CD119+) foram quantificados por citometria de fluxo. A produção da citocina IFN- γ e de IL17-A em sobrenadantes de cultivo de células do sangue, estimuladas ou não com fitohemaglutunina (PHA) ou lisado de BCG, foi avaliada por citometria de fluxo quantitativa com o uso de microesferas. Para identificação de mutações patogênicas foi utilizado genotipagem por sequenciamento Sanger, minissequenciamento de base única e PCR-RFLP da mutação c.21G>A (rs150172855) em DNA de sangue venoso coletado de crianças com histórico de reação adversa ao BCG e seus respectivos pais. **Resultados:** Quatro crianças foram diagnosticadas com DSMM. Dois irmãos e um terceiro menino foram homozigotos para a mutação c.21G>A no gene *IL12R β 1* e os respectivos pais heterozigotos. O quarto menino foi ao óbito sem coleta de amostra biológica, porém os pais foram heterozigotos. Foi encontrada diferença significativa entre os níveis de expressão *ex vivo* de IL-12R β 1 nas células de três pacientes com DSMM e quatro sem DSMM, e entre os com DSMM e quatro indivíduos sem histórico de reação adversa ao BCG vacinal (grupo controle). PBMC dos pacientes com DSMM produziram menos IL-12R β 1 após o estímulo com PHA quando comparados com indivíduos controles saudáveis ou com os do grupo sem DSMM. Os pacientes sem DSMM e com DSMM produziram menos IFN- γ quando as PBMC foram estimuladas com PHA. Quando estimuladas com lisado de BCG, PBMC dos indivíduos controles produziram mais IFN- γ do que os pacientes com DSMM ou sem DSMM. Adicionalmente, os pacientes sem DSMM produziram mais IFN- γ do que os pacientes com DSMM. Não houve diferença

entre os níveis de TCD4+, TCD8+, B e células NK entre os três grupos. **Discussão:** Os pacientes com histórico de reação adversa ao BCG vacinal produzem menores quantidades de IFN- γ . Entretanto, os pacientes com DSMM apresentaram menor expressão de IL-12R β 1 e IFN- γ do que os pacientes sem DSMM e controles. Assim sendo, o fenótipo observado de redução de IL-12R β 1 e IFN- γ reafirma a condição diagnóstica. O alelo c.21G>A em homozigose desencadeia a imunodeficiência primária por deficiência de IL12R β 1, entretanto níveis baixos da proteína são encontrados na superfície de linfócitos dos pacientes acometidos, fato inédito para uma mutação caracterizada como stop-codon. De acordo com análises *in silico*, a mutação possui um efeito potencialmente deletério no splicing do RNA. Todos os portadores da mutação c.21G>A carregam o mesmo haplótipo CACCAGTCCGG (Fita positiva), caracterizando um efeito fundador. **Conclusão:** Foi encontrada uma mutação inédita de c.21G>A (W7X) no gene *IL12RB1* em quatro pacientes com doença mendeliana de suscetibilidade às micobacterioses no norte fluminense. Esta é a primeira mutação stop-codon no gene *IL12RB1* cuja expressão da proteína foi detectada na superfície de linfócitos estimulados. A quantificação de IL-12R β 1 e IFN- γ foi extremamente importante no diagnóstico de DSMM na coorte de crianças com episódios de reação adversa ao BCG vacinal. O diagnóstico precoce da DSMM auxiliou na determinação das ações profiláticas a fim de diminuir a mortalidade e morbidade desses pacientes.

Descritores: Doença Crônica Granulomatosa, Doença de Suscetibilidade Mendeliana para Micobactérias, Imunodeficiência Primária.

Abstract

The adverse reaction of BCG vaccine affects children with poor cellular immune response. This deficiency is triggered by an absence of lymphocytes and macrophages, inability to produce O₂- or compromised via IL-12-IFN- γ . The decreased production of IFN- γ is one of the causes of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease (MSMD). The objective of this research was to investigate the cell populations in peripheral blood (PBMC) of children with episodes of adverse reaction to the vaccine BCG, and the expression of proteins involved in IL-12/IFN- γ axis. **Methods:** The study included nine children of North Fluminense region of Rio de Janeiro State with adverse reaction to the vaccine BCG. The expression levels of cellular markers for T lymphocytes (CD45+ CD3+ CD4+ CD8+ cells), B-lymphocytes (CD19+), NK cells (CD16+ CD56+) and IL-12R β 1 (CD212+) and IFNGR1 (CD119+) receptors were quantified by flow cytometry. The production of IFN- γ and IL17-A cytokine in the supernatants of growing blood cells stimulated or not with phytohemagglutinin (PHA) or BCG lysate was assessed by quantitative flow cytometry using microspheres. For identification of pathogenic mutations we used Sanger sequencing, single base sequencing and PCR-RFLP of c.21G mutation> A (rs150172855) in venous blood DNA collected from children with adverse reactions to BCG history and their parents. **Results:** Four children were diagnosed with MSMD. Two brothers and a third boy were homozygous for the c.21G> A mutation in the *IL12RB1* gene, and their parents were heterozygous. The fourth boy died without collecting biological sample, but the parents were heterozygous for the same mutation. There was a significant difference between the *ex vivo* levels of expression of IL-12R β 1 in cells from three patients with MSMD and from four without MSMD when compared with healthy control. PBMC of patients with MSMD produced less IL-12R β 1 after stimulation with PHA when compared with healthy control subjects or subjects without MSMD. Patients without MSMD and with MSMD produced less IFN- γ when PBMC upon stimulation with PHA when compared with healthy control subjects. BCG-stimulated PBMC of control subjects produced more IFN- γ than those from MSMD s or without MSMD. In addition, patients without MSMD produced more IFN- γ than in MSMD patients. There was no difference between the levels of CD4 +, CD8 +, B and NK cells between the three groups. **Discussion:** Patients with history of adverse reaction to the BCG vaccine produce lower amounts of IFN- γ . However, patients with MSMD showed lower expression of IFN- γ and IL-

12R β 1 versus patients without MSMD or controls. Thus, the phenotype observed IL-12R β 1 reduction and IFN- γ reaffirms the diagnostic condition. The homozygous allele c.21G> triggers primary immunodeficiency deficiency of IL-12R β 1, but low levels of the protein are found on the surface of lymphocytes of affected patients. This is the first report of an *IL12RB1* stop-codon mutation with paradoxical cell-surface expression of the receptor. According to *in silico* analysis, the mutation has a potentially harmful effect on RNA splicing. All carriers of the mutation c.21G>A share the extended CACCAGTCCGG haplotype (positive strand), featuring a founder effect. **Conclusion:** We identified the novel c.21G> A (W7X) signal-peptide stop mutation in *IL12RB1* in four patients with MSMD in the Northern State of Rio de Janeiro. In homozygous carriers, the mutation causes complete IL-12R β 1 deficiency with paradoxical cell-surface protein expression in stimulated lymphocytes. Quantification of IFN- γ and IL-12R β 1 was extremely important in the diagnosis of MSMD in this cohort of children with episodes of adverse reaction to the BCG vaccine. Early diagnosis of MSMD helped determining the preventive actions in order to reduce mortality and morbidity in these patients.

Keywords: Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease, Chronic Granulomatous Disease, Primary immunodeficiency.

1. Introdução

1.1 Reação adversa à vacina BCG

A Organização Mundial de Saúde (WHO) recomenda a vacinação com o *Bacillus Calmette-Guérin* (vacina BCG) em recém nascidos de vários países, especialmente nos que possuem alto índice de tuberculose para prevenir a tuberculose miliar e meningite tuberculosa na primeira infância (Norouzi, Aghamohammadi *et al.*, 2012). Os efeitos esperados da vacina BCG é uma reação localizada na região da aplicação da vacina com um diâmetro de até 10mm ou menos (Dommergues, De La Rocque *et al.*, 2009). Dommergues e colaboradores (2009) descreveram que na França de 2435 crianças vacinadas, 158 (5,6%) não apresentaram os efeitos esperados, nem efeitos adversos e nem cicatriz vacinal.

As reações adversas à vacina BCG podem ser classificadas em locais ou disseminadas. As reações locais incluem o abscesso cutâneo frio ou quente, a úlcera com diâmetro maior que 1 cm, reação quelóide, linfadenopatia regional supurativa ou não supurativa e a reação lupóide. O evento adverso disseminado ocorre na pele de forma semelhante à tuberculose cutânea e pode ser também osteoarticular ou comprometer um ou mais órgãos (Brasil, 2008). Enquanto que a BCGite é o nome da doença regional localizada, a BCGose é o nome da forma disseminada da doença causada pela vacina BCG (Norouzi, Aghamohammadi *et al.*, 2012).

De acordo com o Ministério da Saúde, a incidência de BCGite em crianças menores de um ano é de 0,387 por mil vacinados exceto a reação lupóide que é de menos de 1 caso a cada 10 milhões de vacinados (Brasil, 2008). Possíveis razões para a linfadenite supurativa (um dos tipos de BCGite) associada à vacina BCG incluem idade (a resposta imune imatura pode ser menos capaz de controlar os organismos vivos atenuados da BCG), dose vacinal, cepa da vacina (a cepa Copenhaguen tem sido associada com maior incidência de adenite supurativa) e técnica de administração (Stephens e Donnelly, 2003). Na Inglaterra, a incidência de linfadenite supurativa entre 2002 e 2003 foi de 31/10000 com a cepa Copenhaguen 1331 (Stephens e Donnelly, 2003; Teo, Smeulders *et al.*, 2005), enquanto que na França, 1/1000 crianças tiveram nódulos linfáticos aumentados com a cepa Danish 1331 (Dommergues, De La Rocque *et al.*, 2009). Em Portugal, a incidência de BCGite entre 2010-2012 foi de 0,98/1000 (Ladeira, Carvalho *et al.*, 2014).

A prevalência de reações disseminadas varia de 0,39 a 1,9 por milhão de crianças vacinadas (Brasil, 2008). As reações adversas sistêmicas à vacina BCG acometem principalmente crianças com alguma deficiência na resposta imunológica celular. Crianças com imunodeficiência primária ou adquirida são mais suscetíveis à BCGite/BCGose (Puthanakit, Oberdorfer *et al.*, 2005; Bustamante, Aksu *et al.*, 2007; Hesseling, Johnson *et al.*, 2009; Kusuhara, Ohga *et al.*, 2009; De Souza Campos Fernandes e Medina-Acosta, 2010).

Devido à deficiência da via IFN- γ /IL12, os pacientes com Doença Mendeliana de Suscetibilidade às Micobactérias (DMSM/ MSMD/ IMD30) e Imunodeficiência Primária Severa Combinada (IPSC/ SCID/ IMD18) apresentam as formas mais graves de reação adversa à vacina BCG (Norouzi, Aghamohammadi *et al.*, 2012). Os fagócitos dos indivíduos acometidos pela doença granulomatosa crônica não são capazes de destruir o BCG intracelular em ensaios *in vitro* (Lamhamedi-Cherradi, De Chastellier *et al.*, 1999). Por isso, esses pacientes geralmente apresentam mais frequentemente a forma localizada com linfadenite (Norouzi, Aghamohammadi *et al.*, 2012). Os pacientes com Hiper-IgE e Hiper IgM também são suscetíveis à reação adversa à vacina BCG, sendo que os primeiros possuem maior suscetibilidade para BCG e micobactérias não tuberculosas do que para o MTB (Norouzi, Aghamohammadi *et al.*, 2012). Junto a essas doenças crônicas, a hipogamaglobulinemia transitória da infância já foi diagnosticada em um paciente com BCGite (Lynch, O'loughlin *et al.*, 2012), podendo também estar relacionada com o aumento de suscetibilidade à reação adversa à vacina BCG.

1.2 Doença Mendeliana de Suscetibilidade às micobactérias

A DMSM é uma doença rara (1/1000000) e os indivíduos acometidos possuem alta suscetibilidade às micobactérias e salmonelas de baixa virulência, bem como podem desenvolver doenças fúngicas causadas por *Candida*, *Paracoccidioides* ou *Histoplasma* (De Beaucoudrey, Samarina *et al.*, 2010; Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013). Indivíduos acometidos por DMSM possuem desenvolvimento intelectual e físico normal (Kutukculer, Genel *et al.*, 2006; Luangwedchakarn, Jirapongsaranuruk *et al.*, 2009). Biologicamente, a característica de DMSM é a ausência ou redução em número da citocina IFN- γ bem como ausência de seu reconhecimento (Guia, Cagnet *et al.*, 2008). Os acometidos pela DMSM demonstram também modesta vulnerabilidade para aproximadamente 20% dos vírus (Miro, Nobile *et al.*, 2006).

A DMSM ocorre quando a via IL-12-IFN- γ está comprometida. Para tal comprometimento, é necessário que mutações deletérias ocorram nos genes que codificam proteínas participantes da referida via, tal como: *IL12B* que codifica a subunidade IL12p40 da citocina IL12/IL23; *IL12RB1* citado anteriormente, que codifica a proteína IL-12R β 1 que é a cadeia β 1 do receptor de IL12/23; *IFNGR1* que codifica a subunidade do receptor de IFN- γ que se liga à citocina; *IFNGR2* que codifica a subunidade acessória do receptor de IFN- γ ; e *STAT1* que codifica o STAT1 que é um transdutor de sinal do receptor de IFN- γ (Al-Herz, Bousfiha *et al.*, 2011). Em países com alta taxa de casamento consanguíneo (devido a conceitos religiosos e culturais), a forma autossômica recessiva de DMSM é significativamente mais prevalente do que as demais formas (AD e ligada ao X) (Norouzi, Aghamohammadi *et al.*, 2012).

O diagnóstico precoce de DMSM propicia um melhor protocolo terapêutico e acompanhamento dos pacientes, com a utilização profilática de antibióticos ou transplante de medula óssea. Em infecções mais graves, os pacientes podem utilizar antibióticos por longos períodos e/ou IFN- γ exógeno e até GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos) (Sanal, Morgan *et al.*, 2000; De Beaucoudrey, Samarina *et al.*, 2010).

A DMSM é uma doença clínica, na qual o fenótipo está intimamente relacionado com as micobactérias, salmonelas e fungos com os quais o indivíduo acometido entra em contato ao longo de sua vida. Nos países endêmicos para tuberculose, uma das primeiras cepas de micobactérias com que um indivíduo entra em contato é o da vacinação com o Bacilo Calmete-Guérin (BCG).

Nas células dos pacientes com episódios de reações adversas à vacina BCG e/ou micobacterioses atípicas, foram encontrados baixos níveis das citocinas IFN- γ e TNF (Levin, Newport *et al.*, 1995; Tuerlinckx, Vermynen *et al.*, 1997). Consequentemente, mutações em genes envolvidos na produção e resposta à citocina IFN- γ (via IL-12-IFN- γ) foram relatados como causadoras da DMSM. Entre eles o gene *IL12RB1*, foi primeiramente citado em 1998 (Altare, Lammas *et al.*, 1998), dois anos após a descoberta da proteína IL-12R β 1 (Presky, Yang *et al.*, 1996). Mutações no gene *IL12RB1* são responsáveis pela maioria dos casos de DMSM (De Beaucoudrey, Samarina *et al.*, 2010).

1.2.1 Mutações no gene *IL12RB1* causadoras da DMSM

Atualmente, 77 mutações no gene *IL12RB1* já foram descritas como causadoras de DMSM (Van De Vosse, Haverkamp *et al.*, 2013). O padrão de herança das mutações nesse gene são autossômicas recessivas. A penetrância é incompleta, com vários casos de irmãos geneticamente afetados, onde um dos pares permanece assintomático. Em 207 pacientes registrados no banco de dados de variantes *IL12RB1* LOVD2, estão incluídos 4 casos de Campos dos Goytacazes, RJ (Van De Vosse, Haverkamp *et al.*, 2013). Nesse banco de dados existem 77 mutações, que estão distribuídas do exon 1 ao intron 15 (**Figura 1**). As três mutações com maiores números de indivíduos acometidos pela DMSM são as 1791+2T>G (13,0%; 27/207), c.783+1G>A (8,7%; 18/207) e c.1623_1624delinsTT (7,2%; 15/207), duas destas intrônicas.

Com exomas de 60.706 indivíduos (europeus, africanos, do sul e leste da Ásia e americanos misturados), o Exac Browser é um banco de dados onde foram depositados dados de mais de 60.000 exomas de indivíduos de diversos grupos étnicos (Song, Gardner *et al.*, 2015). O Exac é uma ótima ferramenta para se determinar a frequência alélica das mutações e em qual grupo étnico ela é mais proeminente (Song, Gardner *et al.*, 2015). Das 67 mutações descritas no banco de dados de variantes *IL12RB1* LOVD2, 7 foram encontradas no Exac (**Figura 1**). Todos os indivíduos do banco de dados Exac eram portadoras de apenas um alelo mutante, isto porque o banco de dados Exac exclui dados de pacientes diagnosticados clinicamente com alguma doença grave inclusive os pacientes diagnosticados com DMSM carreadores de dois alelos mutantes no gene *IL12RB1*.

A provável baixa apresentação dos polimorfismos cadastrados no LOVD2 no banco de dados EXAC é devido à pequena frequência dos alelos mutantes (em sua maioria menor que 0,0002) e na baixa amostragem populacional da população turca no banco de dados. Que possui significativa quantidade de diferentes tipos de alelos mutantes e o maior número de casos relatados.

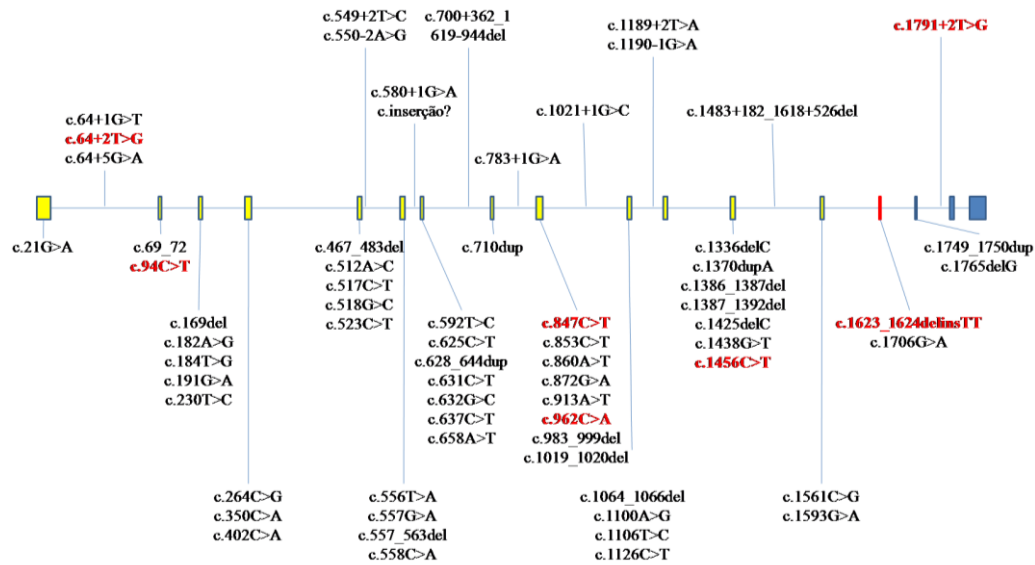


Figura 1. Esquema representativo dos 17 exons codificantes de IL12Rβ1.

Em amarelo os exons codificantes da região extracelular responsável pela interação com a porção IL12p40 da citocina IL-12; em vermelho o exon codificante da região transmembrana e em azul a porção intracelular do receptor responsável pela sinalização. As 77 mutações causadoras da DMSM registradas no banco de dados LOVD2 estão distribuídas do exon 1 ao intron 15. As mutações encontradas no banco de dados Exac estão em vermelho.

1.2.2 Características fenotípicas

Para a busca dos relatos de casos de pacientes com deficiência de IL-12R β 1 a base eletrônica Pubmed (NLM) foi consultada. As seguintes palavras chaves foram utilizados na busca: “IL12RB1 deficiency, IL-12Rbeta1 deficiency e Interleukin 12 receptor beta1 deficiency”. Foram encontradas 128 referências publicadas entre 1995 a 2014, sendo 22 revisões. Os critérios de inclusão dos relatos de caso foram: descrição da mutação no gene *IL12RB1* causadora da DMSM e/ou avaliação da expressão de IL-12R β 1 na superfície de linfócitos estimulados. Sendo assim, foram incluídos 59 artigos originais, destes 3 revisões. Essa pesquisa culminou com 187 crianças registradas.

Das 187 crianças, 53 vieram a óbito (28,34%), taxa mais alta do que encontrada no artigo de revisão de Beaucoudrey e colaboradores em 2010 (15%) e próxima da encontrada por Van de Vosse e colaboradores em 2013 (30%). A média de idade da ocorrência do óbito de acordo com as publicações foi de 4,9 anos (8 meses a 37 anos). Como tratamento, 11 das 53 (20,75%) das crianças que faleceram chegaram a utilizar IFN- γ exógeno (Levin, Newport *et al.*, 1995; Altare, Durandy *et al.*, 1998; De Jong, Altare *et al.*, 1998; De Beaucoudrey, Samarina *et al.*, 2010; Gruenberg, Anover-Sombke *et al.*, 2010; Alangari, Al-Zamil *et al.*, 2011; Gimenez-Sanchez, Cobos-Carrascosa *et al.*, 2014). A maioria das crianças que faleceram eram do sexo masculino (32/53, 60,37%) e tinham tomado a vacina BCG (40/53, 75,45%). Frequências de outras infecções desses 187 casos se encontram na **figura 2**.

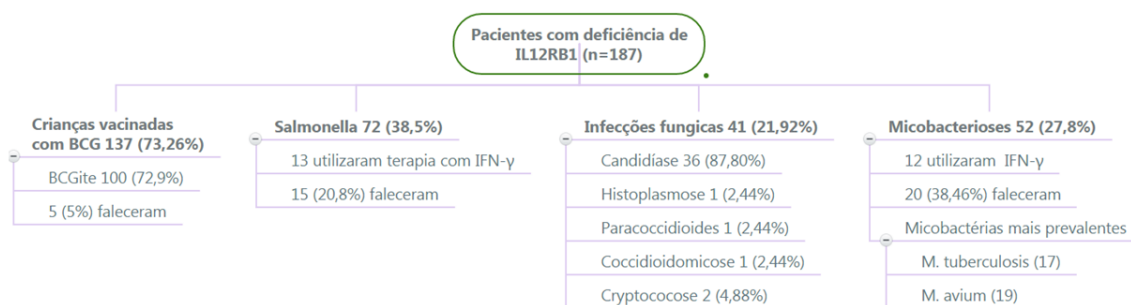


Figura 2. As frequências das infecções por Salmonela, fúngicas e por micobactérias juntamente com as respectivas taxas de mortalidade. Dados retirados de dados publicados de 187 casos com deficiência de IL12R β 1.

Os pacientes com DMSM com defeitos na IL-12R β 1 não produzem IFN- γ , ou o fazem em pouca quantidade. Nos nódulos linfáticos, as lesões granulomatosas são observadas em pacientes com deficiência de IL-12R β 1 ou IL-12, mas não nos pacientes com deficiência total de receptor de IFN- γ , demonstrando que quantidades mínimas de IFN- γ são necessárias para a formação do granuloma (Sakai, Matsuoka *et al.*, 2001). Essa quantidade mínima é produzida por outras vias. IL-12, IL-23 e IL-18 promovem a produção de IFN- γ (Hoeve, Savage *et al.*, 2006). Entretanto, a produção de IFN- γ e de TNF- α é controlada pela citocina IL-12 (Miro, Nobile *et al.*, 2006). Como em um paciente IL12R β 1- as vias IL-12 e IL-23 estão comprometidas, IL-18 é uma alternativa para a produção de IFN- γ . IL-18 induz a proteína ativadora AP-1, entretanto esse efeito é dependente de STAT4 e conseqüentemente da via IL-12 (Sugimoto, Nakahira *et al.*, 2003).

Adicionalmente, essa ausência de IL-12R β 1 compromete não apenas a manutenção e funcionalidade de células Th1 e Th17. A deficiência de IL-12R β 1 influencia também outras vias, bem como na estrutura e arranjo celular no tecido linfóide sadio. Os tecidos, células e mecanismos efetores que os pacientes com deficiência de IL-12R β 1 demonstram alterações são listados a seguir:

a) Os acometidos pela DMSM demonstram modesta vulnerabilidade para aproximadamente 20% dos vírus (Miro, Nobile *et al.*, 2006). Entretanto, as células Th1/IL12R β 1- podem proteger os indivíduos contra vários patógenos intracelulares como os vírus, numa condição independente de IL-12 (Sakai, Matsuoka *et al.*, 2001; Yu, Chen *et al.*, 2005).

b) Pacientes com deficiência de IL-12R β 1 não são suscetíveis a infecções associadas à deficiência de linfócito B (Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013). Mas, de alguma forma a geração de linfócito B de memória, sua sobrevivência ou ambos os eventos estão alterados em pacientes deficientes de IL-12R β 1 (Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013). Esses pacientes demonstram maiores proporções de células B virgens IgD+CD27- do que controles. Porém, possuem menores proporções de células IgD-CD27+ (célula B de memória trocadora de classe) e IgD+CD27+ (célula B de memória não trocadora de classe) do que controles pareados por idade (Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013).

c) Os pacientes deficientes de IL-12R β 1 demonstram incapacidade de formação de centro germinativo nos linfonodos. Isso demonstra que o eixo IL-12-STAT4 está associado com o desenvolvimento e função das células T foliculares auxiliares *in vivo* em humanos. (Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013). Células T auxiliares foliculares são o maior subtipo de T CD4+ que fornecem auxílio para a geração de anticorpos pelo linfócito B. Ambas as células estão juntas no centro germinativo, onde linfócitos B de alta afinidade são selecionados e diferenciam-se em células B de memória ou células plasmáticas de longa vida (Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013). Dificuldade nas respostas do centro germinativo pode ser a causa da redução do número de células B de memória no sangue dos indivíduos com deficiência de IL12R β 1.

d) Pacientes IL12R β 1- possuem maior porcentagem de células T CD4+ virgem e conseqüentemente menor porcentagem de células T CD4+ de memória (Ma, Avery *et al.*, 2012). Adicionalmente, os linfócitos T de memória que expressam CD56+ foram demonstradas severamente diminuídas em pacientes com deficiência de IL12R β 1- (Guia, Cagnet *et al.*, 2008).

e) Linfócitos T CD4+ de pacientes com deficiência de IL12R β 1- possuem uma deficiência em induzir a ativação de células dendríticas do que as células oriundas de pacientes com deficiência de CD40- (Hiper IgM) (Miro, Nobile *et al.*, 2006).

f) Ma e colaboradores (2012) revelaram que pacientes com deficiência de IL-12R β 1 apresentam níveis normais de CD4+ CXCR5+ (células T foliculares), que são importantes para o desenvolvimento da resposta humoral (Ma, Avery *et al.*, 2012). Contudo, Schmitt e colaboradores (2013) encontraram que os pacientes deficientes de IL-12R β 1 possuem uma diminuição na frequência de T CD4+ CXCR5+ no sangue (Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013) causada tanto pela redução de células Th1 de memória quanto pela redução da expressão do CXCR5 na superfície das células Th1 de memória. Esse fenômeno é decorrente da importância de IL-12 em induzir células T CD4+ virgens a expressarem CXCR5, ICOS e Bcl-6 (Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013).

g) Pacientes deficientes de IL-12R β 1 possuem maiores níveis de IgM e IgG do que controles saudáveis. Esses pacientes mostram níveis normais de IgG antitoxina tetânica, entretanto a avidade dos anticorpos é menor (Schmitt, Bustamante *et al.*, 2013).

1.2.3 Distribuição geográfica das mutações

Das 77 mutações cadastradas no banco de dados LOVD2, 10 foram encontradas em pacientes oriundos mais de um país. Entretanto, assim como outras doenças autossômicas recessivas, as mutações no gene *IL12RB1* encontram-se regionalizadas em países com altas taxas de casamento consanguíneo, ilhas e microrregiões afastadas de centros urbanos. Aproximadamente metade das mutações foi encontrada em pacientes do Oriente Médio ou de origem parental oriunda de indivíduos mulçumanos. Muitos desses pacientes descendentes de paquistaneses, turcos ou árabes foram diagnosticados na Europa. Devido às crescentes taxas de migração de indivíduos oriundos desses países para a Europa na última década mais pacientes com DMSM tem sido diagnosticados por terem acesso à saúde com suporte investigativo para imunodeficiências primárias.

O único estudo que caracteriza o efeito fundador de mutações nesse gene é proveniente da Argentina, onde a colonização Européia foi responsável por dispersar a mutação c.1623_1624delinsTT presente também em vários países na Europa como França, Bélgica e Alemanha (Yancoski, Rocco *et al.*, 2009).

A maioria dos países não possuem registro de pacientes diagnosticados com DMSM (**Figura 3**). Dois fatores podem estar relacionados a isso: o primeiro seria o acesso a centros de investigação de imunodeficiência primária; e o segundo, a ausência de indicação da vacina BCG no primeiro ano de vida em países não endêmicos para tuberculose.

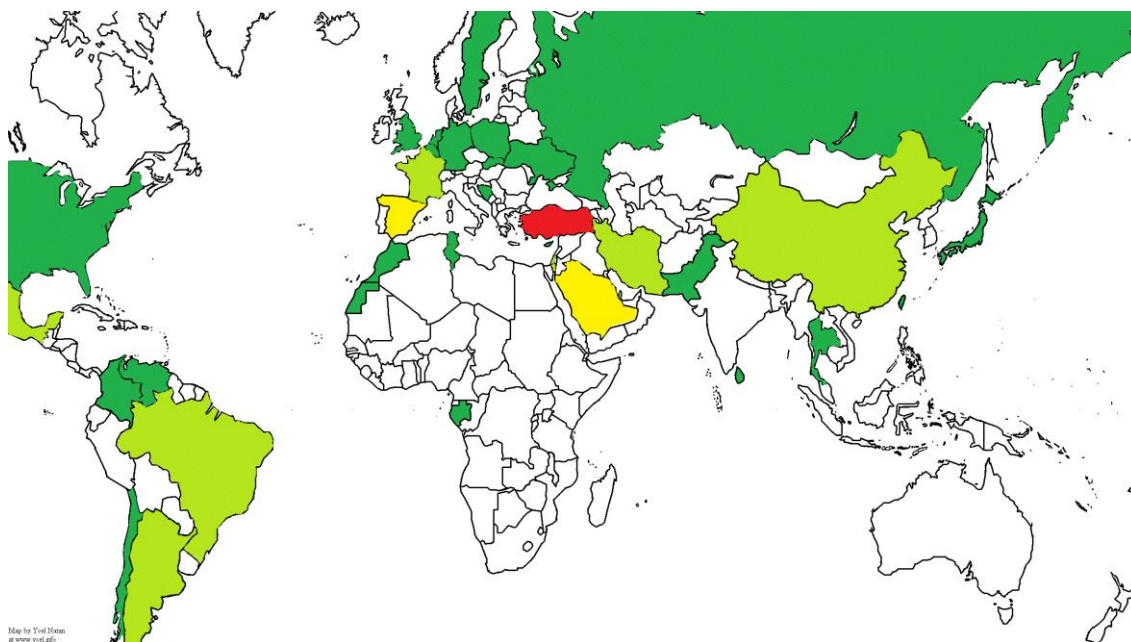


Figura 3. Mapa representativo dos números de casos diagnosticados com deficiência de IL12R β 1. Escala de calor nos países com casos cadastrados no LOVD2 representando: verde escuro (1-5 casos), verde claro (6-10 casos), amarelo (11-20 casos), amarelo alaranjado (21-30 casos), laranja (31-40 casos) e vermelho (41-50 casos).

1.3 Hipótese

A Doença Granulomatosa Crônica e a Doença de Suscetibilidade Mendeliana para Micobactérias podem constituir a base genética mais frequentemente associada aos eventos adversos severos ao BCG vacinal na região Norte Fluminense.

2 Justificativa

Recentemente o Ministério da Saúde divulgou alerta sobre os sinais de imunodeficiência primária destacando a importância de se acompanhar melhor pacientes com histórico de BCGite/BCGose. Pouquíssimos centros de pesquisa no Brasil ofertam esse tipo de diagnóstico especializado. A interiorização do diagnóstico especializado em imunodeficiências primárias é indispensável.

3 Objetivos gerais

Investigar as bases moleculares e genéticas da reação adversa severa à vacina BCG no contexto da Doença Granulomatosa Crônica e da Doença de Suscetibilidade Mendeliana às Micobactérias.

Determinar as frequências dessas imunodeficiências e de mutações envolvidas na região Norte Fluminense.

3.1 Objetivos específicos

- Selecionar pacientes com episódios de reação adversa severa à BCG;
- Utilizar a quantificação do peróxido de hidrogênio nas amostras oriundas dos pacientes com suspeita de DGC;
- Determinar a presença das proteínas IL12R β 1, IFNGR1, IFN γ e IL-17A em células de cultivo e sobrenadantes oriundos de pacientes com reação adversa à vacina BCG;
- Determinar as mutações desencadeadoras de DGC e DMSM por sequenciamento de DNA dos genes alvos;
- Determinar se as mutações diagnosticadas são frequentes na população do Norte Fluminense;
- Caracterizar e comparar qualitativamente a expressão das citocinas IFN- γ e IL17A em pacientes com reação adversa ao BCG;
- Realizar o aconselhamento genético nas famílias.

4 Materiais e Métodos

4.1 Desenho

Estudo exploratório, qualitativo, com amostragem por conveniência ou acessibilidade, não probabilística, portanto, este estudo piloto foi destituído de um número de participantes mínimo, cálculo *a priori* de tamanho amostral e poder de estudo, em pacientes que apresentaram eventos adversos à vacina BCG.

Critérios de inclusão: Foram incluídos nesta pesquisa pacientes com histórico de BCGite ou BCGose residentes na Região Norte Fluminense, assistidos no Ambulatório de Pediatria do Hospital Plantadores de Cana de Campos dos Goytacazes, RJ, com acompanhamento clínico pela colaboradora deste projeto, médica Profa. Dra. Regina Célia de Souza Campos Fernandes. A inclusão neste projeto foi voluntária por meio de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

Critérios de exclusão: Pacientes com histórico de BCGite ou BCGose em uso de corticóides ou outros imunossuppressores, pacientes diabéticos ou com infecção confirmada pelo HIV-1 não atenderam aos propósitos da pesquisa e portanto não foram incluído.

A ocorrência de BCGite e BCGose foi considerada como variável de desfecho. Foram consideradas como variáveis de exposição: diagnóstico de Doença Granulomatosa Crônica e da Doença de Suscetibilidade Mendeliana às Micobactérias. Para o diagnóstico laboratorial da Doença Granulomatosa Crônica foi realizado o teste da oxidação da diidrorodamina para a medição do peróxido de hidrogênio produzido pelas células fagocitárias. Para o diagnóstico da Doença de Suscetibilidade Mendeliana às Micobactérias foi quantificada a expressão dos receptores de IL12 e IFN- γ na superfície dos leucócitos por citometria de fluxo. Os níveis das citocinas IFN- γ e IL17A foram analisados por citometria de fluxo quantitativa com o uso de microesferas (CBA). O sequenciamento dos éxons de genes alvos foi realizado para a identificação das mutações causadoras das imunodeficiências primárias, com a determinação da frequência das mutações em amostra populacional do Norte Fluminense. Possíveis alterações nos níveis de expressão dos transcritos dos genes *IL12RB1*, *IL12RB2*, *IL10* e *IFN- γ* foram investigadas por RT-PCR.

Todas as crianças encaminhadas ao nosso centro de pesquisa com suspeita de alteração imunológica por apresentarem reação adversa à vacina BCG foram atendidas e acompanhadas de acordo com o fluxograma da Figura 4.

A anamnese das 9 crianças foi realizada na primeira consulta e junto a ela solicitados os exames adicionais, resposta ao questionário e/ou testes realizados pela pesquisa. Durante a pesquisa, outros procedimentos como re-coleta ou consultas extras foram realizadas até a entrega dos laudos. Na entrega do laudo, foi realizado um encaminhamento específico de acordo com o diagnóstico ou a exclusão das doenças investigadas no projeto de pesquisa.

4.2 Aspectos éticos

O diagnóstico com a utilização da citometria de fluxo e análise genética é extremamente importante para a determinação das ações profiláticas a fim de diminuir a mortalidade e morbidade dos pacientes acometidos por imunodeficiências primárias desencadeadoras da reação adversa ao BCG. A genotipagem e imunofenotipagem requereram autorização pelos participantes ou seus responsáveis legais, os objetivos foram aprovados pela Direção Clínica do Hospital Plantadores em Cana de Campos dos Goytacazes, que autorizou o acesso aos prontuários e pacientes pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres humanos da Faculdade de Medicina de Campos, RJ, e pelo CONEP sob CAAE no. 35385714.0.0000.5244 (Conselho Nacional de Saúde do Brasil - CONEP – Ministério da Saúde, Plataforma Brasil). A inclusão neste projeto foi voluntária por meio de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



Figura 4. Fluxograma do acompanhamento dos casos com reação adversa à vacina BCG.

4.3 Metodologia de análise de dados

Os dados secundários e os resultados das fenotipagens e dos testes genéticos foram gerenciados e analisados de maneira codificada, utilizando o programa Epidata para determinação de frequências, riscos relativos e poder estatístico das associações.

Foi realizado o gerenciamento de dados no programa Epidata Versão 3.1 com anotação de dados registrados nos prontuários dos pacientes (idade em que recebeu a BCG, tempo para o início da reação adversa, consanguinidade dos pais, infecções por *S. aureus*, *Salmonella*, *Paracocco*, *Histoplasma* e *S. marcescens*) e frequências genotípicas.

As frequências alélicas e a taxa de heterozigose observada foram calculadas com o uso do programa livre PowerStats. A significância estatística das possíveis associações foi estimada pelo teste de Fisher.

Como medida de efeito, os riscos relativos dos eventos adversos do BCG vacinal foram relacionados com o diagnóstico laboratorial de Doença Granulomatosa Crônica e da Doença de Suscetibilidade Mendeliana às Micobactérias com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

4.4 Material biológico, extração de DNA e RNA e PCR

Foi realizada a coleta de 4-10 mL de sangue em heparina do paciente e da mãe na sala de coleta do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular/NUDIM. A extração de DNA genômico e RNA foram realizadas utilizando kits comerciais *Illustra blood genomicPrep e Trizol*, respectivamente. Os cDNAs foram sintetizados com o kit High-capacity. Todos os iniciadores utilizados para o sequenciamento Sanger, minissequenciamento de único nucleotídeo e amplificação dos exons estão inclusos no **Apêndice B**.

As condições de amplificação do marcador Duffy foram as seguintes: temperatura de anelamento 67°C por 32 ciclos, 2 mM MgCl₂, ≈4ng DNA, 1 μM de cada iniciador; volume final de 12,5 μL por 32 ciclos. Para amplificação dos exons de IFNGR1 e IFNGR2 foi seguido o protocolo descrito por (Azevedo, 2004)). Os demais PCR foram executados nas seguintes condições ótimas: temperatura de anelamento 60°C; por 32 ciclos, 2 mM MgCl₂, ≈10ng DNA, 1 μM de cada iniciador.

4.5 Isolamento e cultivo de PBMC

As células mononucleares de sangue periférico foram separadas com Ficoll-Paque Plus. Foi realizado o cultivo de 1×10^6 células/poço em meio RPMI suplementado com 2mM de L-glutamina, 100 unidades de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. As células foram estimuladas *ex-vivo* com PHA (1mg/mL) e/ou lisado de BCG (0,2 mg/mL) por 72h.

4.6 Detecção de IL12Rβ1, IFN-γR1 e quantificação de citocinas

Os sobrenadantes dos cultivos foram estocados (-80°C) para quantificação de citocinas humanas IFN-γ e IL17A por citometria de fluxo utilizando o KIT CBA #558269 e #562143 respectivamente.

Para a quantificação da expressão em membrana dos receptores IL-12Rβ1 (PE-mouse anti-Human CD212 e PE-mouse IgG1 controle isotípico) e IFNGR1 (PE-mouse anti-Human CD119 e PE-mouse IgG2b controle isotípico) as seguintes condições foram utilizadas:

Para sangue total: Hemácias de 50µL de sangue foram lisadas de acordo com o protocolo de (Vowells, Sekhsaria *et al.*, 1995), seguido da adição de 5-20µL de cada anticorpo em tubos separados (volumes de acordo com a prescrição do anticorpo, vide bula). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro e lavadas duas vezes com o tampão de lavagem (PBS 1X + 2% soro fetal bovino e 0,1% de NaN₃), entre as lavagens as células foram executadas centrifugações a 500xg por 3-4 minutos à 4°C. Após as lavagens as células foram ressuspensas em 450µL para análise no citômetro de Fluxo FACS Calibur (LBR, CBB, UENF).

Para análises das células em cultura, cada poço (100µL de volume, 1×10^6 células) foi lavado com 200µL de tampão de lavagem e incubado com cada anticorpo de acordo com as prescrições da bula por 30 minutos no escuro a 4°C. Após a incubação as células foram lavadas duas vezes com o tampão de lavagem e foram ressuspensas em 450µL para análise no citômetro.

4.7 Teste da oxidação da diidrorodamina (DHR)

A produção de superóxidos e peróxidos nos granulócitos ativadas com acetato de forbol miristato (PMA) foi quantificada por citometria de fluxo utilizando o substrato

DHR 123 (Vowells, Sekhsaria *et al.*, 1995). O composto DHR 123 é permeável e é oxidado pelo H_2O^2 e O_2^- para rodamina 123. A rodamina 123 emite uma fluorescência quando excitado, em um comprimento de onda a 488nm. Os granulócitos de pacientes com DGC não conseguem produzir O_2^- e assim não conseguem oxidar DHR 123.

4.8 Sequenciamento de genes alvos

Os produtos de PCR purificado com EXOSAP-IT (Affymetrix) e 5mM de cada iniciador para sequenciamento foram encaminhados para a empresa Helixxa que realizou o sequenciamento Sanger (<http://www.helixxa.com.br/pesquisa.php>). Para os polimorfismos patogênicos encontrados foram determinadas as frequências alélicas por minissequenciamento de base única em 100 amostras de DNA genômico de indivíduos não relacionados geneticamente obtidas do Biorrepositório do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular NUDIM da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Todos os iniciadores utilizados para o sequenciamento Sanger, minissequenciamento de único nucleotídeo, amplificação dos exons estão inclusos no **Apêndice B**

4.9 Análise dos dados

Os dados dos questionários (**Apêndice C**) e das genotipagens foram gerenciados utilizando o programa Epidata Versão 3.1(Lauritsen e Bruus, 2000-2008) e analisados com o programa EpiData Analysis V2.2.1.171. Os dados do banco foram conferidos por dois membros do grupo de pesquisa. As frequências alélicas e a taxa de heterozigose observada (H_O) foram calculadas com o uso do programa livre PowerStats. A heterozigose esperada (H_E) foi estimada com a fórmula $H_E = \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right)$.

A significância estatística das possíveis associações foi estimada pelo teste *t unpaired* $p < 0,05$ com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Para plotagem dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA (www.graphpad.com).

5. Resultados

5.1 Implementação da pesquisa translacional

5.1.1 Caracterização da Coorte

Foram beneficiados pela plataforma catorze (14) pacientes que foram encaminhados ao nosso grupo de pesquisa (**Tabela 1**). Entretanto, seis (6) pacientes (sexo feminino) também foram investigados quanto à presença de imunodeficiência primária por motivo de infecções graves e/ou situação de sepse causada por outro patógeno que não micobactérias, os dados dessas seis crianças não foram incluídos nessa tese por não se enquadrarem dentro dos critérios de inclusão deste estudo.

Todos os nove pacientes incluídos tiveram pelo menos um evento de reação adversa ao BCG. Destes, sete são do sexo masculino (77,78%). O paciente 1528F faleceu em decorrência de septicemia cujo agente etiológico provável foi o BCG vacinal. Portanto seus dados não estão inclusos nas análises de citometria *ex vivo* e *in vitro*, bem como na análise de DNA (**Figura 5**).

Tabela 1. Relação dos pacientes participantes do projeto e as respectivas condições diagnósticas em relação à DMSM ou DGC.

Código	Sexo	Idade^a	Infecções^b	Status^c
830F1	M	23	BCGite	DMSM ^d
830F2	M	15	BCGite	DMSM ^d
1212F	M	5	BCGite	DMSM ^d
1286F	M	5	BCGite	Exclusão de DGC e DMSM
1528F	M	1	BCGite	DMSM ^d
1620F	F	11m	Reação adversa ao BCG	Exclusão de DGC e DMSM
1635F	F	4m	Reação adversa ao BCG	Exclusão de DGC e DMSM
1668	M	3m	BCGite	Exclusão de DGC e DMSM
1692	M	5m	BCGite	Exclusão de DGC e DMSM

^a Idade em anos

^b Infecções confirmadas de acordo com o prontuário.

^c Status quanto ao diagnóstico

^d Deficiência de IL12R β 1

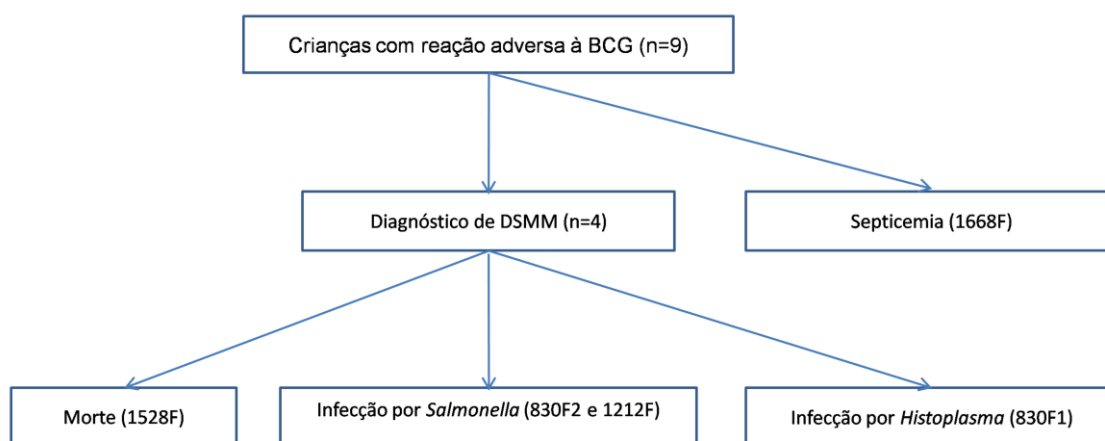


Figura 5. Painel descritivo das crianças incluídas no estudo e seus desfechos clínicos. Das 9 crianças incluídas no estudo, 4 foram diagnosticadas com DSMM.

Nesta coorte as reações adversas mais frequentes foram linfadenopatia regional supurativa 6/9 (66,7%), úlcera >1cm 2/9 (22,2%) e linfadenopatia regional não supurativa 1/9 (11,1%). A Isoniazida foi a droga utilizada para terapia na maioria dos casos 8/9 (88,9%). Com apenas um caso de recidiva de BCGite (11,1%), que foi tratada com Rifampicina e etambutol de acordo com as recomendações do MS (Brasil, 2008).

O histórico clínico das crianças incluídas revelou anemia em 4/9 (44,4%), septicemia 3/9 (33,3%) e pneumonia no primeiro ano 1/9 (11,1%). Do histórico clínico familiar, tuberculose e hanseníase estiveram presentes em uma família das oito incluídas no estudo.

5.1.2 Relatos de Casos

830F1

Homem, 23 anos, casado, primeiro filho de um casal não-consanguíneo. Na idade de 1 ano, apresentou adenopatia axilar supurativa ipsilateral ao local de vacinação da BCG. Ele foi tratado com Isoniazida (10 mg/kg/dia) durante seis meses com boa evolução clínica. Na idade de 13 anos, o paciente apresentou linfadenopatias cervicais e febre; diagnóstico de histoplasmose confirmado por histopatologia e o tratamento utilizado foi o cetoconazol (400 mg/dia), com excelente resposta. Na idade de 18 anos, teve uma recidiva da histoplasmose manifestada por grandes linfadenopatias cervicais, rouquidão, disfagia e febre. Imagens da videolaringoscopia revelaram lesões granulomatosas bilaterais de pregas ariepiglóticas (**Figura 6**). Avaliações imunológicas revelaram hiper-IgE (17.300 e 17,937 UI/ml (valor de referência, VR: <87) em dois testes separados; IgG = 2,790 mg/dL (VR: 549-1584), IgA = 225 mg/dL (VR: 61-348), IgM de 106 mg/dL (VR: 23-259); CD4 = 350 células/mm³ (41,5%), CD8 = 269 células/mm³ (17,2%), CD4/CD8 = 1,30. A recidiva da histoplasmose foi tratada com itraconazol (600 mg/dia) durante dois anos. No momento, ele está saudável sem profilaxia.

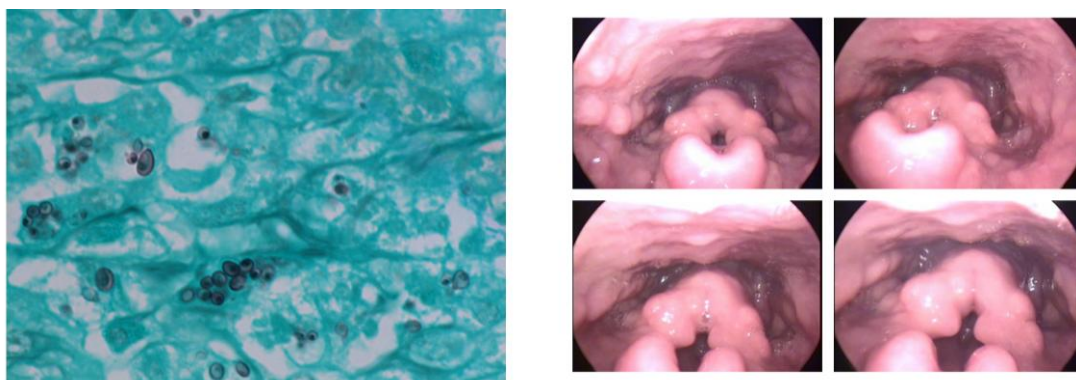


Figura 6. Diagnóstico de Histoplasmose com acometimento de laringe e linfonodos no paciente 830F1. A) Fotomicrografia (40 X)-Coloração pelo Grocott- Numerosas estruturas fúngicas coradas em preto. B) Videolaringoscopia realizada no paciente 830F1, com histoplasmose laríngea.

830F2

Menino, 15 anos, irmão mais novo do paciente 830F1 (**Figura 7**). Na idade de 4 meses, apresentou adenite supurativa regional ipsilateral ao local da vacina BCG e foi tratado com Isoniazida (10 mg/kg/dia) por 6 meses com boa resposta clínica. Aos 5 anos, quando seu irmão mais velho foi diagnosticado com histoplasmose, ele apresentou várias adenopatias cervicais e febre. Ele foi medicado com cetoconazol (400 mg/dia). Sem recuperação, o tratamento foi interrompido após sete meses. Na idade de 6 anos, ele foi hospitalizado com adenopatias cervicais, e foi tratado com anfotericina B, sem regressão. Na idade de 8 anos, nova hospitalização com astenia, anorexia, dor abdominal e adenopatias cervicais, evoluindo com hepatoesplenomegalia, dificuldade respiratória, febre persistente, coleções pleurais e no pericárdio. Foi necessário a drenagem das coleções e ressecção do baço após abscesso esplênico. Os estudos de laboratório mostraram leucocitose (26.900 células/mm³, 14% bastões, 80% segmentados, 5% linfócitos); 297.000/mm³ plaquetas; albumina de 2,30 g/dL, globulina de 3,60 g/dL; bilirrubina total 7,80; bilirrubina direta 6,60 mg/dL; AST 38U/L, ALT de 25 IU/L, AP 342 UI/L. Coloração de Wade, PAS e Giemsa de linfonodos e baço foram negativos; PAS e Wade de amostras oriundas da coleção pericárdia foram negativos. A cultura do aspirado de medula óssea foi positiva para *Salmonella choleraesuis*. Além da terapia antimicrobiana (40 mg/kg/dia de vancomicina e 30 mg/kg/dia de meropenem); Rifampicina (10 mg/kg/dia), Isoniazida (10 mg/kg/dia) e Pirazinamida (20 mg/kg/dia) também foram utilizados devido à poliserosite e à possibilidade não confirmada de contato doméstico com tuberculose. A avaliação imunológica revelou hiper-IgE (902 UI/mL e 2848 UI/mL [VR a 87 UI/mL] em duas avaliações independentes) com valores elevados de outras imunoglobulinas (IgG = 3,150 mg/dl [VR: 572-1,474]; IgA = 943 mg/dl [VR: 34-305]; IgM = 223 mg/dl [VR: 32-208]), e marcadores de células T CD4 = 955 células/mm³ (17%); CD8 = 1348 células/mm³ (24 %); e CD4/CD8 = 0,7. Três meses após a suspensão dos tuberculostáticos, houve um recrudescimento de linfadenopatias cervicais com fistulização, apesar da ausência de febre e sinais inflamatórios. Culturas de aspirado de gânglio foram negativas para bactérias, bacilos álcool-ácido resistentes e fungos. O exame histopatológico dos linfonodos cervicais foi negativo para micróbios intracelulares. Ele recebeu tratamento empírico com

trimetoprim/sulfametoxazol durante cinco meses, com recuperação completa e profilaxia com as mesmas drogas por 6 meses. Após a interrupção da profilaxia, ele desenvolveu grande abscesso na região subcostal esquerda e nas costas, que foi drenado (**Figura 8**). Desse aspirado, as culturas foram negativas e ele foi empiricamente tratado com ciprofloxacina (40 mg/kg/dia) para cobrir salmonela e claritromicina (15 mg/kg/dia) para cobrir micobactérias durante seis meses. No momento, ele está em profilaxia com trimetoprim/sulfametoxazol e livre de sintomas.

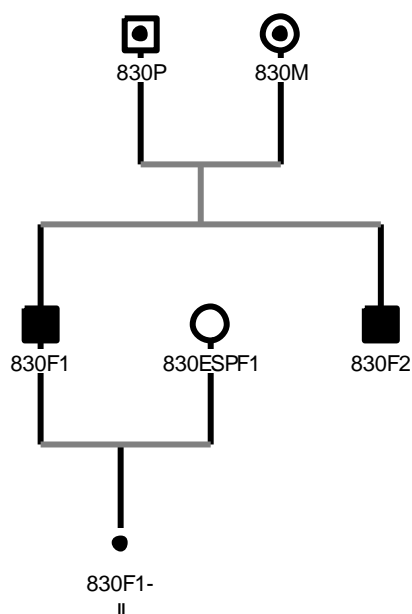


Figura 7. Heredograma representativo da família 830. O paciente 830F1, filho mais velho possui um filho.



Figura 8. Abscesso na região subcostal esquerda do paciente 830F2.

1212F

Menino, cinco anos único filho de um casal não-consangüíneo (**Figura 9**). Vacinado com BCG durante o primeiro mês de vida. Na idade de 6 meses, ele desenvolveu adenopatia axilar ipsilateral ao local da vacina BCG e foi tratado com Isoniazida (10 mg/kg/dia) durante 6 meses. Quatro meses mais tarde, ocorreu a recidiva da adenopatia com fistulização. A recidiva foi resolvida com a associação de Isoniazida (10 mg/kg/dia) e rifampicina (10 mg/kg/dia) durante 6 meses. Foi realizada uma punção da adenopatia para cultura, entretanto as culturas foram negativas para bactérias, micobactérias e fungos. Na idade de 4 anos, o paciente apresentou artrite no tornozelo, sem febre e lesões eritematosas não pruriginosas nos membros inferiores e nádegas, que não desapareciam com a compressão. As lesões eram recorrentes e progressivas por períodos cada vez mais curtos. Em um total de quatro meses, incluindo um episódio de lesões no corpo inteiro. Em seguida, ele também apresentou com lesões eritematosas maculopapulares e pruriginosas no pescoço e no dorso de ambas as mãos. Estudos laboratoriais mostraram leucocitose (14.980 células/mm³), VHS 25 mm/h (VR 0-20 mm/h), LDH de 730 UI/L (VR 200-480 UI/L). Avaliação imunológica revelou IgE elevada (934 UI/ml [VR a 52 UI/ml]) com valores elevados para IgG = 5,650 mg/dL (VR: 504-1,465); IgA = 340 mg/dl (VR: 27-195); IgM = 537 mg/dL [VR: 24-210]. Avaliação celular revelou inversão do eixo CD4/CD8 com CD4 = 1.280 células/mm³ (23,26%); CD8 = 2.080 células/mm³ (37,79%); CD4/CD8 = 0,62). Função renal normal, sem proteinúria ou hematuria. A avaliação reumatológica demonstrou fator reumatóide positivo 512 UI/mL (VR <8 UI/mL) e negativo para anticorpos antinucleares. O exame histopatológico da erupção maculopapular eritematosa na mão esquerda revelou hiperqueratose e atrofia regional associada à vacuolização basal e necrose focal, além de infiltrados mistos inflamatórios perivasculares e intersticiais com fragmentação nuclear leve. O exame histopatológico das lesões eritematosas da perna esquerda mostrou infiltrados inflamatório misto localizado perivascularmente e intersticiais com neutrófilos em cariorrexe, linfócitos e eosinófilos (**Figura 10**). As amostras do paciente foram positivas no teste de aglutinação Widal H (flagelos B reativo), culturas de sangue e de fezes negativas para bactérias. Ele foi tratado com ciprofloxacina (40 mg/kg/dia) durante duas semanas, com a regressão das lesões e sem recidivas. No momento, ele está em profilaxia com trimetoprim/sulfametoxazol.

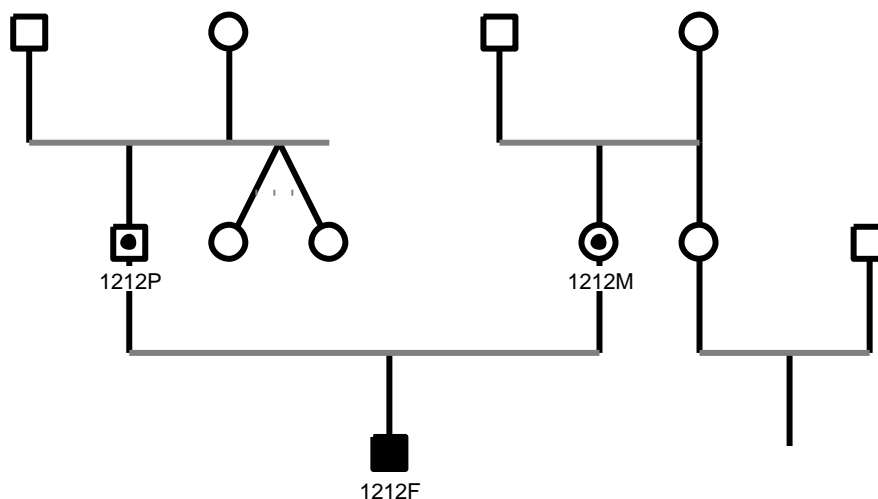


Figura 9. Heredograma representativo da família 1212. O paciente 1212F é filho único de pais não consanguíneos.

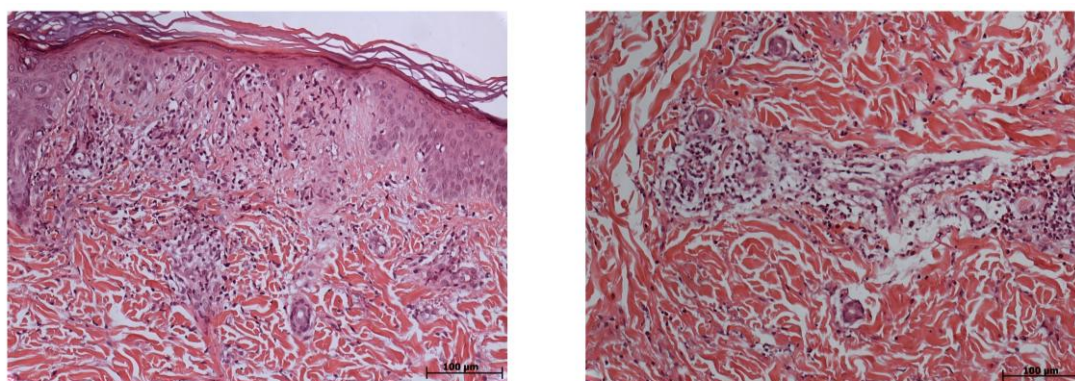


Figura 10. Exame histopatológico sugestivo de ptiíase líquen (biópsia da mão esquerda) e vasculite leucocitoclástica (biópsia da perna esquerda) no paciente 1212F. A análise histopatológica da biópsia da mão do paciente 1212F revelou hiperqueratose e atrofia regional associada à vacuolização basal e necrose focal, além de infiltrados mistos inflamatórios perivascularmente e intersticiais com fragmentação nuclear leve. O exame histopatológico das lesões eritematosas da perna esquerda mostrou infiltrados inflamatórios mistos localizados perivascularmente e intersticiais com neutrófilos em cariorrexe, linfócitos e eosinófilos.

1286F

Menino, cinco anos e três meses, filho mais velho de um casal não consanguíneo (**Figura 11**) recebeu a vacina BCG na segunda semana de vida e evoluiu sem complicações. Aos 4 anos nova dose de BCG foi administrada como abordagem de

contactante de Hanseníase. Após dois meses da segunda dose foi observado aumento do volume no local da aplicação com posterior ruptura e saída de secreção purulenta. O tratamento estabelecido foi Isoniazida (10 mg/kg/dia) e depois adicionada a Rifampicina. Exame físico normal, sem adenopatias satélites, entretanto com diâmetro da lesão vacinal maior que 4cm (**Figura 12**).

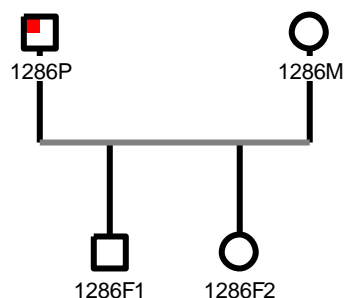


Figura 11. Heredograma representativo da família 1286F. O pai do paciente 1286F teve um diagnóstico de hanseníase e por isso a segunda dose de BCG foi indicada para o paciente 1286F1 e sua irmã.



Figura 12. Fotografia da reação adversa à vacina BCG no paciente 1286F. Paciente 1286F apresenta úlcera vacinal >4cm no local da aplicação da segunda dose da vacina BCG.

Paciente 1528F1

Menino (1999), único filho de pais consanguíneos de primeiro grau (**Figura 13**). Na idade de 3 meses, o paciente desenvolveu adenite axilar supurativa ipsilateral ao local da vacina do BCG, e foi tratado com Isoniazida (10 mg / kg/dia), com regressão da linfadenopatia. Na idade de 9 meses, foi hospitalizado devido a febre, sudorese, anemia grave, hepatomegalia e esplenomegalia. Raios-X de tórax normal; culturas de sangue e urina negativo para bactérias; hemoglobina 6g/dl; leucócitos 2.700 células/mm³ (0% de eosinófilos, e 50% de linfócitos); 40.000 plaquetas/mm³; AST (36 UI/L) e ALT (20 UI/L) normais. Mielograma demonstrou hipoplasia eritrocitária e plaquetária e uma redução no desenvolvimento de granulócitos. Com a suspeita de doença disseminada

por BCG, ele foi tratado com Isoniazida (10 mg/kg/dia) e ceftriaxona (100 mg/kg/dia) e recebeu duas transfusões de sangue. Mãe e filho eram HIV-1 negativos. Após sete dias, ele foi transferido para a unidade de tratamento intensivo com insuficiência respiratória e faleceu após hemorragia pulmonar maciça.

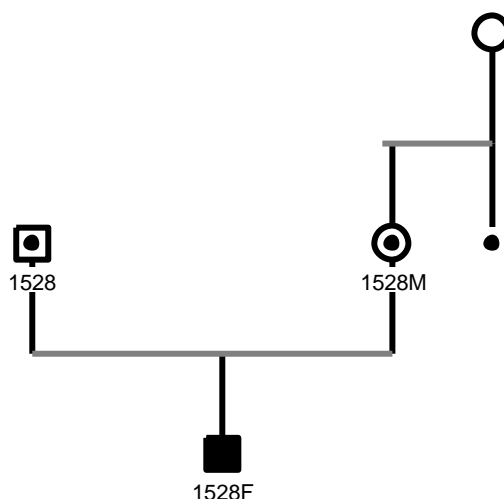


Figura 13. Heredograma representativo da família 1528. O pai do paciente 1528 é parente em primeiro grau da mãe.

1620F

Menina, onze meses, primeira filha de um casal não consanguíneo (**Figura 14**) após quatro meses de vacinação ainda apresentava úlcera no local da aplicação com drenagem de secreção purulenta. Tratada com isoniazida (10 mg / kg/dia) por 6 meses. Após sua conclusão a paciente ainda apresentava episódios de ulceração e eliminação de secreção purulenta sem adenopatias satélites. Exame físico normal, com cicatriz vacinal >1cm de diâmetro com lesões eritematosas próximas e endureção (**Figura 15**). Após 6 meses do fim do tratamento as lesões e a endureção não se encontravam mais presentes.

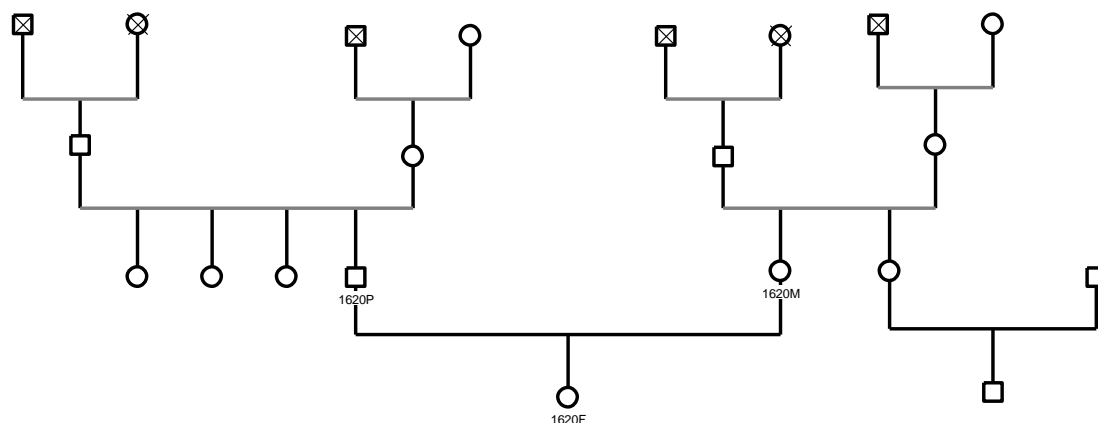


Figura 14. Heredograma representativo da família 1620F. Histórico familiar intocado pela tuberculose e outras doenças infecciosas por micobactérias e salmonelas.



Figura 15. Fotografia da reação adversa à vacina BCG na paciente 1620F. A paciente 1620G apresenta cicatriz vacinal >1cm de diâmetro com lesões eritematosas próximas e com endureção.

1635F

Menina, quatro meses, segunda filha de um casal não consanguíneo (**Figura 16**). Após 20 dias de vacinação, foi observada massa em região axilar e escapular direitas sem sinais flogísticos que evoluiu com hiperemia local e fistulização. Foi iniciado o tratamento com isoniazida (10 mg /kg/dia) com boa resposta. Exame físico normal, com cicatriz vacinal normal e sem adenopatia satélite, cicatriz na axila e região escapular direitas relacionada à drenagem ganglionar (**Figura 17**). A paciente possui um histórico familiar de tuberculose diagnosticada no avô paterno. Entretanto, foi levantada a

hipótese de erro na administração da vacina BCG pelos pais e pela pediatra do Centro de Tuberculose de Campos.

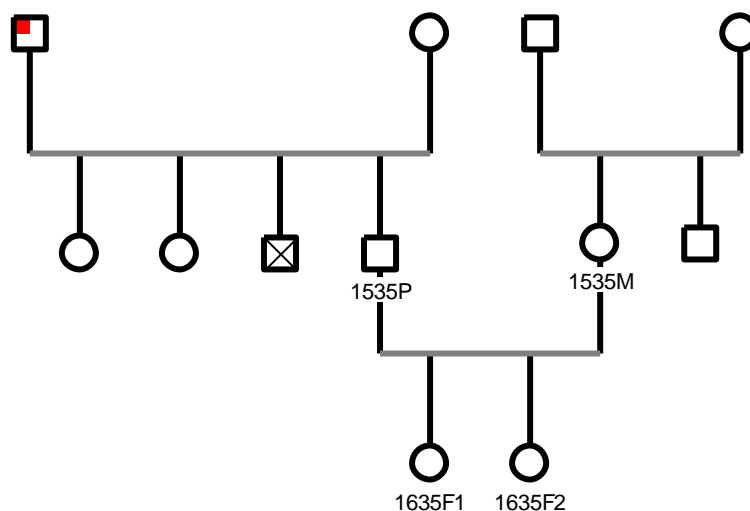


Figura 16. Heredograma representativo da família 1635F. O avô paterno da paciente 1635F teve histórico de tuberculose.

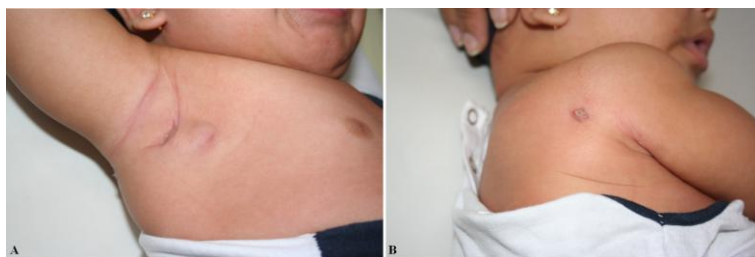


Figura 17. Fotografia da reação adversa à vacina BCG na paciente 1635F. A paciente 1635F apresenta cicatriz na axila direita e região posterior relacionada à drenagem ganglionar.

1668F

Menino, três meses, primeiro filho de um casal não consanguíneo, nascido a termo (**Figura 18**), recebeu a vacina BCG ainda na maternidade. Após 3 semanas, apresentou febre alta e irritabilidade, sendo hospitalizado por um mês e 7 dias com diagnóstico final de septicemia sendo hemocultura positiva para *Enterococcus* e *Stafilococcus*. Medicado com anfotericina B, gentamicina, cefepima, amicacina e meropenem, também recebeu uma transfusão sanguínea. Quatro dias após a alta foi

observado caroço (+- 2,5cm de diâmetro aderente ao gradil costal) sem sinais flogísticos na axila ipsilateral à vacinação com BCG (**Figura 19**). Tratamento com isoniazida (10 mg/kg/dia) foi instalado, após um mês de tratamento ocorreu a fistulização. Entretanto o paciente teve boa resposta ao fim do tratamento.

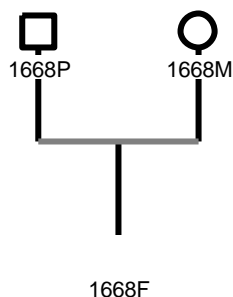


Figura 18. Heredograma representativo da família 1668F. O menino nascido de pais não consanguíneo é filho único.



Figura 19. Fotografia da reação adversa à vacina BCG no paciente 1668F. O paciente 1668F apresentava um caroço (+- 2,5cm de diâmetro aderente ao gradil costal) sem sinais flogísticos na axila ipsilateral à vacinação com BCG.

1692F

Menino, cinco meses, filho de um casal não consanguíneo, nascido a termo (**Figura 20**). Foi hospitalizado no primeiro mês de vida por 7 dias com bronquiolite. Dois meses após a vacinação pelo BCG foi observada massa em região axilar sem sinais flogísticos que evoluiu com hiperemia local. Iniciado o tratamento com Isoniazida (10 mg/kg/dia) e 20 após apresentou fistulização. Há dois meses com uso de Isoniazida sem intercorrências e sem mais saída de secreção. Exame físico normal, com cicatriz vacinal normal e cicatriz na axila direita relacionada à drenagem ganglionar (**Figura 21**).

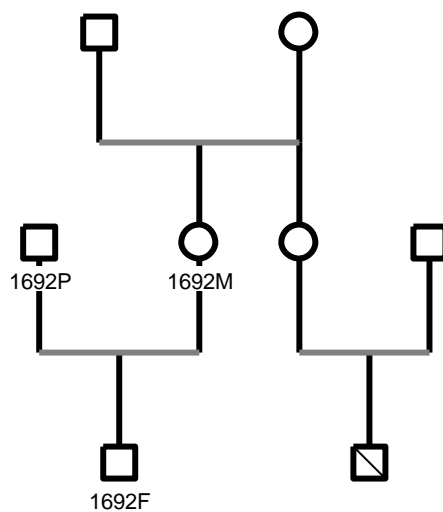


Figura 20. Heredograma representativo da família 1692F.



Figura 21. Fotografia da reação adversa à vacina BCG no paciente 1692F. O paciente 1692F apresentava cicatriz vacinal normal e cicatriz na axila direita relacionada à drenagem ganglionar.

5.2 Painel Imunofenotípico

5.2.1 Avaliação da expressão de IL-12R β 1 nas crianças com episódios de reação adversa ao BCG

A quantificação da expressão *ex vivo* de IL-12R β 1 por citometria de fluxo foi determinada para os 8 pacientes em amostra de sangue periférico. Os pacientes foram estratificados da seguinte forma: Paciente com DMSM (1212F, 830F1 e 830F2) e pacientes sem DMSM (1286F, 1620F, 1635F, 1692F, 1668F). Controles (indivíduos que não apresentaram reação adversa à vacina BCG) foram adicionados a análise. Os pacientes com DMSM apresentam baixa expressão de IL-12R β 1 (**Figura 22**).

Existe diferença significativa quando comparamos os níveis de expressão *ex vivo* de IL-12R β 1 nas células dos pacientes com DMSM e dos sem DMSM (Teste t unpaired; $p= 0,0023$), e entre os grupos DMSM e controles (Teste t unpaired; $p= 0,0012$) (**Figura 23**). Mas não há diferença na expressão *ex vivo* de IL-12R β 1 quando comparamos os grupos de pacientes sem DMSM e controles (Teste t unpaired; $p= 0,3595$). A média elevada no grupo de pacientes sem DMSM pode estar aumentada devido a alguns pacientes desse grupo apresentarem reação adversa à vacina BCG vigente no momento da coleta.

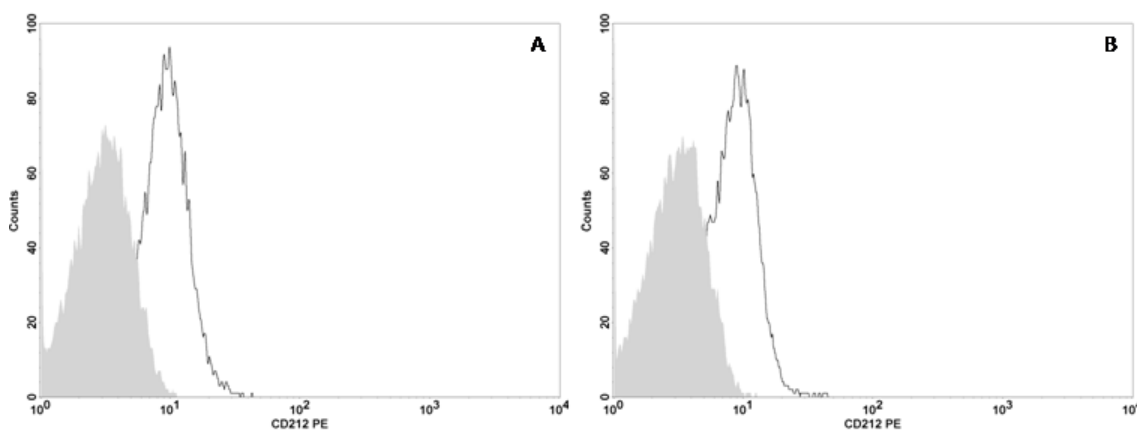


Figura 22. Histogramas representativos da quantificação de expressão de IL-12R β 1 (CD212). Linfócitos dos pacientes 830F1 (A) e 830F2 (B) mostram que os mesmos expressam IL12R β 1/CD212-PE (branco) em análise *ex vivo*. As porcentagens de células expressando IL-12R β 1 foram respectivamente 12,47% e 13,35%. Como controle isotípico foi utilizado o anticorpo mouse-IgG1-kappa-PE (cinza).

Devido aos pacientes com DMSM apresentarem expressão de IL-12R β 1 *ex vivo*, é necessário avaliar se os mesmos apresentam essa expressão significativamente

aumentada quando estimulamos suas PBMCs *in vitro* com PHA. Sendo assim, foram avaliadas as porcentagens de células que expressam IL-12R β 1 (CD212) após estímulo *in vitro* das PBMCs por 72h com PHA em amostras dos 7 indivíduos participantes do estudo. (**Figura 24**). PBMCs dos pacientes com DMSM expressam menos IL-12R β 1 após o estímulo com PHA quando comparado com indivíduos controles saudáveis (Teste t unpaired; $p= 0,0004$) ou com o grupo sem DMSM (Teste t unpaired; $p= 0,0003$). Adicionalmente, não ocorreu diferença significativa na expressão de IL-12R β 1 após o estímulo com PHA quando comparamos o grupo dos pacientes sem DMSM e os controles (Teste t unpaired; $p= 0,9508$).

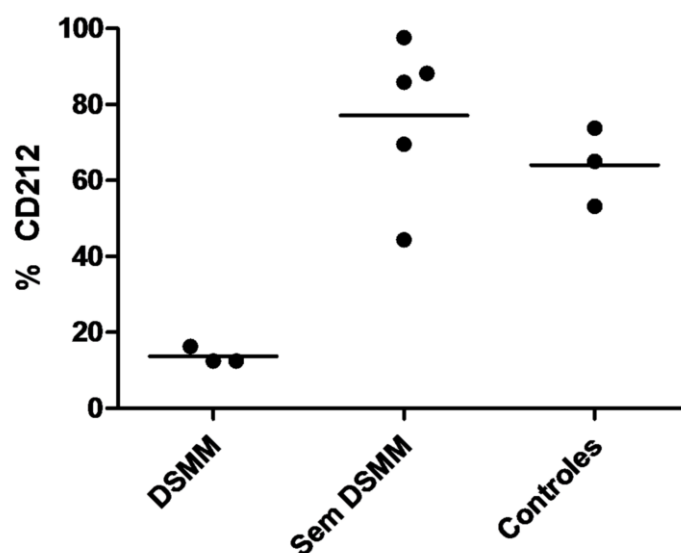


Figura 23. Diferença na porcentagem de células que expressam IL-12R β 1 (CD212) *ex vivo*. Linfócitos dos pacientes sem DMSM (5 pacientes) e Controles (3 indivíduos) expressam mais IL12R β 1/CD212-PE do que os pacientes com DMSM (3 pacientes) ($p= 0,0023$ e $p= 0,0012$ respectivamente).

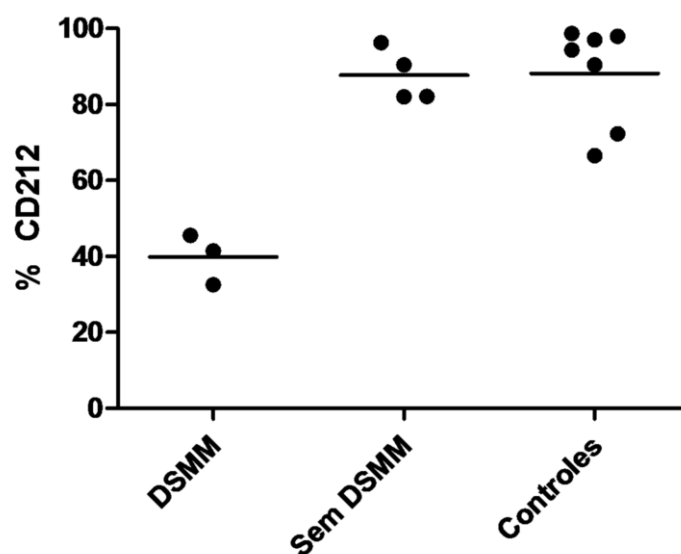


Figura 24. Diferença na porcentagem de células que expressam IL-12R β 1 (CD212) após estímulo *in vitro* das PBMCs com PHA. PBMCs dos pacientes com DMSM (3 indivíduos) expressam menos IL12R β 1/CD212-PE do que os pacientes sem DMSM (4 indivíduos) ($p= 0,0003$) e os controles ($p= 0,0004$) após 72h de estímulo com PHA. Não existe diferença significativa nos níveis de expressão entre os indivíduos do grupo sem DMSM e controles (5 indivíduos) ($p= 0,9508$).

5.2.2 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultivo de PBMCs.

As PBMCs oriundas dos indivíduos controles produzem mais IFN- γ do que os pacientes com (Teste t unpaired; $p= 0,0247$) ou sem DMSM (Teste t unpaired; $p= 0,0001$) quando estimulados com PHA por 72h (**Figura 25**). Devido a média de produção dos pacientes com e sem DMSM serem equivalentes, as PBMCs dos pacientes com DMSM não diferem na produção de IFN- γ do grupo dos pacientes sem DMSM quando estimuladas com PHA (Teste t unpaired; $p= 0,8462$). Um fator pode estar pesando nisso, o paciente 830F1 produz em média uma quantidade alta de IFN- γ (4514,430 pg/mL). Esse paciente possui a melhor clínica quando comparamos com os outros 2 pacientes que produzem baixas quantidades de IFN- γ (2115 e 905,125 pg/mL). Incluídos todos os pacientes analisados, a média de produção de IFN- γ é de 2512 pg/mL e 2313 pg/mL para o grupo com e sem DMSM respectivamente. Se retirarmos o paciente 830F1, a média de produção de IFN- γ do grupo cai de 2512 para 1510 pg/mL. De qualquer forma, não podemos excluir o dado que pacientes que apresentam reação adversa ao BCG portadores ou não de DMSM, possuem uma produção reduzida de IFN- γ quando suas PBMCs são estimuladas *in vitro* com PHA.

Na literatura, alguns grupos já relataram a produção de IFN- γ nas PBMCs cultivadas com PHA por pacientes com DMSM (De Jong, Altare *et al.*, 1998; Caragol, Raspall *et al.*, 2003; Lichtenauer-Kaligis, De Boer *et al.*, 2003; Moraes-Vasconcelos, Grumach *et al.*, 2005; De Boer, Van Dissel *et al.*, 2008; De Beaucoudrey, Samarina *et al.*, 2010; Schejbel, Rasmussen *et al.*, 2011; Ramirez-Alejo, Blancas-Galicia *et al.*, 2013; Schepers, Schandene *et al.*, 2013). Como os pacientes com DMSM possuem uma produção de IFN- γ quando estimulados com PHA, utilizamos lisado de BCG (0,2mg/mL) como outro antígeno na cultura para auxiliar na caracterização de deficiência de produção de IFN- γ nesses pacientes.

As PBMCs de cada indivíduo foram cultivadas com lisado de BCG por 72h e depois foram realizadas a quantificação de IFN- γ nesses sobrenadantes em duplicata (**Figura 26**). As PBMCs oriundas dos indivíduos controles produzem mais IFN- γ do que os pacientes com DMSM (Teste t unpaired; $p= 0,0003$) quando estimulados com lisado por BCG por 72h. Interessantemente, os pacientes sem DMSM produzem níveis iguais de IFN- γ do que os pacientes com DMSM (Teste t unpaired; $p= 0,0711$) e controles (Teste t unpaired; $p= 0,9250$). Entretanto é necessário destacar que ocorreu

uma grande produção de IFN- γ pelo paciente 1668F que aumentou muito a média do grupo.

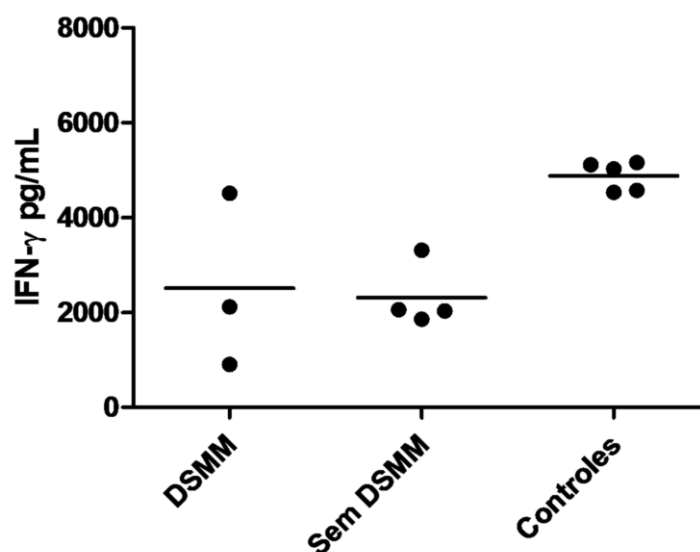


Figura 25. Produção *in vitro* de IFN- γ por PBMCs estimulados com PHA. PBMCs dos pacientes com DMSM (3 indivíduos), sem DMSM (4 indivíduos) e controles (4 indivíduos) foram mantidos em cultivo com adição de PHA (1mg/mL) por 72h. A quantificação de IFN- γ presente no sobrenadante do cultivo foi realizada por CBA em duplicata. Os pacientes com reação adversa ao BCG com ou sem DMSM produzem menos IFN- γ do que os controles ($p= 0,0247$ e $p= 0,0001$ respectivamente).

A produção da citocina inflamatória IL-17A foi avaliada em PBMCs oriundas de três pacientes com DSMM, dois sem DSMM e 3 controles. As PBMCs dos indivíduos controles produzem mais IL-17A do que os pacientes com DSMM (Teste t unpaired; $p= 0,0419$) quando estimulados com PHA por 72h (**Figura 27**). Não existe diferença entre a produção de IL-17A dos pacientes sem DMSM (Teste t unpaired; $p= 0,0728$) e controles. Devido a média de produção dos pacientes com e sem DMSM serem equivalentes, as PBMCs dos pacientes com DMSM não diferem na produção de IL-17A do grupo dos pacientes sem DMSM quando estimuladas com PHA (Teste t unpaired; $p= 0,9950$). Um fator pode estar pesando nisso, o paciente 830F1 produz em média uma quantidade maior de IL-17A (205 pg/mL) do que os demais pacientes. Interessantemente, esse paciente também produz maiores quantidades de IFN- γ e apresenta a melhor clínica quando comparamos com os outros 2 pacientes com o

mesmo diagnóstico de MSMD. Incluídos todos os pacientes analisados, a mediana de produção de IL-17A é de 40,12 pg/mL e 93,97 pg/mL para o grupo com e sem DMSM respectivamente. É conhecido que a via IL-23 é prejudicada com a ausência de IL12R β 1, onde os pacientes com a deficiência dessa proteína produzem significativamente menores quantidades de células produtoras de IL-17 (Hoeve, Savage *et al.*, 2006; De Beaucoudrey, Puel *et al.*, 2008; Hanna e Etzioni, 2011)

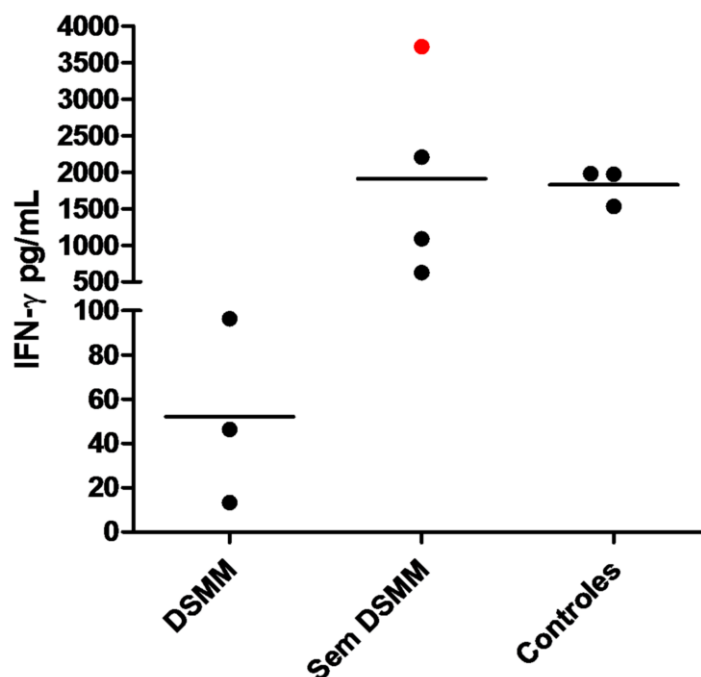


Figura 26. Produção *In vitro* de IFN- γ por PBMCs estimulados com lisado de BCG *in vitro*. PBMCs dos pacientes com DMSM (3 indivíduos), sem DMSM (4 indivíduos) e controles (5 indivíduos) foram mantidos em cultivo com adição de lisado de BCG (0,2mg/mL) por 72h. A quantificação de IFN- γ presente no sobrenadante do cultivo foi realizada por CBA em duplicata. Os pacientes com DMSM produzem menos IFN- γ do que os controles ($p=0,0003$). Paciente 1668F representado pelo símbolo ●.

5.2.3 Quantificação da expressão de IFNGR1 nas crianças com episódios de reação adversa a BCG

A deficiência de IFNGR1 é a segunda maior causa de DMSM sendo responsável por 23,73% dos casos. A quantificação da expressão *ex vivo* foi determinada apenas para quatro pacientes com reação adversa ao BCG, desses um DMSM (**Figura 28**). Esse marcador se mostra muito sensível na detecção de estimulações antigênicas causadas por infecções por micobactéria e/ou infecções e vacinações virais (**Figura 29**). Assim sendo, a melhor determinação da deficiência desse marcador é nas células em cultivo estimuladas ou não com PHA. Com a análise pós estímulo das células que ficaram em cultivo *in vitro*, podemos determinar se a ausência desse receptor é total ou parcial.

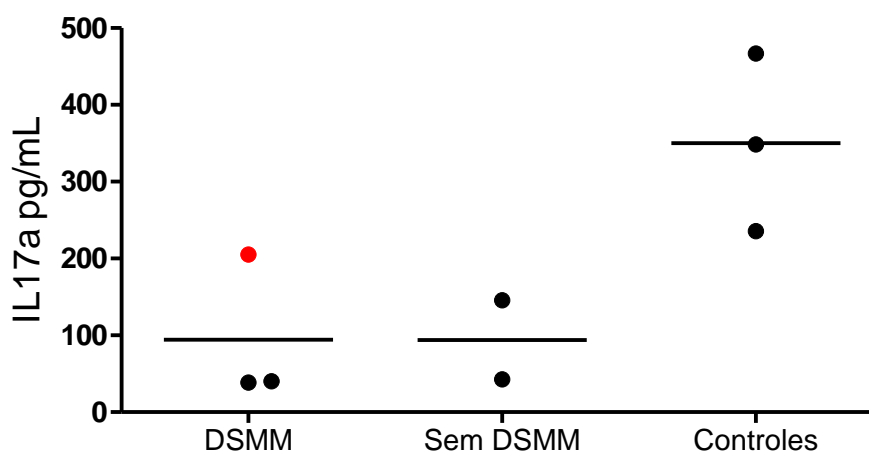


Figura 27. Produção *in vitro* IL-17A por PBMCs estimulados com lisado de BCG *in vitro*. PBMCs dos pacientes com DMSM (3 indivíduos), sem DMSM (2 indivíduos) e controles (3 indivíduos) foram mantidos em cultivo com adição de PHA por 72h. A quantificação de IL17-A presente no sobrenadante do cultivo foi realizada por CBA em duplicata. Os pacientes com reação adversa à vacina BCG produzem menos IL17-A do que os controles. Paciente 830F1 representado pelo símbolo ●.

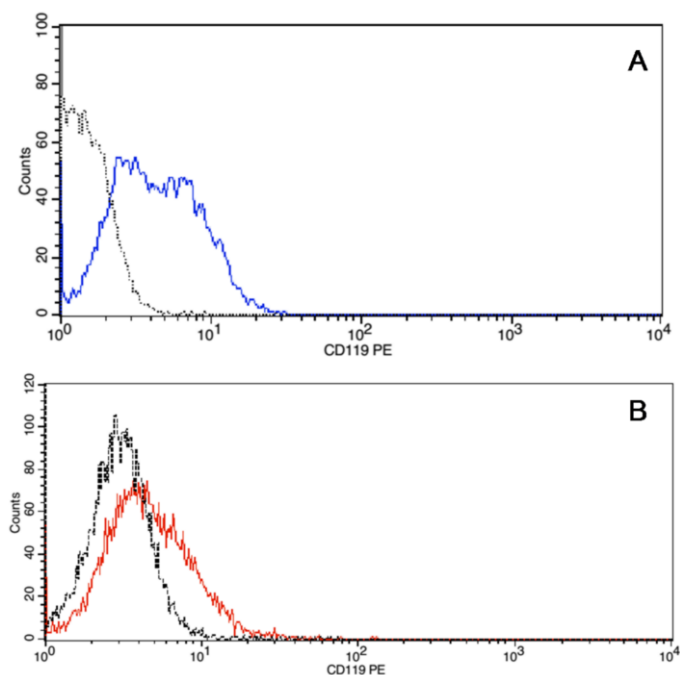


Figura 28. Histogramas representativos da quantificação de expressão de IFNGR1 (CD119) no paciente 1212F diagnosticado com DMSM e no controle 301F. Linfócitos do indivíduo controle 301F (A) e do paciente com DMSM 1212F (B) mostram diferenças na expressão de IFNGR1/CD119-PE (azul ou vermelho) em análise *ex vivo*. As porcentagens de células expressando IFNGR1 foram respectivamente 56,47% e 8,75%. Como controle isotópico foi utilizado o anticorpo mouse-IgG1-kappa-PE (preto).

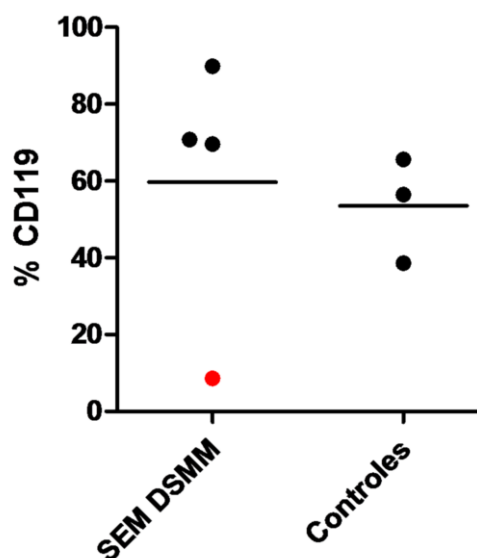


Figura 29. Diferentes níveis de expressão *ex vivo* de IFNGR1 (CD119+). Linfócitos dos pacientes com reação adversa ao BCG ainda vigente (4 indivíduos), o que aumenta a expressão desse marcador, e controles (3 indivíduos) apresentam diferentes níveis de expressão de IFNGR1/CD119+. Paciente 1668F representado pelo símbolo ●.

Esse marcador foi o último a ser incorporado nesse estudo e por isso a avaliação da expressão de IFNGR1 (CD119+) pelas células após estímulo *in vitro* das PBMCs por 72h com PHA, foi realizada em apenas 8 indivíduos (**Figura 30**). PBMCs do paciente com DMSM 830F1 expressam níveis semelhantes aos controles após o estímulo com PHA quando comparado com indivíduos controles saudáveis.

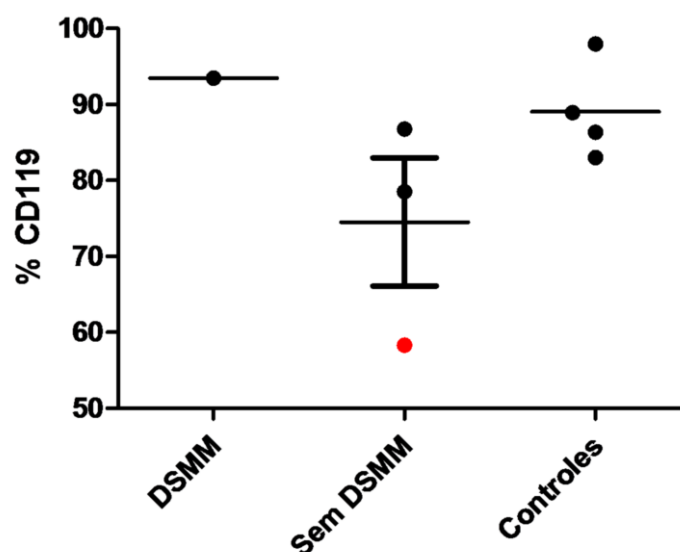


Figura 30. Diferença na porcentagem de células que expressam IFNGR1 (CD119) após estímulo *in vitro* das PBMCs com PHA. PBMCs dos controles, dos pacientes sem DMSM (1620F), e do paciente com DMSM (830F1) expressam diferentes níveis de IFNGR1 após 72h de estímulo com PHA. Paciente 1668F representado pelo símbolo ●.

A deficiência de IFNGR1 pode ser total ou parcial, visto que mutações dominantes podem estar presentes em pacientes que apresentaram reação adversa à vacinação por BCG. Entretanto, os pacientes com deficiência parcial de IFNGR1, carreadores de mutação dominante apresentam fenótipo clínico intermediário. Ao contrário dos pacientes com deficiência completa de IFNGR1 cuja maioria possui dois alelos recessivos (Bustamante, Boisson-Dupuis *et al.*, 2014).

5.2.4 Avaliação da produção de espécies reativas de O₂-

O teste da oxidação da dihidrorodamina tem sido aplicado na rotina e todas as 5 crianças foram avaliadas quanto à produção de espécies reativas de O₂- em neutrófilos de sangue periférico. Este teste é importante para determinar a capacidade dos neutrófilos em produzir O₂⁻ e consequentemente no diagnóstico da Doença Granulomatosa Crônica, outra forma da MSMD. Todos os pacientes testados possuem neutrófilos com capacidade de produção dentro da normalidade de O₂⁻. Os antígenos do lisado de BCG, Mucina da Próstata Humana (PMA), lipopolissacarídeo de *E. Coli* (LPS), antígeno da *C. S. aureus* e aglutinina de amendoim (PNA) foram utilizados como

indutores de O_2^- dos neutrófilos. Mas a melhor resposta foi produzida pelo antígeno PMA, o mesmo utilizado no artigo de referência do teste (Vowells, Sekhsaria *et al.*, 1995).

Cinco crianças, sendo uma com MSMD foram testadas e todas apresentaram níveis normais de produção de espécies reativas de O_2^- (Valor de referência >80%) (**Figura 31**).

Os fagócitos são essenciais no controle da infecção e eliminação do BCG (Arkhipov, Shkurupy *et al.*, 2013). As mutações causadoras da Doença Granulomatosa Crônica podem ter padrão de herança autossômica recessiva ou ligada ao X. Mutações nos genes cytochrome b-245 cadeia alpha (*CYBA*-16q24), neutrophil cytosolic factor 1 (*NCF1*-7q11.23), neutrophil cytosolic factor 2 (*NCF2*-1q25) e neutrophil cytosolic factor 4 (*NCF4*-22q13.1) possuem o padrão de herança autossômica recessiva, enquanto que mutações no gene cytochrome b-245 cadeia beta (*CYBB*-Xp21.1) são ligadas ao sexo (Koker, Camcioglu *et al.*, 2013). Em aproximadamente 70% dos pacientes com diagnóstico confirmado de DGC a causa genética é por mutações no gene *CYBB*, que codifica uma subunidade da NADPH oxidase (Di Matteo, Giordani *et al.*, 2009; Koker, Camcioglu *et al.*, 2013). Portanto, o sexo masculino é predominante acometido pela DGC. Em São Paulo, dos 40 pacientes com diagnóstico confirmado por DGC 34 eram do sexo masculino (Carneiro-Sampaio, Moraes-Vasconcelos *et al.*, 2013).

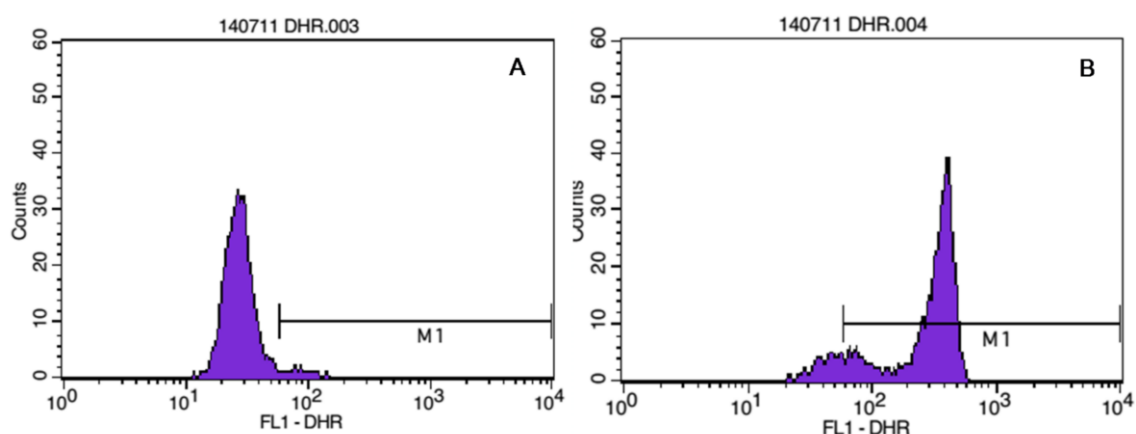


Figura 31. Histograma representativo do teste de Dihidrorodamina. Neutrófilos de sangue periférico da amostra do paciente (1570F) demonstram capacidade em produzir O_2^- (88,38%; valor de referência >80%). Amostra 1570F antes (A) e após (B) estímulo com PMA.

5.2.5 Quantificação da expressão *ex vivo* de marcadores para outras células do sistema imune

Amostras de sangue dos pacientes com reação adversa ao BCG e outras micobacterioses também foram analisadas quanto à quantidade de linfócitos T CD8+ (CD45+CD3+CD8+) e T CD4+ (CD45+CD3+CD4+) (**Figura 32**). Os pacientes sem DMSM possuem maiores quantidades de células T CD4+ do que os pacientes com DMSM. Entretanto, essa diferença não é estatisticamente significativa (Teste t unpaired; $p= 0,1021$). A menor idade, e a presença de reação adversa ao BCG vigente no momento da coleta têm que ser levada em consideração nos pacientes sem DMSM, esses devem ser os fatores responsáveis pela maior quantidade de T CD4+. Os pacientes com DMSM possuem maiores quantidade de T CD8+ do que os pacientes sem DMSM, mas não há diferença estatística (Teste t unpaired; $p= 0,4187$). Devido a esse aumento, a razão CD4+/CD8+ dos pacientes com DMSM se mostra reduzida em relação aos pacientes sem DMSM, mas sem significância estatística (Teste t unpaired; $p= 0,2418$). As células T CD8+ são importantes no combate de infecções virais, micobacterioses e tumores. Os pacientes com DMSM possuem dificuldades no “clearance” de infecções por micobactérias e salmonelas, por esse motivo, os níveis de linfócitos T CD8+ podem estar aumentados.

Todos os pacientes sem DMSM também foram avaliados quanto à produção de outras células da resposta imune como linfócitos B (CD45+CD19+) e células NK (CD56+CD16+) (**Figura 33**). Esses dados foram utilizados no auxílio da exclusão de outras imunodeficiências primárias. Todos os pacientes apresentaram níveis normais de linfócitos B (CD45+CD19+) esperado para a idade. Os níveis de linfócitos B foram bem variáveis (média $25,34 \pm 10,99$), mas isso é justificável devido às diferenças nas idades dos pacientes e estímulos no momento da coleta como: reação adversa ao BCG vigente e recente vacinação.

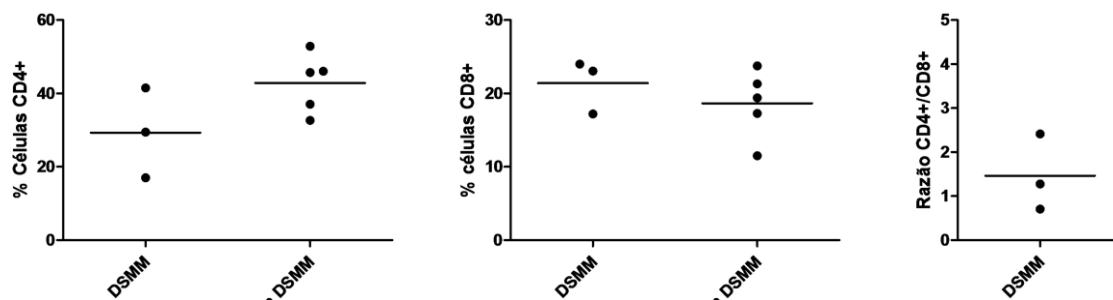


Figura 32. Diferença na porcentagem de células T CD4+, T CD8+ e a razão CD4+/CD8+ em análise *ex vivo*. Linfócitos dos pacientes sem DMSM (5 pacientes) expressam mais T CD4+ do que os do grupo com DMSM (3 indivíduos) (A), entretanto os pacientes com DMSM possuem níveis aumentados de T CD8+ (B) e por esse motivo menor razão CD4+/CD8+ (C). Porém não há significância estatística nessas correlações.

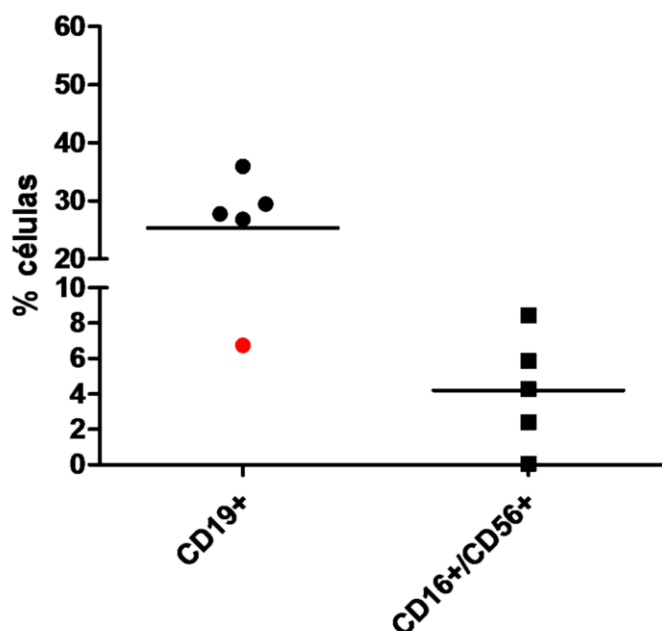


Figura 33. Diferença na porcentagem de linfócitos B (CD45+CD19+) e células NK (CD16+/CD56+) em análise *ex vivo*. Linfócitos dos pacientes sem DMSM (5 pacientes) expressam níveis variáveis de linfócito B (CD45+CD19+) e de células NK (CD16+/CD56+). O paciente 1286F (símbolo ●), é o paciente mais velho (5 anos) do grupo de pacientes sem DMSM (os demais são menores de um ano).

5.2.6 Sequenciamento do gene *IL12RB1*

Todas os 8 indivíduos vivos com histórico de reação adversa ao BCG tiveram o exon 1 do gene *IL-12Rβ1* sequenciado. Nos indivíduos 830F1, 830F2 e 1212F foram encontrados a mutação inédita c.21G>A (W7X) (**Figura 34**), enquanto seus pais são heterozigotos. Essa mutação é um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) de G>A (rs150172855) que acarreta na substituição do aminoácido triptofano por um sinal de parada Stop Códon. Nesses mesmos indivíduos foi observada uma baixa expressão de IL-12Rβ1 *ex vivo*, e após estímulo das PBMCs por 72h com PHA *in vitro*. E por esse motivo, os indivíduos citados possuem baixa produção de IFN-γ após estímulo com PHA e ausência da citocina nos sobrenadantes das PBMCs estimuladas com lisado de BCG. Assim eles foram diagnosticados como portadores da DMSM. O paciente 1528F faleceu em decorrência de septicemia cujo agente provável é a BCG. Amostras de DNA dos progenitores do paciente 1528F foram coletadas pela Msc. Betina Ivana Terra Azevedo. Os pais são heterozigotos para a mutação c.21G>A. Como a deficiência de IL-12Rβ1 é uma doença recessiva, o paciente 1528F tem um diagnóstico post-mortem clínico de DMSM.

No total, amostras de 18 indivíduos tiveram o exon 1 do gene *IL-12Rβ1* sequenciados. Dentre eles: 8 pacientes com reação adversa ao BCG, 3 controles e 7 parentes dos pacientes com DMSM. Um indivíduo saudável apresentou heterozigose para o SNP rs436857, esse SNP está localizado 2 nucleotídeos antes do início da transcrição do gene *IL-12Rβ1* (região 5' UTR), existem diversos estudos de associação desse SNP com suscetibilidade à tuberculose (Park, Kwon *et al.*, 2008; Lopez-Isac, Bossini-Castillo *et al.*, 2014).

5.2.7 Sequenciamento dos genes IFNGR1 e IFNGR2

Todos os 7 exons do gene *IFNGR1* e os exons 2 e 3 do gene *IFNGR2* foram sequenciados em amostras cujos níveis de IFNGR1 se mostraram reduzidos. O método e iniciadores desenvolvidos pela Msc. Betina Terra foi utilizado para o sequenciamento dos genes alvos (Azevedo, 2004). (**Figura 35**).

A amostra 1668F foi prioridade para o sequenciamento do gene *IFNGR1* porque apresentou expressão de IFN- γ normal para células estimuladas com PHA e elevada quando estimulada com lisado de BCG. Entretanto tanto *ex vivo* quanto após estímulo com PHA *in vitro*, as células do paciente tiveram uma expressão parcial de IFNGR1. Como histórico clínico, ele teve uma septicemia sem isolamento do agente nos primeiros dias de vida e dois meses após tomar a vacina BCG apresentou uma reação adversa com linfadenite axilar não supurativa. A expressão parcial de IFNGR1 (OMIM # 107470) tem sido citada em alguns pacientes com reação adversa ao BCG, entretanto, o paciente não apresenta mutações à nível de DNA quando coparado com a amostra de referência (**Figura 36 e 37**).

A amostra de DNA da paciente 1620F também teve os éxons de IFNGR1 e de IFNGR2 sequenciados. Entretanto nenhuma mutação foi encontrada nas sequências.

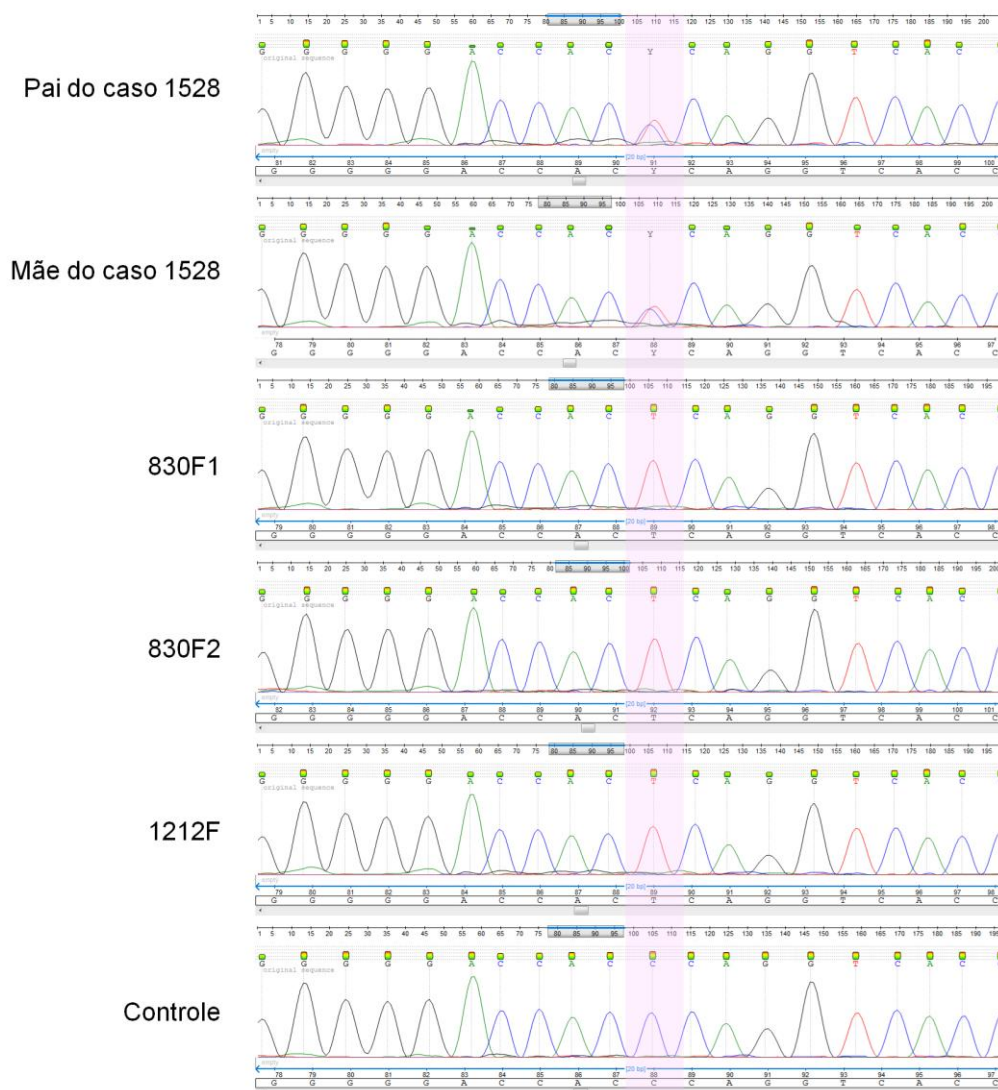


Figura 34. Sequenciamento de DNA revela mutação c.21G>A (c.21C>T, W7X) no gene *IL12RB1*. Esquema demonstrativo da mutação em heterozigose na amostra de DNA do pai dos pacientes 830F1 e 830F2 (C/T), presença da homozigose para o alelo T no paciente com DSMM 1212F e a homozigose para o alelo selvagem C em um indivíduo controle.

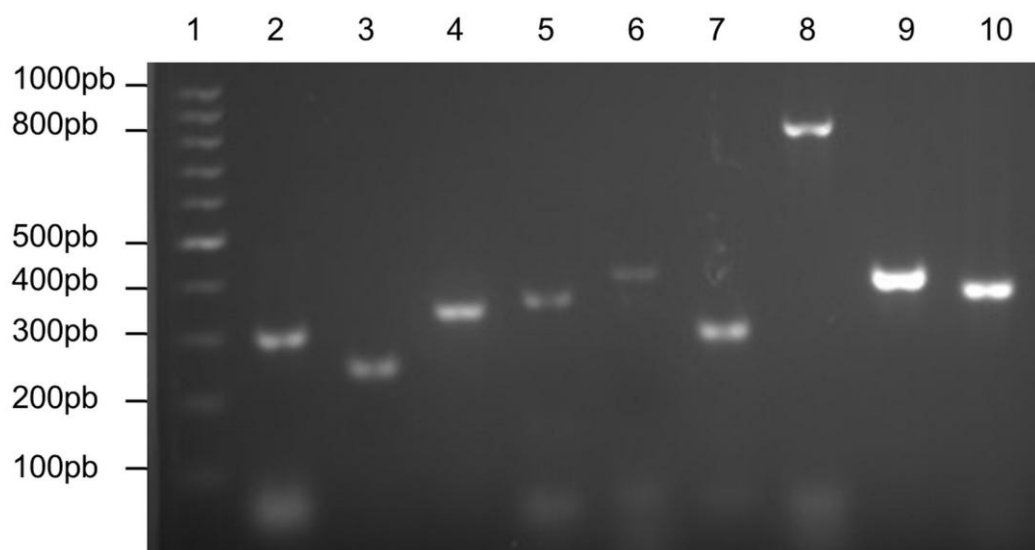


Figura 35. Produtos de PCR de éxons dos genes IFNGR1 e IFNGR2. 1: marcador de DNA; 2: Exon 1 do gene IFNGR1; 3: Exon 2 do gene IFNGR1; 4: Exon 3 do gene IFNGR1; 5: Exon 4 do gene IFNGR1; 6: Exon 5 do gene IFNGR1; 7: Exon 6 do gene IFNGR1; 8: Exon 7 do gene IFNGR1; 9: Exon 2 do gene IFNGR2; 10: Exon 3 do gene IFNGR2. Gel de agarose 1% corado com GelRed.

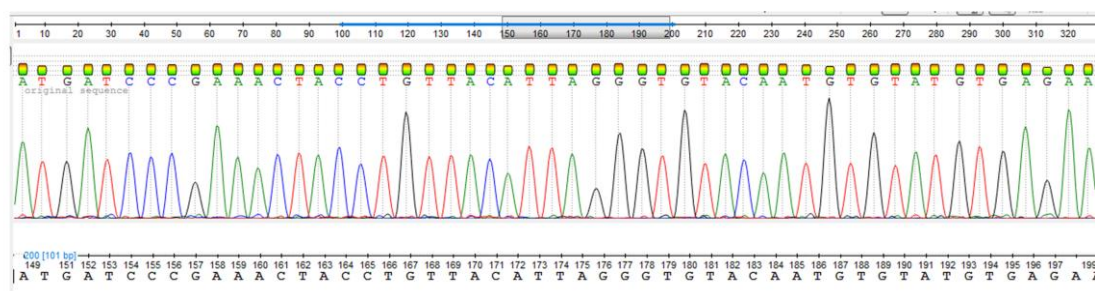


Figura 36. Sequenciamento de DNA para o exon 4 do gene IFNGR1 do paciente 1667F. Eletroferograma demonstrativo do sequenciamento do exon 4 do gene IFNGR1 na amostra do paciente 1667.

```

amostraH      GKTGGSASRRSSCYTTTAAAYWWMYCTCCTCCTTCCCCAGGAAAAATGGACCACCTAAAC
referencia    -----CTCCTCCTTCCCCAGGAAAAATGGACCACCTAAAC
              *****

amostraH      TGGATATCAGAAAGGAGGAGAAGCAAATCATGATTGACATATTTACCCTTCAGTTTTG
referencia    TGGATATCAGAAAGGAGGAGAAGCAAATCATGATTGACATATTTACCCTTCAGTTTTG
              *****

amostraH      TAAATGGAGACGAGCAGGAAGTCGATTATGATCCCGAAACTACCTGTTACATTAGGGTGT
referencia    TAAATGGAGACGAGCAGGAAGTCGATTATGATCCCGAAACTACCTGTTACATTAGGGTGT
              *****

amostraH      ACAATGTGTATGTGAGAATGAACGGAAGTGAGGTATGTGTTTCACATTTTTCATAATGGA
referencia    ACAATGTGTATGTGAGAATGAACGGAAGTGAGGTATGTGTTTCACATTTTTCATAATGGA
              *****

amostraH      AATCTTGTGTAGCTAGCAAAAAGTTGTTTCCTTTCTGTAGTGAATGAAAATAGGATGCTT
referencia    AATCTTGTGTAGCTAGCAAAAAGTTGTTTCCTTTCTGTAGTGAATGAAAATAGGATGCTT
              *****

amostraH      ATAAATATTCAGCAAGACTCACAGATCAWAAAWA
referencia    ATAAATATTCAGCAAGACTCACAGATCA-----
              *****

```

Figura 37. Alinhamento do exon 4 do gene *IFNGR1* do paciente 1667F com a sequência referência. A amostra amplificada e sequenciada do paciente 1667F para o exon 4 do gene *IFNGR1* não apresentou mutações quando comparadas por alinhamento com a sequência de referência NC_018917.2.

5.3 Caracterização da DMSM nos pacientes com a mutação c.21G>A

5.3.1 Determinação da frequência da mutação c.21G>A

Para a determinação da frequência da mutação c.21G>A no gene *IL12Rβ1*, iniciadores marcados com fluorocromo (FAM-6) foram desenhados com o objetivo de amplificar a região contendo a mutação. Após a amplificação da região alvo, os produtos de PCR foram digeridos pela enzima de restrição DdeI (RFLP-QF-PCR), que corta o amplicom na presença do alelo mutante A. Assim de acordo com a análise *in silico* na presença do alelo mutante A, o eletroferograma apresentará um alelo de 113pb, enquanto que na presença do alelo selvagem a digestão não ocorre e há a presença do alelo 229pb. Entretanto, experimentalmente, a enzima DdeI digere o amplicom dos alelos não portadores da mutação c.21G>A em 29pb (**Figura 38**), essa digestão não foi encontrada pelo programa *in silico* online NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Por esse motivo, adicionamos a técnica minissequenciamento de único nucleotídeo para a confirmação da mutação c.21G>A e o sequenciamento Sanger nas amostras com a presença (**figura 39**).

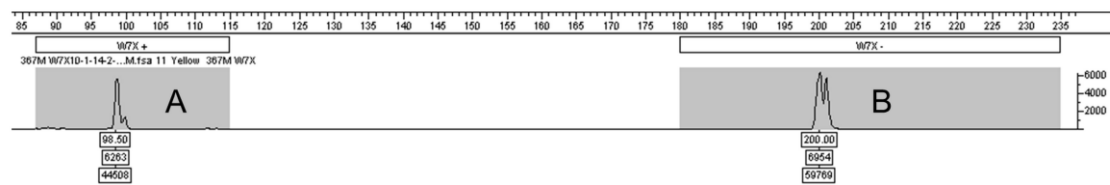


Figura 38. Eletroferograma representativo da genotipagem da mutação c.21G>A do gene *IL-12Rβ1* por RFLP-QF-PCR. A amostra de DNA do indivíduo 367M apresentou um amplicom (A) com 98pb (15pb a menos do que o previsto) e um segundo amplicom (B) com redução de 30pb (200pb) e por isso é heterozigoto c.21G/A.

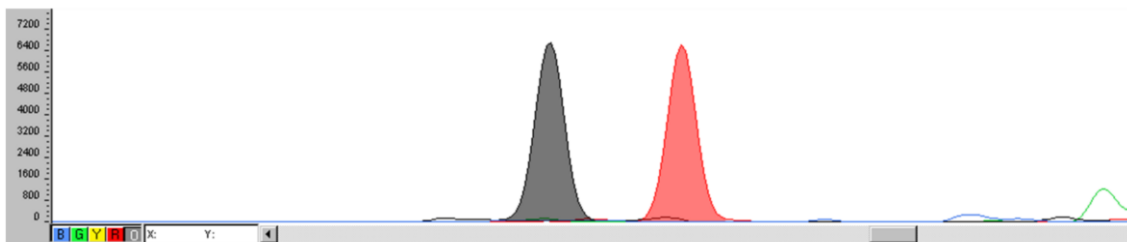


Figura 39. Eletroferograma representativo da genotipagem por minissequenciamento de único nucleotídeo da mutação c.21G>A do gene *IL12Rβ1*. DNA da amostra 367M é heterozigota para a mutação c.21G>A pois no eletroferograma gerado pelo minissequenciamento de único nucleotídeo (SNaPshot) apresentou dois alelos: um em preto G (guanina) e outro de vermelho A (adenina).

A genotipagem da mutação c.21G>A foi realizada em 227 indivíduos aleatórios pelo método (RFLP-QF-PCR), um indivíduo apresentou a mutação c.21G>A em heterozigose. A amostra desse indivíduo foi analisada também por minissequenciamento de único nucleotídeo para a mesma mutação e por sequenciamento Sanger do exon 1 do gene *IL12Rβ1*. Todas as técnicas confirmaram a mutação e, portanto, a frequência observada do alelo mutante A da mutação c.21G>A é 0,002 enquanto a frequência esperada é de 0,004. E a taxa de heterozigose da mutação c.21G>A é de 0,4%.

5.3.2 Rastreo da origem da mutação c.21G>A

Na Região Norte Fluminense, 5 famílias com a mutação c.21G>A foram encontradas (830, 1212, 1528, 367 e 1692). Devido a mutação c.21G>A ser inédita na região, é possível que essa mutação tenha sido introduzida por um ou poucos indivíduos que deixaram muitos descendentes na região Norte Fluminense. Isso explicaria a presença de 4 pacientes com DMSM que é uma doença muito rara (frequência esperada de 1/1.000.000)

A fim de caracterizar se as famílias portadoras da mutação possuem um mesmo ancestral em comum, utilizamos o website UCSC genome bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) para encontrar haplótipos de SNP localizados no gene *IL12RB1*. Nesse site encontramos 8 SNPs (**Tabela 2**) que formam 23 haplótipos. A frequência desses haplótipos na população mundial (Africana, Mixe-Americana, Asiática e europeia) varia de 66,6% a 0,05% (**Tabela 3**). Alguns desses haplótipos são característicos de determinada população, por exemplo, os haplótipos H5, H8, H9, H11, H13, H20 e H22 são quase que na totalidade exclusivos da população africana e seus descendentes; enquanto que os haplótipos H3 e H17 são exclusivos da população Europeia. Estes haplótipos podem fornecer, então, importantes informações sobre a ancestralidade da população. Considerando o histórico recente de miscigenação da população brasileira, os haplótipos também são relevantes em estudos de Antropologia Genética.

Tabela 2. SNPs no gene *IL-12Rβ1* alvos do estudo.

Nome	dbSNP ^a	Alelos ^b	Consequência	Posição ^c	MAF ^d
SNP1	rs436857	C>T		UTR 5'	0,1276
c.21G>A	rs150172855 ^e	G>A	Stop-gain	éxon 1	-
SNP2	rs17887176	C>T	Missense	éxon 4	0,0114
SNP3	rs147215816	G>A	Missense	éxon 5	0,0076
SNP4	rs11575926	G>A	Missense	éxon 6	0,0559
SNP5	rs11575934	A>G	Missense	éxon 8	0,2294
SNP6	rs375947	T>C	Missense	éxon 11	0,2686
SNP7	rs401502	G>C	Missense	éxon 11	0,2516
SNP8	rs11575935	G>A	Missense	éxon 14	0,0196

^a Número de identificação *rs* no banco de dados de SNP do NCBI (dbSNP) (Sherry, Ward *et al.*, 2001).

^b Mudança de nucleotídeos de acordo com a sequência ENSG00000096996.

^c Posição do SNP no transcrito ENSG00000096996.

^d Frequência alélica do alelo variante disponível no dbSNP (Sherry, Ward *et al.*, 2001).

^e SNP do polimorfismo c.21G>A no gene *IL12Rβ1*.

A genotipagem dos 8 SNPs foi realizada por SNaPShot (**Figura 40**). Todos os pais dos pacientes genotipados carregam o mesmo haplótipo H1 (5 cromossomos). Os três pacientes carregam apenas o mesmo haplótipo H1 em homozigose. Na amostragem populacional, o único cromossomo (1/454) com a mutação possui esse haplótipo. A ocorrência da mutação inédita c.21G>A no mesmo haplótipo em indivíduos sem parentesco direto indica que a mutação foi inserida na população local a partir de um único indivíduo, caracterizando o efeito fundador.

Tabela 3. Possíveis haplótipos a serem obtidos com a genotipagem dos SNPs no gene *IL-12Rβ1* alvos do estudo.

Haplótipo	Homozigose %	Distribuição entre os grupos majoritários					SNPs							
		Africanos %	Mixe-americanos %	Asiáticos %	Europeus %	SNP1	SNP2	SNP3	SNP 4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8	
H1	66.6	44.1	22.5	18.9	23.2	35.4	P	P	A	R	Q	M	G	A
H2	12.7	2.29	9.7	11.9	42.2	36.1	P	P	A	R	R	T	R	A
H3	6.36	0.18	1.44	17.3	0.72	80.6	L	P	A	H	R	T	R	A
H4	4.30	0.18	9.6	9.6	61.7	19.1	L	P	A	R	R	T	R	A
H5	2.79	0.46	82.0	11.5	1.64	4.92	L	P	A	R	Q	M	G	A
H6	1.56	0.09	32.4	0	67.6	0	P	P	A	R	R	T	R	T
H7	1.19	0	0	3.85	96.2	0	P	P	T	R	Q	M	G	A
H8	1.19	0	88.5	7.69	0	3.85	P	P	A	R	Q	T	G	A
H9	0.92	0	85.0	15.0	0	0	P	S	A	R	Q	T	R	A
H10	0.82	0	61.1	11.1	16.7	11.1	P	P	A	R	Q	T	R	A
H11	0.27	0	100.0	0	0	0	L	P	A	R	Q	T	R	A
H12	0.23	0	0	60.0	40.0	0	P	P	A	R	R	M	G	A
H13	0.18	0	100.0	0	0	0	L	P	A	R	Q	T	G	A
H14	0.18	0	50.0	0	0	50.0	P	S	A	R	Q	M	G	A
H15	0.14	0	0	0	100.0	0	L	P	A	R	R	T	R	T
H16	0.14	0	0	33.3	0	66.7	P	P	A	H	R	T	R	A
H17	0.09	0	0	0	0	100.0	L	S	A	H	R	T	R	A
H18	0.09	0	0	50.0	0	50.0	L	P	A	H	R	M	G	A
H19	0.09	0	50.0	50.0	0	0	P	P	A	R	R	T	G	A
H20	0.05	0	100.0	0	0	0	P	S	A	R	R	T	R	A
H21	0.05	0	0	0	100.0	0	P	P	A	R	Q	T	R	T
H22	0.05	0	100.0	0	0	0	L	P	A	R	R	M	G	A
H23	0.05	0	0	0	100.0	0	P	P	A	R	Q	M	G	T

A análise computacional, realizada pelo aluno de iniciação científica da FMC Vladimir Gomes Alves Júnior, utilizou 8 SNPs citados anteriormente mais três SNPs (rs845381, rs3833286 e rs3746190) no gene *IL12RB1*. Nos 5008 haplótipos do projeto 1000 Genomas, a frequência global do haplótipo compartilhado pelas crianças homocigotas para a mutação c.21G>A é 8,42% (422/5008), com a seguinte distribuição: 154 indivíduos da Ásia, 122 da África, 80 da Europa e 66 da América. Considerando o histórico de miscigenação da região Norte Fluminense, é provável que a origem do haplótipo seja Africana ou Europeia.

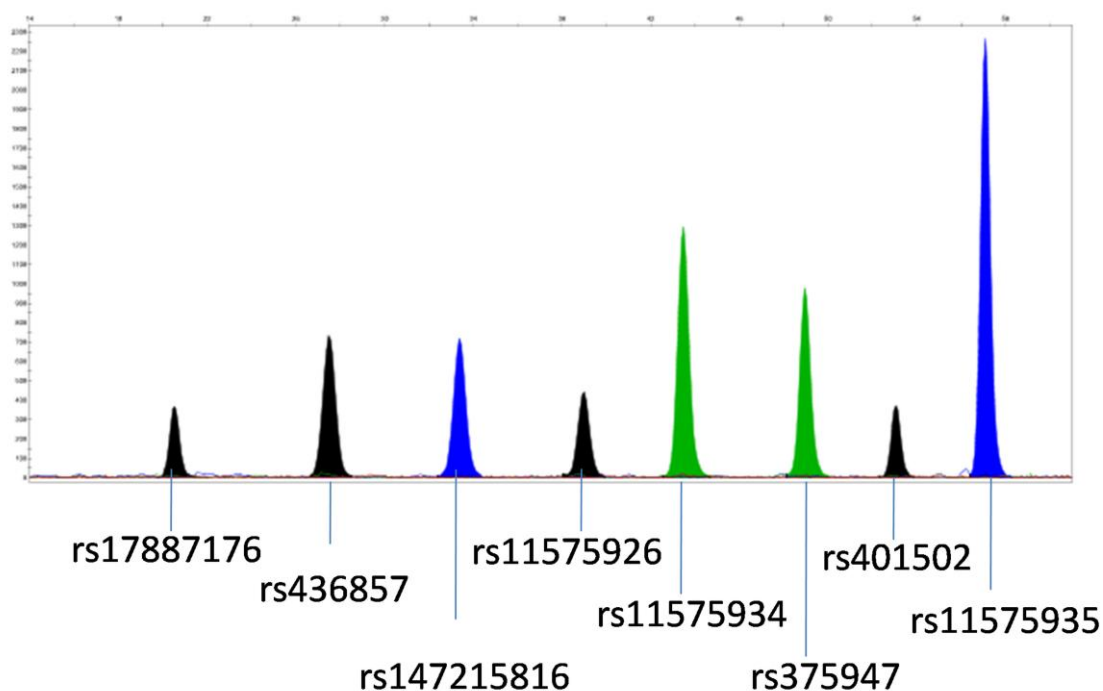


Figura 40. Eletroferograma representativo da genotipagem por minissequenciamento de único nucleotídeo dos 8 SNPs alvos no gene *IL12Rβ1*. DNA da amostra do paciente 1212F é homocigoto para todos os SNPs genotipados, caracterizando o haplótipo carreador da mutação c.21G>A do gene *IL12RB1*.

5.3.3 Duffy

O SNP rs2814778 localizado no gene *ACKRI* é responsável pela produção da proteína Duffy (do grupo sanguíneo Duffy). O alelo C é exclusivo da população africana e muito frequente em populações afrodescendente, enquanto que o alelo T é o alelo ancestral europeu. Através do ensaio de minissequenciamento e confirmado por sequenciamento Sanger (**Figura 41**), os três indivíduos com DMSM e todos os 9 portadores em heterozigose da mutação c.21G>A são homozigotos para o alelo de ancestralidade europeia rs2814778-T.

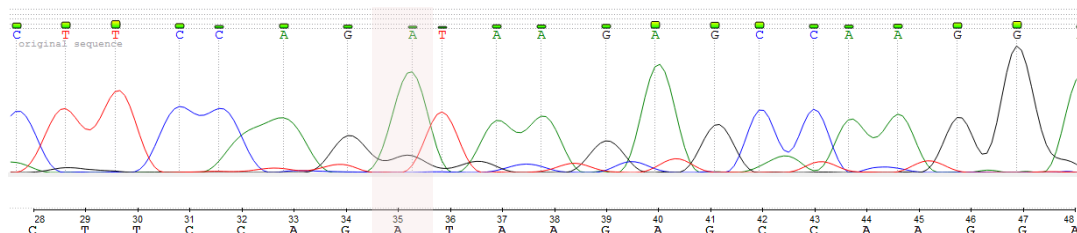


Figura 41. Sequenciamento de DNA para identificação do SNP rs2814778 em amostra do paciente 1212F. Eletroferograma demonstrativo do sequenciamento da região 5'UTR do gene *ACKRI* (Duffy) para identificação do alelo rs2814778-A (sequenciamento realizado na fita anti-sentido) na amostra do paciente 1212F.

6. Discussão

Recentemente, o Ministério da Saúde divulgou os dez sinais de alerta para a imunodeficiência primária destacando a importância de se acompanhar melhor pacientes com histórico de BCGite/BCGose (Saúde, 2013). Os 12 sinais de imunodeficiência primária em crianças com menos de 12 meses de vida são: infecções fúngicas, virais e/ou bacterianas persistentes ou graves; reação adversa a vacinas de germe vivo, em especial BCG; *diabetes mellitus* persistente ou outra doença autoimune e/ou inflamatória; quadro sepse-símile, febril, sem identificação do agente infeccioso; infecções cutâneas extensas; diarreia persistente; cardiopatia congênita; atraso na queda do coto umbilical; história familiar de imunodeficiência ou de óbitos precoces por infecção; linfocitopenia, ou outra citopenia, ou leucocitose sem infecção, persistentes; hipocalcemia com ou sem convulsão e ausência de imagem tímica ao raios-X do tórax.

Considerando a taxa bruta de natalidade (2010) de 15 por mil habitantes/ano, cerca de 3 milhões de doses de BCG seriam aplicadas anualmente, sendo 2.500 dessas em portadores de alguma Imunodeficiência Primária. E menos que uma a cada milhão de crianças vacinadas desenvolvem a doença disseminada severa causada por BCG (Grange, 1998). Acreditamos que as Imunodeficiências Primárias deva ser muito mais frequentes do que o estimado, e que as crianças que apresentaram eventos adversos severos ao BCG e/ou infecção por micobactéria atípica representam um estrato populacional importante para o rastreamento epidemiológico dessas doenças.

Portanto, essa pequena coorte é singular e importante, visto que nenhum acompanhamento específico que visa a investigação de imunodeficiência primária é realizada nesses pacientes. E, portanto, as DMSM ou DGC são sub-notificadas.

Das reações adversas mais comuns, o abscesso é o mais frequente. Em um estudo na França, o abscesso foi visto em 60 crianças (2,46%), sendo necessário o manejo cirúrgico em duas crianças. Entretanto, nenhum caso de adenite foi observado (Dommergues, De La Rocque *et al.*, 2009).

A paciente com reação adversa à vacina BCG 1635F é um retrato do erro na dose e manuseio vacinal. Mesmo aqui no Brasil, onde na ampla maioria dos casos são enfermeiras com treinamento e experiência que aplicam a vacina BCG, erros na aplicação da vacina acontecem. Na França, onde é o clínico ou o pediatra que aplica a vacina, existem maiores índices de erros na aplicação da vacina BCG. No estudo de Dommergues e colaboradores (2009), o local de injeção da vacina foi correto (parte

superior externa do braço) em 72,1%, na parte interna do braço 21,6%, no antebraço 5,9% e em outro local em 0,5%. A dose recomendada foi correta em 73,4% dos casos, enquanto que 23,2% das crianças vacinadas foram subdosagem e 3,5% superdosagem (Dommergues, De La Rocque *et al.*, 2009). Ou seja, 30,4% das crianças não foram corretamente vacinadas (fora do músculo deltoide ou fora da dose) (Dommergues, De La Rocque *et al.*, 2009). Nesse mesmo estudo, a reação adversa à vacina BCG, caracterizada por um diâmetro superior a 10mm em criança vacinada, aconteceu em 433 crianças (17,8%). Destas, 30,2% foram em crianças que receberam doses maiores do que o recomendado de BCG.

Dois pacientes tinham histórico familiar de outras micobacterioses como tuberculose (paciente 1635F) e hanseníase (paciente 1286F). O paciente 1286F teve reação adversa ao BCG na segunda dose, como profilaxia de exposição à hanseníase. Em escolares do Brasil, onde há uma década a segunda dose era recomendada, a estimativa foi de ocorrência de 1 evento adverso (linfadenopatia local) a cada ~2.500 mil doses aplicadas do BCG (Dourado, Rios *et al.*, 2003).

Dois outros pacientes (1668F e 1692F) vinham de história prévia de internação hospitalar sendo um com septicemia confirmada antes do diagnóstico de reação adversa à vacina BCG. Esses quadros chamam a atenção para imunodeficiência primária. Entretanto, os pacientes não possuem nenhuma deficiência que comprometa o número de linfócitos T, B e células NK, bem como possuem capacidade preservada na produção de IFN- γ e espécies reativas de oxigênio. O paciente 1668F possui uma redução na expressão do receptor 1 de IFN- γ . Entretanto, pelas análises prévias, sem presença de mutação em nível de DNA. A disfunção ou redução de neutrófilos é um fenômeno presente em algumas imunodeficiências primárias e pode ser transitória. Esses pacientes ainda estão sob investigação para imunodeficiências primárias mais tênues como a deficiência de anticorpos e a deficiência transiente de anticorpos na infância que tem sido associadas à reação adversa ao BCG (Lynch, O'loughlin *et al.*, 2012).

Esse projeto visou, através da imunofenotipagem e sequenciamento de genes alvos, auxiliar na investigação das imunodeficiências primárias associadas aos efeitos adversos da vacinação com BCG. A utilização dessas ferramentas aperfeiçoa o diagnóstico definitivo de DMSM e da DGC, bem como melhora o prognóstico dos pacientes. No Brasil, o diagnóstico laboratorial da DGC e DSMM não é fornecido pelo Sistema Único de Saúde e as análises são realizadas em laboratórios de centros de

referência das grandes capitais (Carneiro-Sampaio, Moraes-Vasconcelos *et al.*, 2013). Para a DGC, é necessária a medição do peróxido de hidrogênio produzido pelas células fagocitárias (Richardson, Ayliffe *et al.*, 1998). Para a DSMM, deve-se averiguar a expressão das proteínas envolvidas na via IL12-IFN γ (Moraes-Vasconcelos, Grumach *et al.*, 2005; Luangwedchakarn, Jirapongsaranuruk *et al.*, 2009). Entretanto, o diagnóstico clínico é possível e muitas vezes é a base para o encaminhamento dos pacientes para centros de investigação de imunodeficiências primárias a fim de se confirmar os achados clínicos. A investigação por imunofenotipagem ou sequenciamento de genes alvos esclarece dentro de uma doença complexa como DMSM qual é a molécula ausente ou disfuncional e assim quais são as alternativas clínicas no acompanhamento do paciente. O diagnóstico precoce de DMSM e DGC propicia um melhor manejo e acompanhamento dos pacientes, com a utilização profilática de antibióticos ou transplante de medula óssea. Em infecções mais graves, os pacientes podem utilizar antibióticos por longos períodos e/ou IFN- γ exógeno (De Beaucoudrey, Samarina *et al.*, 2010).

Na nossa coorte, os pacientes com histórico de reação adversa ao BCG vacinal produzem menores quantidades de IFN- γ do que os controles. Entretanto, os pacientes com DSMM apresentaram menor expressão de IL-12R β 1 e IFN- γ do que os pacientes sem DSMM. Assim sendo, o fenótipo observado de redução de IL-12R β 1 e IFN- γ reafirma a condição diagnóstica. Os pacientes 830F1 e 830F2 tinham antes da confirmação da deficiência de IL-12R β 1 o diagnóstico de imunodeficiência primária. As hipóteses diagnósticas eram a síndrome de Hyper-IgE e a DMSM. Com a investigação molecular, foi descoberta a mutação c.21G>A no gene *IL12RB1* e posteriormente a redução da expressão da proteína IL-12R β 1 em PBMCs estimuladas com PHA. A implantação aos poucos dessas ferramentas investigativas permitiu utilização para outros casos e na presente data esse projeto contribuiu para o diagnóstico precoce do caso 1212F e o diagnóstico *post-mortem* do caso 1528F.

Os quatro pacientes com DMSM (830F1, 830F2, 1212F e 1528F) têm em comum histórico de reação adversa ao BCG. Entretanto, cada paciente apresentou outras características da DMSM. O paciente 1528F foi à óbito por septicemia sendo a BCG, o provável agente etiológico. O paciente 830F1 teve aos 13 anos diagnóstico de histoplasmosse após adenopatias cervicais e febre com uma recidiva aos 18 anos. O paciente 830F2 teve aos 8 anos de idade infecção por *Salmonella choleraesuis* que

culminou em septicemia com ressecção do baço. O paciente mais novo (1212F), apresentou recidiva da reação adversa a BCG após 4 meses do fim do primeiro tratamento e aos 4 anos vasculite leucocitoclástica, sendo uma infecção extra intestinal por *Salmonella* o provável agente.

Os três pacientes vivos tem em comum também a elevação nos níveis de IgE mesmo sem sintomas de dermatite atópica e doenças alérgicas. Níveis elevados de IgE foram vistos em outros casos (Altare, Durandy *et al.*, 1998; Caragol, Raspall *et al.*, 2003; Carvalho, Iazzetti *et al.*, 2003; Moraes-Vasconcelos, Grumach *et al.*, 2005; Luangwedchakarn, Jirapongsaranuruk *et al.*, 2009), entretanto não é patognomônica. Adicionalmente, não existem evidências de que os pacientes com DMSM tenha uma resposta Th₂ Exacerbada (Doffinger, Jouanguy *et al.*, 1999).

Mesmo com uma redução na capacidade de produzir IL-17A, os pacientes homozigotos para a mutação c.21G>A no gene *IL12RB1* não apresentaram até o momento infecção por *Candida*. Infecções fúngicas têm sido recentemente correlacionadas com a deficiência de IL-12Rβ1 (Lilic, 2012). Devido à ausência da via IL-23, esses pacientes possuem uma menor geração de células Th17, e consequentemente mais dificuldade em controlar infecções fúngicas (Conti, Shen *et al.*, 2009; Hanna e Etzioni, 2011). A *Candida* é o gênero com maior frequência nos relatos de caso. Na revisão dos casos publicados, 36 (19,25%) dos casos registraram infecções por *Candida*.

A maioria dos pacientes diagnosticados com DMSM, cujo defeito é na proteína IL12Rβ1, apresentou ausência total de expressão da mesma (Al-Muhsen e Casanova, 2008). Entretanto, na literatura já foram descritos casos em que os pacientes apresentara a expressão de IL-12Rβ1 intracelularmente (Van De Vosse, Ottenhoff *et al.*, 2010), na membrana celular com funcionalidade parcial (Ramirez-Alejo, Blancas-Galicia *et al.*, 2013) ou sem funcionalidade (Fieschi, Bosticardo *et al.*, 2004; Scheuerman, De Beaucoudrey *et al.*, 2007; Vinh, Schwartz *et al.*, 2011).

A mutação c.21G>A não erradica a expressão da proteína IL12Rβ1, entretanto a produção da citocina IFN-γ é extremamente reduzida e os pacientes apresentaram infecções tão graves quanto os pacientes com ausência de expressão do receptor da cadeia β1 da citocina IL-12.

O sequenciamento de genes alvos ou do exoma tem revelado diversas mutações novas com potenciais patogênicos. Entretanto, nem toda mutação com potencial

patogênico é realmente patogênica (Narasimhan, Hunt *et al.*, 2016). Na atualidade, diversos grupos de pesquisa médica têm à sua disposição a opção de sequenciamento do genoma do paciente com uma determinada suspeita clínica. Exomas ou sequenciamento de um ou mais genes, de acordo com um painel de pesquisa investigativo, podem trazer como resultado mutações presentes ou não no banco de dados 1000 genomas em um paciente com histórico clínico de doença rara, como foi o caso da mutação c.21G>A no gene *IL12RB1* nos 3 pacientes da região Norte Fluminense. Há a necessidade de uma cautela na interpretação das mutações. Um exemplo recente foi a pesquisa de Palamaro e colaboradores (2012), que identificaram o variante R156H (rs11575926) no gene *IL12RB1* em um paciente sem histórico de infecção por micobactéria, mas com recorrência de broncopneumonia e IgE elevado. De acordo com o grupo, essa mutação que não foi encontrada em outros 50 indivíduos seria uma mutação patogênica causadora de imunodeficiência primária por deficiência de IL-12Rβ1 (Palamaro, Giardino *et al.*, 2012). Entretanto, uma carta do editor escrita por Bustamante e colaboradores (2013) levantou questionamentos à pesquisa e diagnóstico provando que o variante R156H não é uma mutação patogênica. Para isso, o grupo utilizou dados populacionais já publicados no banco de dados do NCBI e verificou que a mutação possui frequência de 11 à 15% entre europeus e norte americanos. O grupo realizou um estudo funcional provando que a mutação R156H não alterava a produção de IFN-γ em células modificadas, concluindo que o variante descrito erroneamente pelo grupo de Palamaro era apenas uma mutação benigna. Eles ainda realizaram um estudo computacional com programas de predição dos efeitos da variação na estrutura da proteína IL-12Rβ1 (Van De Vosse, Van Dissel *et al.*, 2013).

Por isso, o sequenciamento por si só não possui robustez na associação de determinada mutação nova com doença rara. Para isso, outras ferramentas incluindo os estudos com imunofenotipagem vem a contribuir na comprovação do envolvimento da mutação nova na doença rara. Bustamante e colaboradores utilizaram três ferramentas para determinar se determinada mutação é patogênica ou não. A busca e investigação da presença e frequência da mutação nos bancos de dados populacionais (1000 genomas e EXAC por exemplo) foi uma das ferramentas, além de utilizar uma investigação funcional e por ultimo programas de predição dos efeitos da variação na estrutura da proteína. A interpretação da mutação foi realizada de acordo com o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (CAGMG) que classifica as variações em cinco

categorias baseadas em alguns critérios que dão informações sobre a variação como estudos populacionais, computacionais, funcionais e informação de segregação. O CAGMG estratifica as mutações em cinco categorias de acordo com os resultados alcançados nos cinco critérios: patogênica, provavelmente patogênica, significância incerta, provavelmente benigna e benigna (Richards, Aziz *et al.*, 2015). Portanto, para se evitar o diagnóstico incorreto ou a valorização de determinada mutação é necessário cautela principalmente nas mutações que ocasionam troca de aminoácido.

De acordo com os critérios da CAGMG, a mutação c.21G>A no gene *IL12RB1* é classificada em evidência forte de patogenicidade (PVS1). O primeiro argumento é que em estudos populacionais, a mutação c.21G>A é rara. Na região Norte Fluminense, a mutação ocorre em 1 a cada 454 cromossomos (frequência alélica de 0,0022). Todos os portadores da mutação vivem em uma região de 60km². A mutação não foi encontrada em 60,706 indivíduos não relacionados do banco de dados EXAC (Lek, Karczewski *et al.*, 2015); em 104,220 Islandeses (Sulem, Helgason *et al.*, 2015); em 6,503 indivíduos do NHLBI GO Exome Sequencing Project, em 3,222 Britânicos adultos de origem paquistanesa (Narasimhan, Hunt *et al.*, 2016). Entretanto, no banco de dados NCBI dbSNP, o Instituto de J. Craig Venter relatou a mutação c.21G>a no gene *IL12RB1* em 1 de 2,056 cromossomos (frequência alélica de 0,0005; 4,4 vezes mais rara do que no Norte Fluminense). O indivíduo portador da mutação c.21G>A relatado no banco dbSNP é de descendência alemã e é geneticamente caracterizado como caucasiano (Louvain De Souza, Fernandes *et al.*, 2016). Ele compartilha o haplótipo CACCAGTCCGG (Fita positiva) que é compartilhado pelas três crianças vivas na região Norte Fluminense diagnosticadas com a deficiência de IL-12Rβ1 e também pelos outros indivíduos portadores da mutação c.21G>A. Esse haplótipo, que possui 27,3kb de comprimento ao longo do gene *IL12RB1* é composto pelos SNPs rs3833286, rs3746190, rs11575935, rs401502, rs375947, rs845381, rs11575934, rs11575926, rs147215816, rs17887176, rs436857.

O segundo argumento é que a mutação identificada na região Norte Fluminense diminui significativamente a expressão *ex vivo* e *in vitro* da proteína IL-12Rβ1 apenas nas crianças homozigotas para a mutação, e apenas nessas crianças a atividade de IL-12Rβ1 é alterada apresentando redução na expressão de INF-γ quando as células são estimuladas com PHA e lisado de BCG, bem como também a redução na produção de IL-17^a nas células PHA-blast. O paciente 830F1 produz >4.000 pg/mL de IFN-γ em

células estimuladas com PHA, níveis próximos dos controles ao contrário do que é visto em seu irmão mais novo 830F2 e no outro paciente 1212F. O paciente 830F2 é o paciente com a melhor clínica quando comparado com os demais pacientes. Entretanto, níveis aumentados de IFN- γ em níveis próximos do controle ou até em níveis maiores do que o controle foram vistos em outros pacientes com deficiência de IL-12R β 1 (De Jong, Altare *et al.*, 1998; Caragol, Raspall *et al.*, 2003; Lichtenauer-Kaligis, De Boer *et al.*, 2003; Moraes-Vasconcelos, Grumach *et al.*, 2005; Ramirez-Alejo, Blancas-Galicia *et al.*, 2013; Schepers, Schandene *et al.*, 2013).

O terceiro argumento é que a mutação c.21G>A (nonsense, stop-codon) de acordo com um estudo computacional com o programa de predição Splice Finder cria um ESS (silenciamento de uma região aceptora de Splice), uma região aceptora de Splice e uma doadora, que possui um efeito potencialmente deletério no splicing do RNA, envolvendo um mecanismo de parcial *in-frame* no exon 1. Entretanto, esses achados *in silico* não foram confirmados pelo nosso estudo devido a dificuldades de amplificação desse segmento nos cDNAs provenientes de PHA-Blast.

Sendo assim, dos nove casos com reação adversa ao BCG investigados, quatro foram diagnosticados com DMSM (44,4%), e nenhum caso foi diagnosticado com DGC. A prevalência da mutação c.21G>A no gene *IL12RB1* fez com que essa região tivesse um número maior de casos com uma imunodeficiência rara que é a DMSM (1/1.000.000). Entretanto, não foi observada na nossa pequena coorte a DGC que tem uma maior frequência estimada (1/100.000).

7. Conclusão

Essa tese descreve pela primeira vez a mutação inédita c.21G>A no gene *IL12RB1* em pacientes com reação adversa a vacina BCG diagnosticados com DMSM no Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Também de forma inédita descreve a presença da proteína IL-12R β 1 na superfície de linfócitos estimulados com PHA em pacientes com homozigose para uma mutação predita STOP-Codon no gene *IL12RB1*. A partir da implantação de uma plataforma de diagnóstico de Imunodeficiências Primárias os pacientes com DMSM puderam contar com aconselhamento genético e acompanhamento especializado, que lhes propiciou melhor prognóstico e qualidade de vida.

8. Referências

- Alangari, A. A., F. Al-Zamil, *et al.* Treatment of disseminated mycobacterial infection with high-dose IFN-gamma in a patient with IL-12Rbeta1 deficiency. Clin Dev Immunol, v.2011, p.691956. 2011.
- Al-Herz, W., A. Bousfiha, *et al.* Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. Front Immunol, v.2, p.54. 2011.
- Al-Muhsen, S. e J. L. Casanova. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. J Allergy Clin Immunol, v.122, n.6, Dec, p.1043-51; quiz 1052-3. 2008.
- Altare, F., A. Durandy, *et al.* Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. Science, v.280, n.5368, May 29, p.1432-5. 1998.
- Altare, F., D. Lammas, *et al.* Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guerin and Salmonella enteritidis disseminated infection. J Clin Invest, v.102, n.12, Dec 15, p.2035-40. 1998.
- Arkhipov, S. A., V. A. Shkurupy, *et al.* Study of macrophages in BCG granulomas in different compartments of the mononuclear phagocyte system. Bull Exp Biol Med, v.154, n.4, Feb, p.467-70. 2013.
- Azevedo, B. I. T. Investigação de alterações genéticas no receptor de IFN- γ em humanos: uma abordagem diagnóstica para hipersusceptibilidade à infecção pelo BCG. (Dissertação). Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2004. 104 p.
- Brasil, M. D. S. S. D. V. E. S. D. D. V. E. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação. Normas e Manuais Técnicos. S. A. Brasília: Ministério da Saúde. 2014 2008.
- Bustamante, J., G. Aksu, *et al.* BCG-osis and tuberculosis in a child with chronic granulomatous disease. J Allergy Clin Immunol, v.120, n.1, Jul, p.32-8. 2007.
- Bustamante, J., S. Boisson-Dupuis, *et al.* Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity. Semin Immunol, v.26, n.6, Dec, p.454-70. 2014.
- Caragol, I., M. Raspall, *et al.* Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor beta1 deficiency. Clin Infect Dis, v.37, n.2, Jul 15, p.302-6. 2003.
- Carneiro-Sampaio, M., D. Moraes-Vasconcelos, *et al.* Primary Immunodeficiency Diseases in Different Age Groups: A Report on 1,008 Cases from a Single Brazilian Reference Center. J Clin Immunol, Jan 29. 2013.

Carvalho, B. T., A. V. Iazzetti, *et al.* [Salmonella septicemia associated with interleukin 12 receptor beta1 (IL-12Rbeta1) deficiency]. J Pediatr (Rio J), v.79, n.3, May-Jun, p.273-6. 2003.

Conti, H. R., F. Shen, *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. J Exp Med, v.206, n.2, Feb 16, p.299-311. 2009.

De Beaucoudrey, L., A. Puel, *et al.* Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. J Exp Med, v.205, n.7, Jul 7, p.1543-50. 2008.

De Beaucoudrey, L., A. Samarina, *et al.* Revisiting human IL-12Rbeta1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. Medicine (Baltimore), v.89, n.6, Nov, p.381-402. 2010.

De Boer, T., J. T. Van Dissel, *et al.* Influenza virus vaccination induces interleukin-12/23 receptor beta 1 (IL-12/23R beta 1)-independent production of gamma interferon (IFN-gamma) and humoral immunity in patients with genetic deficiencies in IL-12/23R beta 1 or IFN-gamma receptor I. Clin Vaccine Immunol, v.15, n.8, Aug, p.1171-5. 2008.

De Jong, R., F. Altare, *et al.* Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. Science, v.280, n.5368, May 29, p.1435-8. 1998.

De Souza Campos Fernandes, R. C. e E. Medina-Acosta. BCG-itis in two antiretroviral-treated HIV-infected infants. Int J STD AIDS, v.21, n.9, Nov, p.662-3. 2010.

Di Matteo, G., L. Giordani, *et al.* Molecular characterization of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease and identification of novel CYBB mutations: an Italian multicenter study. Mol Immunol, v.46, n.10, Jun, p.1935-41. 2009.

Doffinger, R., E. Jouanguy, *et al.* Inheritable defects in interleukin-12- and interferon-gamma-mediated immunity and the TH1/TH2 paradigm in man. Allergy, v.54, n.5, May, p.409-12. 1999.

Dommergues, M. A., F. De La Rocque, *et al.* Local and regional adverse reactions to BCG-SSI vaccination: a 12-month cohort follow-up study. Vaccine, v.27, n.50, Nov 23, p.6967-73. 2009.

Dourado, I., M. H. Rios, *et al.* Rates of adverse reactions to first and second doses of BCG vaccination: results of a large community trial in Brazilian schoolchildren. Int J Tuberc Lung Dis, v.7, n.4, Apr, p.399-402. 2003.

Fieschi, C., M. Bosticardo, *et al.* A novel form of complete IL-12/IL-23 receptor beta1 deficiency with cell surface-expressed nonfunctional receptors. Blood, v.104, n.7, Oct 1, p.2095-101. 2004.

Gimenez-Sanchez, F., E. Cobos-Carrascosa, *et al.* Different penetrance of disseminated infections caused by nontuberculous Mycobacteria in Mendelian susceptibility to mycobacterial disease associated with a novel mutation. *Pediatr Infect Dis J*, v.33, n.3, Mar, p.328-30. 2014.

Grange, J. M. Complications of bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination and immunotherapy and their management. *Commun Dis Public Health*, v.1, n.2, Jun, p.84-8. 1998.

Gruenberg, D. A., S. Anover-Sombke, *et al.* Atypical presentation of IL-12 receptor beta1 deficiency with pneumococcal sepsis and disseminated nontuberculous mycobacterial infection in a 19-month-old girl born to nonconsanguineous US residents. *J Allergy Clin Immunol*, v.125, n.1, Jan, p.264-5. 2010.

Guia, S., C. Cognet, *et al.* A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo. *Blood*, v.111, n.10, May 15, p.5008-16. 2008.

Hanna, S. e A. Etzioni. New host defense mechanisms against *Candida* species clarify the basis of clinical phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*, v.127, n.6, Jun, p.1433-7. 2011.

Hesseling, A. C., L. F. Johnson, *et al.* Disseminated bacille Calmette-Guerin disease in HIV-infected South African infants. *Bull World Health Organ*, v.87, n.7, Jul, p.505-11. 2009.

Hoeve, M. A., N. D. Savage, *et al.* Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *Eur J Immunol*, v.36, n.3, Mar, p.661-70. 2006.

Koker, M. Y., Y. Camcioglu, *et al.* Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J Allergy Clin Immunol*, Jul 30. 2013.

Kusuhara, K., S. Ohga, *et al.* Disseminated *Bacillus Calmette-Guerin* lymphadenitis in a patient with gp91phox- chronic granulomatous disease 25 years after vaccination. *Eur J Pediatr*, v.168, n.6, Jun, p.745-7. 2009.

Kutukculer, N., F. Genel, *et al.* Cutaneous leukocytoclastic vasculitis in a child with interleukin-12 receptor beta-1 deficiency. *J Pediatr*, v.148, n.3, Mar, p.407-9. 2006.

Ladeira, I., I. Carvalho, *et al.* BCGitis in children. *Rev Port Pneumol*, v.20, n.3, May-Jun, p.172-3. 2014.

Lamhamedi-Cherradi, S., C. De Chastellier, *et al.* Growth of *Mycobacterium bovis*, Bacille Calmette-Guerin, within human monocytes-macrophages cultured in serum-free medium. *J Immunol Methods*, v.225, n.1-2, May 27, p.75-86. 1999.

Lauritsen, J. M. e M. Bruus. EpiData Data Entry, Data Management and basic Statistical Analysis System. L. J. M. Odense, Denmark: EpiData Association 2000-2008.

- Lek, M., K. Karczewski, *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans
10.1101/030338. [bioRxiv](#), 2015-01-01 00:00:00. 2015.
- Levin, M., M. J. Newport, *et al.* Familial disseminated atypical mycobacterial infection in childhood: a human mycobacterial susceptibility gene? [Lancet](#), v.345, n.8942, Jan 14, p.79-83. 1995.
- Lichtenauer-Kaligis, E. G., T. De Boer, *et al.* Severe Mycobacterium bovis BCG infections in a large series of novel IL-12 receptor beta1 deficient patients and evidence for the existence of partial IL-12 receptor beta1 deficiency. [Eur J Immunol](#), v.33, n.1, Jan, p.59-69. 2003.
- Lilic, D. Unravelling fungal immunity through primary immune deficiencies. [Curr Opin Microbiol](#), v.15, n.4, Aug, p.420-6. 2012.
- Lopez-Isac, E., L. Bossini-Castillo, *et al.* Identification of IL12RB1 as a novel systemic sclerosis susceptibility locus. [Arthritis Rheumatol](#), v.66, n.12, Dec, p.3521-3. 2014.
- Louvain De Souza, T., R. C. S. C. Fernandes, *et al.* Health Effects of a Homozygous IL12RB1 Trp7Ter Loss-of-Function Genotype in Four Brazilian Children With Paradoxical Receptor Cell-Surface Expression. (Artigo submetido). [Clin Infect Dis](#). 2016.
- Luangwedchakarn, V., O. Jirapongsaranuruk, *et al.* A novel mutation of the IL12RB1 gene in a child with nocardiosis, recurrent salmonellosis and neurofibromatosis type I: first case report from Thailand. [Asian Pac J Allergy Immunol](#), v.27, n.2-3, Jun-Sep, p.161-5. 2009.
- Lynch, M., A. O'loughlin, *et al.* BCGitis in a patient with transient hypogammaglobulinemia of infancy. [Pediatr Dermatol](#), v.31, n.6, Nov-Dec, p.750-1. 2012.
- Ma, C. S., D. T. Avery, *et al.* Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. [Blood](#), v.119, n.17, Apr 26, p.3997-4008. 2012.
- Miro, F., C. Nobile, *et al.* T cell-dependent activation of dendritic cells requires IL-12 and IFN-gamma signaling in T cells. [J Immunol](#), v.177, n.6, Sep 15, p.3625-34. 2006.
- Moraes-Vasconcelos, D., A. S. Grumach, *et al.* Paracoccidioides brasiliensis disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. [Clin Infect Dis](#), v.41, n.4, Aug 15, p.e31-7. 2005.
- Narasimhan, V. M., K. A. Hunt, *et al.* Health and population effects of rare gene knockouts in adult humans with related parents. [Science](#), v.352, n.6284, Apr 22, p.474-7. 2016.
- Norouzi, S., A. Aghamohammadi, *et al.* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) complications associated with primary immunodeficiency diseases. [J Infect](#), v.64, n.6, Jun, p.543-54. 2012.

- Palamaro, L., G. Giardino, *et al.* Interleukin 12 receptor deficiency in a child with recurrent bronchopneumonia and very high IgE levels. Ital J Pediatr, v.38, p.46. 2012.
- Park, H. Y., Y. S. Kwon, *et al.* Interleukin-12 receptor beta1 polymorphisms and nontuberculous mycobacterial lung diseases. Lung, v.186, n.4, Jul-Aug, p.241-5. 2008.
- Presky, D. H., H. Yang, *et al.* A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.24, Nov 26, p.14002-7. 1996.
- Puthanakit, T., P. Oberdorfer, *et al.* Immune reconstitution syndrome due to bacillus Calmette-Guerin after initiation of antiretroviral therapy in children with HIV infection. Clin Infect Dis, v.41, n.7, Oct 1, p.1049-52. 2005.
- Ramirez-Alejo, N., L. Blancas-Galicia, *et al.* Molecular analysis for patients with IL-12 receptor beta1 deficiency. Clin Genet, v.86, n.2, Aug, p.161-6. 2013.
- Richards, S., N. Aziz, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med, v.17, n.5, May, p.405-24. 2015.
- Richardson, M. P., M. J. Ayliffe, *et al.* A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. J Immunol Methods, v.219, n.1-2, Oct 1, p.187-93. 1998.
- Sakai, T., M. Matsuoka, *et al.* Missense mutation of the interleukin-12 receptor beta1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against Mycobacterium avium complex infection. Blood, v.97, n.9, May 1, p.2688-94. 2001.
- Sanal, O., G. Morgan, *et al.* Isolated cutaneous response to granulocyte-monocyte colony stimulating factor in fatal idiopathic disseminated Bacillus-Calmette-Guerin infection. Eur J Pediatr, v.159, n.3, Mar, p.149-52. 2000.
- Saúde, M. D. 12 Sinais de Alerta para Imunodeficiências primárias no 1º ano de vida. Brasília. 2013 2013.
- Schejbel, L., E. M. Rasmussen, *et al.* Combined IL-12 receptor and IgA deficiency in an adult man intestinally infested by an unknown, non-cultivable mycobacterium. Scand J Immunol, v.74, n.6, Dec, p.548-53. 2011.
- Schepers, K., L. Schandene, *et al.* IL-12Rbeta1 deficiency and disseminated Mycobacterium tuberculosis disease. J Clin Immunol, v.33, n.8, Nov, p.1285-8. 2013.
- Scheuerman, O., L. De Beaucoudrey, *et al.* Mycobacterial disease in a child with surface-expressed non-functional interleukin-12Rbeta1 chains. Isr Med Assoc J, v.9, n.7, Jul, p.560-1. 2007.

Schmitt, N., J. Bustamante, *et al.* IL-12 receptor beta1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. Blood, v.121, n.17, Apr 25, p.3375-85. 2013.

Sherry, S. T., M. H. Ward, *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res, v.29, n.1, Jan 1, p.308-11. 2001.

Song, W., S. A. Gardner, *et al.* Exploring the landscape of pathogenic genetic variation in the ExAC population database: insights of relevance to variant classification. Genet Med, Dec 17. 2015.

Stephens, M. e P. Donnelly. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. Am J Hum Genet, v.73, n.5, Nov, p.1162-9. 2003.

Sugimoto, N., M. Nakahira, *et al.* Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN-gamma production induced by IL-12 alone or together with IL-18. Eur J Immunol, v.33, n.1, Jan, p.243-51. 2003.

Sulem, P., H. Helgason, *et al.* Identification of a large set of rare complete human knockouts. Nat Genet, v.47, n.5, May, p.448-52. 2015.

Teo, S. S., N. Smeulders, *et al.* BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis. Vaccine, v.23, n.20, Apr 8, p.2676-9. 2005.

Tuerlinckx, D., C. Vermylen, *et al.* Disseminated Mycobacterium avium infection in a child with decreased tumour necrosis factor production. Eur J Pediatr, v.156, n.3, Mar, p.204-6. 1997.

Van De Vosse, E., M. H. Haverkamp, *et al.* IL-12Rbeta1 deficiency: mutation update and description of the IL12RB1 variation database. Hum Mutat, v.34, n.10, Oct, p.1329-39. 2013.

Van De Vosse, E., T. H. Ottenhoff, *et al.* Mycobacterium bovis BCG-itis and cervical lymphadenitis due to Salmonella enteritidis in a patient with complete interleukin-12/-23 receptor beta1 deficiency. Infection, v.38, n.2, Apr, p.128-30. 2010.

Van De Vosse, E., J. T. Van Dissel, *et al.* The R156H variation in IL-12Rbeta1 is not a mutation. Ital J Pediatr, v.39, p.12. 2013.

Vinh, D. C., B. Schwartz, *et al.* Interleukin-12 receptor beta1 deficiency predisposing to disseminated Coccidioidomycosis. Clin Infect Dis, v.52, n.4, Feb 15, p.e99-e102. 2011.

Vowells, S. J., S. Sekhsaria, *et al.* Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. J Immunol Methods, v.178, n.1, Jan 13, p.89-97. 1995.

Yancoski, J., C. Rocco, *et al.* A 475 years-old founder effect involving IL12RB1: a highly prevalent mutation conferring Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases in European descendants. Infect Genet Evol, v.9, n.4, Jul, p.574-80. 2009.

Yu, H. R., R. F. Chen, *et al.* IL-12-independent Th1 polarization in human mononuclear cells infected with varicella-zoster virus. Eur J Immunol, v.35, n.12, Dec, p.3664-72. 2005.

Apêndice A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nós, **ENRIQUE MEDINA-ACOSTA**, responsável pela pesquisa; **REGINA CÉLIA DE SOUZA CAMPOS FERNANDES**, responsável clínica e **THAIS LOUVAIN DE SOUZA**, bióloga, estamos fazendo um convite para você autorize o seu filho ou responsável legal participar como voluntário (a) da pesquisa: “Investigação das bases moleculares e genéticas da reação adversa severa à vacina BCG no contexto da Doença Granulomatosa Crônica e da Doença de Suscetibilidade Mendeliana às Micobactérias”. Esse projeto tem a previsão de participação de 30 pacientes que tiveram pelo menos um episódio de reação à vacina BCG. Esses pacientes serão assistidos no Ambulatório de Pediatria do Hospital Plantadores de Cana de Campos dos Goytacazes, RJ, com acompanhamento clínico pela médica Profa. Dra. **REGINA CÉLIA DE SOUZA CAMPOS FERNANDES**.

Esta pesquisa é uma investigação médica e genética em voluntários, que apresentam ou apresentaram alguma reação forte, adversa, à vacina BCG. Entende-se por reação adversa uma grande resposta inflamatória, prejudicial, induzida pela vacina. Nessa investigação, lhe pediremos autorização, como responsável legal pela criança, para primeiro fazermos um levantamento do histórico clínico da criança mediante entrevista verbal. Perguntaremos, por exemplo, se na criança houve uma reação forte à vacina BCG; se houve ou não tratamento; qual foi o tratamento; se a reação voltou a ocorrer e como foi tratada; se a criança teve outras infecções, quais e como foram tratadas; se o mesmo tipo de infecção já ocorreu em parentes; se a criança ou algum parente já foi diagnosticado com alguma doença autoimune em que a resposta imune passa atacar componentes do próprio corpo. Caso houver registro histórico de reação à vacina BCG, lhe solicitaremos também autorização para coletar da criança 5 mL (uma colher de chá) de sangue venoso. A amostra de sangue será utilizada para avaliar laboratorialmente alguns componentes da resposta imune, pois pretendemos investigar as causas moleculares e genéticas da reação à vacina BCG observada na criança. Especificamente, investigaremos duas possibilidades de diagnóstico: Doença Granulomatosa Crônica (um tipo de imunodeficiência herdável que compromete a produção de radicais livres pelas células brancas denominadas neutrófilos) e Doença de Suscetibilidade

Rubrica participante: _____

Rubrica Pesquisador: _____

Mendeliana às Micobactérias (um tipo de imunodeficiência herdável no qual os pacientes são muito suscetíveis às infecções por micobactérias, Salmonelas e fungos).

A amostra de sangue será coletada por punção venosa, em um tubo contendo anticoagulante heparina. Com essa amostra de sangue os seguintes testes serão realizados: (a) Dihidrorodamina: para determinar a funcionalidade dos neutrófilos por quantificação de radicais livres (espécies reativas de oxigênio); (b) quantificação dos leucócitos extraídos do seu sangue e após a cultura dessas células; c) quantificação de algumas proteínas que os leucócitos liberam quando cultivados; (c) sequenciamento de DNA para identificar alterações na sequência do DNA.

Uma pequeníssima parte (1 micrograma) do DNA das células do sangue da criança poderá ser enviada ao exterior, sem a identificação da criança (amostra anonimizada por codificação), para sequenciamento mais profundo (análise exoma) pela empresa BGI Américas, subsidiária da BGI-Shenzhen Beijing Genomics Institute /Instituto de Genômica de Pequim, no Laboratório localizado em Tai Po, Hong Kong. Após a análise, essa parte de DNA será descartada, sem possibilidade de seu armazenamento no exterior.

A maior parte do DNA da amostra de sangue da criança será armazenada no nosso laboratório (Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Hospital Escola Álvaro Alvim) por até 10 anos na forma de Biorrepositório (freezer -20C) para utilização neste projeto e eventualmente em outros projetos relacionados ao tema. Para o eventual uso em outra pesquisa esta deverá ser aprovada pela CEP e será necessário que você assine um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para o qual você deverá ser contatado (a) a fim de conceder ou não autorização para esse novo fim. Após os 10 anos de armazenamento, caso não se deseje manter o Biorrepositório por período maior, esse será transferido formalmente para outro Biorrepositório de outra instituição, mediante autorização sua e aprovação dos respectivos Comitês de Ética das instituições envolvidas, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia dos sujeitos da pesquisa. Você será informado caso ocorra a perda ou destruição do DNA da criança, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso. Você também pode retirar a qualquer momento as amostras de DNA mantidas no biorrepositório, para isso você deve se manifestar por escrito e assinar.

Rubrica participante:_____

Rubrica Pesquisador:_____

Cabe esclarecer que a coleta da amostra de sangue pode acarretar formação de pequeno edema (roxão) na área da punção na criança. Em caso raríssimo, por manejo inadequado da amostra, haverá necessidade de recoleta.

Cabe também esclarecer que existe o diagnóstico clínico para as duas doenças objetos desta pesquisa. Entretanto, para uma maior confiabilidade do diagnóstico este deve ser confirmado pelos testes acima descritos para aprimorar o acompanhamento clínico especializado. O principal benefício esperado para a criança será o diagnóstico de algum tipo de imunodeficiência herdável que o torna suscetível à reação adversa à vacina BCG. Com esse diagnóstico a criança poderá usufruir de acompanhamento clínico especializado; uso de antibiótico profilático bem como encaminhamento para serviços disponibilizados pelo SUS como transplante de medula óssea e tratamento com IFN- γ em infecções graves caso necessário, além do aconselhamento genético para a família. De forma coletiva, a participação da criança auxilia na determinação da frequência de ocorrência da reação adversa à vacina BCG na Região Norte Fluminense.

Esse documento foi impresso e duas vias. Você tem garantido o direito de receber uma via assinada desse termo de consentimento livre e esclarecido.

Você terá tempo para refletir, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas, inclusive outros profissionais de saúde, que possam ajudá-lo(a) na tomada de decisão livre e esclarecida sobre a inclusão e participação da criança nesta pesquisa. Caso aceite, você poderá cancelar a sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou constrangimento. Igualmente, você pode requerer, a qualquer momento, a retirada da amostra de DNA do sangue da criança armazenada em Biorrepositório.

Você e a criança terão garantido pelo projeto o ressarcimento de gastos com transporte e alimentação nos dias em que for requerida sua presença no laboratório.

Durante todo o período da pesquisa você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato, com algum de nós ou com o Conselho de Ética em Pesquisa. Você e/ou o médico da criança podem receber os resultados dos

Rubrica participante:_____

Rubrica Pesquisador:_____

exames realizados sempre que solicitarem. Para isso, você ou o médico devem entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Enrique Medina-Acosta.

Apesar dos baixos riscos desta pesquisa, a criança terá assistência integral gratuita e pelo tempo que for necessário, bem como indenização, em caso de prejuízos decorrentes de sua participação no estudo. O pesquisador responsável deverá ser contatado nessa eventualidade.

A amostra de sangue, o DNA extraído dele e os dados da criança serão anonimizados por codificação. Acesso à amostra, aos dados e aos códigos será restrito aos responsáveis da pesquisa para minimizar os riscos de quebra de sigilo. Os dados da criança serão confidenciais e assim não haverá qualquer possibilidade de discriminação ou estigmatização, individual ou coletiva. Os resultados da pesquisa serão divulgados apenas em eventos ou publicações científicas, sendo assegurado o sigilo sobre a participação nominal da criança. Não haverá uso comercial ou geração de patente relacionado à amostra biológica e aos dados da criança.

Os resultados das análises relativas à amostra de sangue coletada da criança serão disponibilizados na forma de Relatório Técnico (laudo) em duas vias: Uma para você e outra para o médico da criança. Cabe esclarecer que você poderá recusar, a qualquer momento, saber do resultado das análises.

No recebimento do laudo, disponibilizaremos gratuitamente aconselhamento genético, realizado de forma conjunta pela bióloga Thais Louvain de Souza CRBio 102052 e a pediatra, médica infectologista Dra. Regina Célia de Souza Campos Fernandes CRM 52.21057-1, no laboratório Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, localizado à Rua Barão Lagoa Dourada, 709, bairro Pelinca, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Caso nenhuma das duas imunodeficiências primárias objetos deste estudo seja diagnosticada, a criança receberá a liberação do acompanhamento clínico especializado. Entretanto, se a Doença Granulomatosa Crônica ou a Doença de Suscetibilidade Mendeliana para Micobactérias for diagnosticada, a criança será encaminhada para acompanhamento clínico especializado com a Dra. Regina Célia de Souza Campos Fernandes CRM 52.21057-1 no ambulatório da pediatria no Hospital Plantadores de Cana,

Rubrica participante:_____

Rubrica Pesquisador:_____

localizado no endereço Avenida José Alves de Azevedo, 337, bairro Parque Rosário, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Sobre o CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, visando a salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do sujeito da pesquisa que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos dessa pesquisa. Você pode entrar em contato com o CEP no endereço e telefone no quadro “DADOS DOS RESPONSÁVEIS TÉCNICOS DA PESQUISA”.

Rubrica participante:_____

Rubrica Pesquisador:_____

Autorização:

Eu _____, responsável legal de _____ após a leitura (ou a escuta da leitura) do conteúdo deste documento e ter tido plena oportunidade de conversar com o pesquisador para esclarecer todas as minhas dúvidas, declaro estar suficientemente informado(a), ficando claro para mim que a participação nesta pesquisa da criança sob a minha responsabilidade é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais a criança será submetida e dos testes que serão feitos na amostra de sangue dela a ser coletada, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Declaro não ter nenhum tipo de interesse econômico, em qualquer época, sobre os possíveis resultados alcançados durante as etapas subsequentes do andamento deste estudo, deixando claro ser o meu interesse particular somente o de colaborador(a) anônimo(a). Diante do exposto, expresso minha concordância de espontânea vontade em participar desta pesquisa.

Desejo ter acesso a todos os resultados das análises realizadas com a amostra biológica coletada.

SIM NÃO

Autorizo me informar sobre alterações na sequência de DNA incidentalmente encontradas provenientes do resultado da análise exoma na amostra coletada.

SIM NÃO

Assinatura do (a) representante legal

Declaro que obtive de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do representante legal da criança para a participação neste estudo.

PESQUISADOR

76/8

Rubrica participante: _____

Rubrica Pesquisador: _____

DADOS DOS RESPONSÁVEIS TÉCNICOS DA PESQUISA:
Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta
Função: Responsável pelo projeto de pesquisa.
Endereço: Rua Barão Lagoa Dourada, 709. Pelinca. Campos dos Goytacazes/RJ. Telefone: (22) 2726-6758 Segunda-feira as sextas-feiras das 08:00 às 12:00. Endereço eletrônico: quique@uenf.br
Profa. Dra. Regina Célia de Souza Campos Fernandes
Função: Coleta do histórico clínico, aconselhamento e acompanhamento.
Endereço: Rua Barão Lagoa Dourada, 709. Pelinca. Campos dos Goytacazes/RJ. Telefone: (22) 2726-6758 Quinta-feira das 08:00 às 12:00. Endereço eletrônico: reg.fernandes@bol.com.br
Thais Louvain de Souza
Aconselhamento genético, processamento do sangue e análise.
Endereço: Rua Barão Lagoa Dourada, 709. Pelinca. Campos dos Goytacazes/RJ. Telefone: (22) 2726-6758. Segunda-feira as sextas-feiras das 08:00 às 12:00. Endereço eletrônico: thaislsouza@gmail.com
Dados do CEP: Faculdade de Medicina de Campos/Fundação Benedito Pereira
Endereço: Avenida Dr. Alberto Torres, 217 Telefone: (22) 2101-2948 Segunda-feira as sextas-feiras das 08:00 às 12:00. Endereço eletrônico: cepfmc@fmc.br

Rubrica participante: _____

Rubrica Pesquisador: _____

rs845381SNP	ttgggattataggcgtgagc	cctgggcaacgtagagagac	30pb	ttttaaagtgctgggattacaggtgtgag
rs3833286SNP	tggacccaataaaccagag	acgccagaacaggtaaatgg	35pb	Ttttttttctgttgccaccatcctgcggggg
rs3746190SNP	gggagaaacgaaaacatcca	tgggtccaaatgtgactcct	45pb	tttttttttttttttctcagagaggggtgagtgactcgcc

Amplificação de exons de IL12RB1 - cDNA

SNPs alvos	Iniciador -sentido	Iniciador anti-sentido	Tamanho pb	Marcação
IL12RB1rt-pcr	aaccagacgtggcacattcct	ccaatacatggtggcccgtt	90	
IL12RB2rt-pcr	cagcacatctccctttctgttttc	actttaaggcttgaagcctcacc	142	

Amplificação de exons de IL12RB1 - cDNA

SNPs alvos	Iniciador -sentido	Iniciador anti-sentido	Tamanho pb	Marcação
Exon1-2a	Gtctacctccccaacaggt	gcaaggagaaaagaccaacg	129pb	
Exon1-2b	Gtctacctccccaacaggt	ctggacagcaggaagaggaa	280pb	
Exon1-3	Gtctacctccccaacaggt	tgagtctgcatccggatag	347pb	
IL12RB1E789	aagttcttgagcaagtgga	gaggagatgacagccacgtt	306	FAM
IL12RB1E1617	agtggatcaaccagtgagac	cacctctctgagcctcaac	213	VIC
D19S18059572	tgaacctcgcaggtggcaga	tcgggcgagtcactcacct	2100	
IFNG realT	ctaattattcgtaactgacttga	acagttcagccatcacttgga	75	
IL10 realT	catcgatttctccctgtgaa	tcttgagcttattaaggcattc	74	
GAPDH	agatccctccaaaatcaagtg	ggcagagatgatgaccttt	130	
IL12RB1 curto	aacgtggctgtcatctcctc	gggatagcaacagccgttta	849	
IL12RB1 longo	agtggatcaaccagtgagac	tcattatcaccacccatt	692	

Apêndice C

PROTOCOLO DE PREENCHIMENTO "Plataforma integrada de investigação compreensiva das imunodeficiências primárias associadas aos efeitos adversos da vacinação com BCG e à infecção por micobactéria atípica na macrorregião Norte Noroeste Fluminense"

FACULDADE DE MEDICINA DE CAMPOS (FMC)
HOSPITAL ESCOLA ALVARO ALVIM (HEAA) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE (UENF)

DRa. Regina Célia de Souza Campos Fernandes » Email: reg.fernandes@bol.com.br.

» OBS: Para todas as variáveis não explicitadas utilizar: 1. Sim 2. Não 9. Ignorado.

» Em caso de dúvidas aperte F9 para visualizar opções possíveis.

•IDENTIFICAÇÃO:

registro	REGISTRO: ##### (numérico)
sexo	SEXO: # 1. Masculino 2. Feminino 9. Ignorado
nasc (dd/mm/aaaa)	DATA DE NASCIMENTO: <dd/mm/yyyy>
nome	NOME:
<hr/>	
cidade	CIDADE: ##
obito	OBITO #

•REAÇÃO ADVERSA À VACINA BCG

ocorbcg	Ocorrência de Reação Adversa à Vacina? #
ocortipo	Tipo #

•TIPO DE REAÇÃO ADVERSA À VACINA BCG

ulcer	Úlcera >1cm #
abcfr	Abscesso Cutâneo Frio #
abcqnt	Abscesso Cutâneo Quente #
linfadn	Linfadenopatia Regional não supurativa #
linfads	Linfadenopatia Regional supurativa #
queloi	Cicatriz quelóide #
reales	Reação lupóide #

•TRATAMENTO

1isoni	Isoniazida #
1rifa	Rifampicina #
3ire	Terapia tripla com Isoniazida, Rifampicina e Etambutol #

•RECIDIVA DE REAÇÃO ADVERSA À VACINA BCG

recbcg	Recidiva de Reação Adversa à Vacina? #
rectipo	Tipo de recidiva #

•TIPO DE RECIDIVA DE REAÇÃO ADVERSA À VACINA BCG

ulcerr	Úlcera >1cm #
abcfrr	Abscesso Cutâneo Frio #
abcqnr	Abscesso Cutâneo Quente #
linfadnr	Linfadenopatia Regional não supurativa #
linfadsr	Linfadenopatia Regional supurativa #
queuloir	Cicatriz quelóide #
realesr	Reação lupóide #

•TRATAMENTO DE RECIDIVA

1isonir	Isoniazida #
1rifar	Rifampicina #
3irer	Terapia tripla com Isoniazida, Rifampicina e Etambutol #

•RESULTADO DOS EXAMES LABORATORIAIS

anemia	Anemia #
transsg	Necessidade de transfusão #
segment	Segmentados #
Linfoci	Linfócitos #
linfalt	Alterações no número de linfócitos #
monocitos	Monocitos #
monoalt	Alterações no número de monocitos #
eosinof	Eosinófilos #
eosinalt	Alteração no número de eosinófilos #
plaquet	Plaquetas #

hemossed	Hemossedimentação #
reumat	Fator Reumatóide #
fantnuc	Fator anti-nuclear #

•RESULTADO DOSAGEM DE ANTICORPOS

antot	Anticorpo total #
iga	IgA #
igg	IgG #
igm	IgM #
ige	IgE #
igd	IgD #

•HISTÓRICO CLINICO INFECCIOSO DO PACIENTE

micob	Micobacterioses atípicas #
tuber	Tuberculose #
tuberrec	Recidiva de tuberculose #
hansen	Hanseníase #
salmone	Salmonelose #
paracc	Paracoccidiodiomícoides #
histop	Histoplasmose #
candoral	Candidíase Oral #
candperi	Candidíase Perineal #
candlon	Candidíase por >2 meses #
cancron	Candidíase Crônica mucocutaneous #

nocard	Nocardiosis #
klebise	Klebsiellosis #
stahy	Staphylococcus aureus #
asperg	Aspergillus #
pneumo1	Pneumonia no 1 ano #
pneufreq	2 ou mais pneumonias no ultimo ano #
mening	Meningite #
otite	4 ou mais otites no ultimo ano #
septic	Septicemia #
Diarep	Diarreia repetição #
Diacro	Diarreia crônica #
Diagiar	Diarreia por Giardia #

•HISTÓRICO CLINICO INFECCIOSO FAMILIAR

tuberf	Tuberculose na família #
hansefa	Hanseníase na Família #
salmonfa	Salmonelose na Família #
paracfa	Paracoccidiomicoides na Família #
histofa	Histoplasmose na Família #
meninfa	Meningite na família #
septfa	Septicemia na família #

•HISTÓRICO CLINICO IMUNOLÓGICO DO PACIENTE

asma	Asma #
artrit	Osteoartrite #
diabt1	Diabetes tipo 1 #
les	Lupus Eritromatoso Sistêmico #
lupdisc	Lupus discóide #
dcrohn	Doença de Crohn #
esmul	Esclerose Multipla #
vitol	Vitiligo #
tirhash	Tireoidite de Hashimoto #
psori	Psoríase #
hepaaut	Hepatite autoimune #
guilain	Síndrome de Guillain Barré #
vascu	Vasculite #
anhemau	Anemia Hemolítica autoimune #
behcet	Doença de Behçet #
esderm	Esclerodermia #
celiac	Doença celíaca #
wegen	Granulomatose de Wegener #
Espondi	Espondilite anquilosante #

•HISTÓRICO CLINICO IMUNOLÓGICO FAMILIAR

artrifa	Osteoartrite na família #
---------	---------------------------

diabfa1	Diabetes tipo 1 na família #
lesfa	Lupus Eritromatoso Sistêmico na família #
lupdifa	Lupus discóide na família #
dcrohnfa	Doença de Crohn na família #

•IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR EX VIVO

dhr	Teste de Dihidrorodamina #
cd4	Linfócitos CD4+ #
cd8	Linfócitos CD8+ #
cd19	Linfócitos B CD19+ #
cd16	Células NK CD16+/CD56+ #
cd212	IL12RB1 #
cd119	IFNGR1 #
ifngr2	IFNGR2 #
stat1p	STAT1p #

•IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR IN VITRO

cd212iv	IL12RB1 #
cd119iv	IFNGR1 #
ifnr2iv	IFNGR2 #
stat1iv	STAT1p #
ifngiv	Produção de IFN-g #
il12iv	Produção de IL-12 #
il17aiv	Produção de IL17A #

•Diagnóstico Final

IDP	Tem Imunodeficiência Primária? #
rastreio	Diagnóstico final em andamento? #
dsmm	Doença Mendeliana de Suscetibilidade à Micobacterioses #
dgc	Doença Granulomatosa Crônica #
idpcs	Imunodeficiência Primária Combinada Severa #
omenn	Síndrome de Omenn #
digeor	Síndrome de DiGeorge #
reduct	Outras reduções de linfócitos T #
hiperig	Síndrome de Hiper-IgE #
icv	Imunodeficiência Comum variável #
outrant	Outras imunodeficiência de Anticorpo #