STEFANIE GOMES KLAVER

**DEFEITOS GENÉTICO-MOLECULARES
E ASPECTOS CLÍNICOS DE PACIENTES
COM SÍNDROME DE HIPER IgM AUTOSSÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

STEFANIE GOMES KLAVER

**DEFEITOS GENÉTICO-MOLECULARES
E ASPECTOS CLÍNICOS DE PACIENTES
COM SÍNDROME DE HIPER IgM AUTOSSÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Versão original

São Paulo
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de setembro de 2006.

PARECER 740/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 68ª reunião, realizada em 13.09.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: **"Efeitos genéticos-moleculares e aspectos clínicos de pacientes com síndrome de Hiper IgM"**.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, com a recomendação de que conste no *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*, que o material poderá ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. () Sim – () Não.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
OTAVIO CABRAL MARQUES
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho...

...Ao meu pai, Nanne, engajado em toda sua sabedoria, forneceu-me as principais ferramentas que alicerçaram minha caminhada: a educação e o caráter.

...A minha mãe, Luzinete, que com ternura e garra impele-me a constante luta e superação das adversidades através da obstinação e da crença na veracidade de meus sonhos.

...A minha irmã Leticia, com quem constantemente aprendo e valorizo a importância do amor em família.

...Aos meus sogros, que com irreverência, carinho e compreensão, consolidaram a escadaria que elevou-me ao longo de minha trajetória pessoal e profissional.

...Dedico, finalmente, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu amado Eduardo...

... Por todo amor e compreensão.

... Por toda a dedicação, paciência e incentivo, principalmente no final desta etapa tão importante de minha vida.

... Pela companhia e carinho, que me faz ser uma pessoa completa e feliz.

... E principalmente por acreditar em mim, acreditar que tudo é possível.

Meu eterno agradecimento... Te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto, orientador desta dissertação, por me instruir, orientar, por acreditar na minha capacidade, por dar a oportunidade de desenvolver este trabalho e principalmente por continuar me acompanhando nesta jornada, estimulando meu interesse pelo conhecimento e pela pesquisa.

A Dra. Anne Durandy, por abrir as portas do seu laboratório e me propiciar a possibilidade de grande conhecimento profissional. Por ter acreditado no meu trabalho, por todo o seu empenho, sabedoria, compreensão e acima de tudo exigência.

Aos meus queridos amigos...

...Christina Arslanian e Silvana Lucchinni, pela amizade constante, carinho e por contribuírem com meu crescimento tanto pessoal quanto profissional.

...Ao casal Angela e Paulo, pelos conselhos, por serem sempre companheiros e por alegrarem os meus dias, tornando-os melhores.

...Aos amigos Edgar, Patrícia, Caru, Marília, Marina, Adriana, Walmir, Matheo, Otávio, Sara, Sandro e Danilo pela companhia, brincadeiras e principalmente pelos momentos maravilhosos que passamos juntos.

...Aos grandes amigos e “irmãos” Marília, Raquel, Guilherme, Mariana e Kênia, pela inesquecível convivência, a qual guardo eterno carinho e muita saudade.

...Aos que nunca estiveram ausentes, agradeço o tempo, apoio, amizade e o carinho que sempre me prestaram.

A Dra. Beatriz Carvalho, Dra. Fabíola Scancetti, Dr. Elie Mansur, Dra. Janáira Fernandes, Dr. Pêrsio Roxo e Dra. Simone Lima, pelo suporte na realização deste trabalho.

Aos companheiros pós-graduandos, pelo apoio, companheirismo e amizade.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Imunologia: Jotelma, Amarildo (*in memorian*), Amanda e Eni, pelo desempenho e dedicação em todos os momentos em que precisei.

À FAPESP, pela Bolsa de Mestrado e Auxílio concedido a este trabalho (processos 2006/57643-7 e 2008/55700-9).

Em suma, dedico, a todos que indubitavelmente contribuíram das mais sublimes formas para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, pois o futuro pertence a
quem se atreve... e a vida é muito para ser insignificante”.*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Klaver SG. Defeitos genético-moleculares e aspectos clínicos de pacientes com síndrome de hiper igm autossômica. [tese (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A síndrome de HIGM é uma imunodeficiência rara, caracterizada por níveis séricos normais ou elevados de IgM associados com baixos níveis de IgG, IgA e IgE. Neste estudo investigamos pacientes com HIGM autossômico recessivo. Seleccionamos 15 pacientes com diagnóstico clínico sugestivo de AR-HIGM, 10 do sexo feminino, 05 do sexo masculino, onde onze são brasileiros, um é francês e três são turcos, com idades que variam de 2 a 40 anos. Todos os pacientes apresentam infecções recorrentes: **100%** pneumonias, **80%** otites médias agudas, **53%** sinusites, **46%** amigdalites, **40%** diarreias **26%** infecções urinárias, **20%** estomatites, uma apresentou micobacteriose cutânea. Em **20%** dos pacientes houve infecções por patógenos oportunistas (*Mycobacterium marinum*, *Toxoplasma gondii*, *Varicela-zoster*, *Pseudomonas aeruginosa*, *levedura* e *Mycobacterium tuberculosis*). No momento do diagnóstico a média da concentração plasmática da IgG foi de 107,95 mg/dL (mínimo não detectado e máximo de 470), IgA foi 18,81 mg/dL (mínimo não detectado e máximo de 39) e a IgM foi 487,51 mg/dL (mínima de 34,1 e máxima de 1025). Pacientes do sexo masculino foram triados para deficiência do ligante do CD40. Investigamos também a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD19⁺CD40⁺ nos 11 pacientes brasileiros, por citometria de fluxo. Esta é uma técnica de triagem para deficiência de CD40, onde conseguimos identificar dois dos 15 pacientes estudados com expressão relativamente baixa da molécula CD40. Para realizar o diagnóstico genético nos pacientes brasileiros, verificamos a expressão dos genes *AICDA*, *UNG* e *CD40* por Real Time-PCR e RT-PCR, e confirmamos estes dados com sequenciamento genético. Como resultado do sequenciamento, encontramos dois tipos de mutações em 4 pacientes não consanguíneos. No gene *AICDA* encontramos as seguintes mutações: Pacientes EJ e GF, mutação *missense* na base 260 do cDNA, substituição essa que acarreta na mudança de um aminoácido (**c.260G>C**; **p. Cys87Ser**). Pacientes DA e RC apresentam defeito de *splice*, acarretando na deleção total do exon 4 do gene *AICDA* (**c.426_543delGATTATTTTTACTGCTGGAATACTTTTGTAGAAAACCGAAAGAACTTTCA AAGCCTGGGAAGGGCTGCATGAAAATTTCAGTTCGTCTCTCCAGACAGCTTCGGCGCATCC TTTT**). Os pacientes estrangeiros foram previamente estudados para os genes *AICDA*, *UNG* e *CD40*, e nenhuma alteração foi encontrada. Neste caso, estudamos o gene *INO80*, e encontramos nos exons 04 (**g.24012 G>A**) e 26 (**g.99976 G>T**) do gene *INO80*, duas mutações *missense* em heterozigose no DNAg do paciente OD. Uma vez que estes defeitos genético-moleculares resultam em características clínicas similares, o estudo molecular e genético é importante para a realização do diagnóstico diferencial, estratégia terapêutica e prognóstico dos casos. Por sua vez, o avanço do conhecimento sobre a fisiopatologia deste grupo de doenças permitiu redefinir a classificação e o entendimento de novos mecanismos imunopatológicos em humanos, além de identificar um novo grupo de patógenos causadores de morbidade em tais pacientes, como por exemplo, micobactérias.

Palavras-chave: Hiper IgM Autossômica. Imunodeficiência primária. *AICDA*. *UNG*. Molécula CD40. *INO80*.

ABSTRACT

Klaver SG. Molecular-genetic defects and clinical spectrum of autosomal hyper IgM syndrome in Brazilian patients. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo (Brazil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

HIGM syndrome is a rare immunodeficiency characterized by high or normal levels of serum IgM associated with low levels of IgG, IgA and IgE. In this study we investigated AR-HIGM cases. We selected 15 patients with clinical diagnosis suggestive of AR-HIGM, 10 females, 05 males, where 11 are Brazilian, one is French and three are Turkish, with ages ranging from 2 to 40 years. All patients had recurrent infections: 100% pneumonia, 80% acute otitis media, 53% sinusitis, 46% tonsillitis, 40% recurrent diarrhea, 26% urinary tract infections, 20% stomatitis, and one patient presented a cutaneous mycobacteriosis. 20% of the patients had opportunistic infections: *Mycobacterium marinum*, *Toxoplasma gondii*, varicella-zoster virus, *Pseudomonas aeruginosa*, fungus, and *Mycobacterium tuberculosis*. At diagnosis, the mean plasma concentration of IgG was 107.95 mg / dL (minimum not detected and maximum of 470), IgA was 18.81 mg / dL (minimum not detected and maximum of 39) and IgM was 487 mg/dL (34.1 Minimum and maximum of 1025). Male patients were screened for CD40 ligand deficiency. We also examined the percentage of CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD8⁺ and CD19⁺ CD40⁺ patients in 11 Brazilian patients by flow cytometry. This is a technique for screening for CD40 deficiency, where we could identify two out of 15 patients with a relatively low percentage of the CD40 molecule. To perform the genetic diagnosis in Brazilian patients, we investigated gene expression of *AICDA*, *UNG* and *CD40* genes by Real Time-PCR and RT-PCR, and confirmed these data with genome sequencing. As a result, we found two types of mutations in 4 different patients with no consanguinity. We found in *AICDA* gene the following mutations: Patients **EJ** and **GF** missense mutation in base 260 in cDNA, which results in a change of aminoacid (**c.260G> C; Cys87Ser p.**). Patients **DA** and **RC** showed a splice defect, resulting in a complete deletion of exon 4 in *AICDA* gene (**c.426_543delGATT ATTTTACTGCTGGAATACTTTGTAGAAAACCGAAAGAACTTTCAAAGCCTGGGAAGG GCTGCATGAAAATTCAGTTCGTCTCTCCAGACAGCTTCGGCGCATCCTTT**). All other patients were sequenced for *AICDA*, *UNG* and *CD40* genes, and no changes were found. In this case, we studied the *INO80* gene, and we found in exons 04 (**g.24012 G> A**) and 26 (**g.99976 G> T**) *INO80* gene, two heterozygous missense mutations in DNA of patient **OD**. Since these molecular genetic defects result in similar clinical features, molecular and genetic studies are important for the differential diagnosis, therapeutic strategy and prognosis of the cases. In turn, the advancement of knowledge about the pathophysiology of this disease group, allowed to redefine the classification of new immunopathological mechanisms in humans and identify a new group of pathogens causing morbidity in these patients, such as mycobacteria.

Keywords: Autosomal Hyper IgM Syndrome. Primary Immunodeficiency. *AICDA*. *UNG*. Molecule CD40. *INO80*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Troca de classe das Imunoglobulinas.....	20
FIGURA 2: Classificação das Imunodeficiências de acordo com os componentes do Sistema Imunológico	23
FIGURA 3: Representação esquemática da interação do CD40 e CD40L e dos defeitos moleculares na síndrome de HIGM....	27
FIGURA 4: Fluxograma.....	39
FIGURA 5: Porcentagem das manifestações clínicas mais comuns em pacientes com suspeita de deficiência das enzimas AID, UNG e molécula CD40....	44
FIGURA 6: Heredograma dos pacientes com AR-HIGM.....	45
FIGURA 7: Fenotipagem dos linfócitos CD3 ⁺ CD4 ⁺ de pacientes com suspeita HIGM..	64
FIGURA 8: Fenotipagem dos linfócitos CD3 ⁺ CD8 ⁺ de pacientes com deficiência nas enzimas AID, UNG e molécula CD40.....	66
FIGURA 9: Fenotipagem dos linfócitos CD19 ⁺ CD40 ⁺ de pacientes com deficiência nas enzimas AID, UNG e molécula CD40.....	69
FIGURA 10: Análise estrutural dos transcritos da <i>β-actina</i>	72
FIGURA 11: Análise genético-molecular da paciente AS.....	73
FIGURA 12: Análise genético-molecular do paciente DA	74
FIGURA 13: Análise genético-molecular do paciente EJ... ..	77
FIGURA 14: Análise genético-molecular da paciente GF.. ..	80
FIGURA 15: Análise genético-molecular da paciente IM... ..	82
FIGURA 16: Análise genético-molecular da paciente KM.. ..	83
FIGURA 17: Análise genético-molecular da paciente MC.....	84
FIGURA 18: Análise genético-molecular da paciente MV.. ..	85
FIGURA 19: Análise genético-molecular da paciente RC.. ..	87
FIGURA 20: Análise genético-molecular do paciente YE.....	88
FIGURA 21: A nálise genético molecular do gene CD40.	90
FIGURA 22: Análise genético molecular do gene <i>INO80</i>	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Porcentagem das mutações que causa defeito nas moléculas envolvidas no “ <i>Switch</i> ” de classes de imunoglobulinas.....	25
TABELA 2.1 - Características clínicas e imunológicas dos pacientes com fenótipo de AR- HIGM. Deficiência das enzimas AID, UNG e molécula CD40.	41
TABELA 2.2 - Características clínicas e imunológicas dos pacientes com fenótipo de AR- HIGM. Deficiência no complexo INO80.....	43
TABELA 3 - Relação dos pares de primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo-relativo..	51
TABELA 4 - Relação dos pares de primers utilizados na reação de PCR em tempo real	53
TABELA 5 - Anticorpos utilizados na fenotipagem dos linfócitos.....	54
TABELA 6.1 - Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene <i>AICDA</i>	56
TABELA 6.2 - Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene <i>UNG</i>	57
TABELA 6.3 - Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene <i>CD40</i>	57
TABELA 7 - Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene <i>INO80</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AID	Citidina desanimase induzida por ativação;
APE1	AP endonuclease 1;
APOBEC-1	Do inglês “apoliprotein B mRNA editing catalytic polipeptide 1”;
AR-HIGM	Síndrome de Hiper IgM Autossômica Recessiva;
C	Região constante;
C4BP	proteína ligante do C4b;
CG	Centro germinativo;
CD	Do Inglês “cluster of differentiation”;
cDNA	DNA complementar;
CRS	Recombinação somática;
DNA	Ácido desoxirribonucleico;
EDA-ID	Displasia ectodérmica anidróica com imunodeficiência;
Forward	Amplificação no sentido 5'-3';
FSC-H	Do inglês “forward scatter”;
gDNA	DNA genômico;
HIGM	Síndrome de Hiper IgM;
HSCT	Célula tronco hematopoiética;
IDP	Imunodeficiência primária;
Ig	Imunoglobulina;
IKK	Do Inglês “I κ B quinase”;
IL	Interleucina;
ITU	Infecção do trato urinário;
IVIG	Infusão de gamaglobulina intravenosa;
LPS	Lipopolissacarídeo;
MBD4	Do ingles “Methyl-CpG-binding domain protein 4”;
NEMO	Do Inglês “NF- κ B essential modulator”;
NES	Do inglês “Nuclear export signal”.
NLS	Do inglês “Nuclear localization signal”;
Pb	Pares de bases;
PCR	Reação em cadeia da polimerase;
Pt	Paciente;
Regiões S	Regiões de “switch”;
Reverse	Amplificação no sentido 3'-5';
RNA	Ácido ribonucleico;

RT	Reverse transcriptase;
SHM	Hipermutação somática;
SMUG1	Do inglês "Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase";
SSC-H	Do inglês "side scatter";
T.A.	Temperatura de anelamento.
TD	Timo dependente;
TDG	Do inglês "Thymine DNA glycosylase";
TI	Timo independente;
TNF	Fator de Necrose tumoral;
TRAF	Do Inglês "TNF receptor-associated factor";
TRI	Trato respiratório superior;
TRS	Trato respiratório superior;
Ugi	Inibidor da enzima UNG;
UNG	Uracil-DNA glicosilase;
V	Região variável;
Ácido aspártico	Asp;
Ácido glutâmico	Glu;
Alanina	Ala;
Cisteína	Cys;
Fenilalanina	Phe;
Glicina	Gly;
Leucina	Leu;
Lisina	Lys;
Metionina	Met;
Serina	Ser;
Tirosina	Tyr;
Valina	Val;
Adenina	A;
Citosina	C;
Guanina	G;
Timina	T.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Imunidade humoral dependente de linfócitos T	18
1.2	Imunodeficiências primárias	21
1.3	Síndrome de Hiper IgM	24
1.4	Defeitos genético-moleculares	25
1.5	Molécula CD40L	28
1.6	Molécula CD40	29
1.7	Citidina Desaminase Induzida por Ativação (AID)	30
1.8	Uracil-DNA glicosilase (UNG)	33
1.9	Complexo INO80	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Avaliação clínica dos pacientes com AR-HIGM	38
3.1.1	<i>Critérios de inclusão</i>	38
3.1.2	<i>Heredograma das famílias estudadas</i>	44
3.2	Protocolo para a análise genético-molecular	47
3.2.1	<i>Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)</i>	47
3.2.2	<i>Ativação dos Linfócitos B</i>	47
3.2.3	<i>Extração do RNA total</i>	48
3.2.4	<i>Reação de transcrição reversa</i>	49
3.2.5	<i>Análise por RT-PCR</i>	49
3.2.6	<i>Reação de PCR em Tempo Real</i>	52
3.2.7	<i>Extração do DNAg</i>	54
3.2.8	<i>Amplificações dos exons dos genes AICDA, UNG e CD40</i>	55
3.2.9	<i>Amplificação do gene INO80</i>	58
3.2.10	<i>Purificação dos produtos de PCR</i>	61
3.2.11	<i>Reações de Sequenciamento</i>	61
3.2.12	<i>Análise estatística</i>	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	Fenotipagem dos linfócitos	64
4.1.1	<i>Fenotipagem dos linfócitos CD3⁺CD4⁺</i>	64
4.1.2	<i>Fenotipagem dos linfócitos CD3⁺CD8⁺</i>	66
4.1.3	<i>Fenotipagem dos linfócitos CD19⁺CD40⁺</i>	68
4.2	Análise genético-molecular	70

4.2.1	<i>Estudo genético-molecular dos genes AICDA e UNG</i>	71
4.2.1.1	<i>Paciente AS</i>	73
4.2.1.2	<i>Paciente DA</i>	74
4.2.1.3	<i>Paciente EJ</i>	76
4.2.1.4	<i>Paciente GF</i>	79
4.2.1.5	<i>Paciente IM</i>	82
4.2.1.6	<i>Paciente KM</i>	83
4.2.1.7	<i>Paciente MC</i>	84
4.2.1.8	<i>Paciente MV</i>	85
4.2.1.9	<i>Paciente RC</i>	86
4.2.1.10	<i>Paciente YE</i>	88
4.2.2	<i>Estudo genético-molecular do gene CD40</i>	89
4.2.3	<i>Estudo genético-molecular do gene INO80</i>	91
5	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS*	95
	ANEXOS	105
	ANEXO A – Estudo de Pacientes com Suspeita de Imunodeficiência	105
	Primária	105
	ANEXO B.1 – Termo de Consentimento livre e esclarecido (maiores de 18 anos) .	107
	ANEXO B.2 – Termo de Consentimento livre e esclarecido (menores de 18 anos)	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imunidade humoral dependente de linfócitos T

Após seu amadurecimento na medula óssea, os linfócitos B virgens, migram para os órgãos linfóides periféricos, onde produzem anticorpos de diferentes classes de forma timo-dependente (TD) ou timo-independente (TI) (Liu et al., 1989; Berek et al., 1991; Kuppers et al., 1993; Rajewsky et al., 1996; Jabara et al., 2001).

A interação CD40-CD40L auxilia a expansão clonal dos linfócitos B, inibindo sua apoptose nos centros germinativos (Holder et al., 1992; Stavnezer, 1996; Snapper et al., 1997), aumentando a expressão das moléculas de adesão (Barret et al., 1991; Stout e Suttles, 1996) e de moléculas co-estimuladoras CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2).

Quando os linfócitos T auxiliares CD4⁺ ativados se ligam aos linfócitos B, a interação CD40L-CD40 induz a associação de proteínas citosólicas denominadas fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs), ao domínio citoplasmático do CD40 (Hu et al., 1994). Os TRAFs recrutados para o CD40 iniciam cascatas enzimáticas que resultam na translocação do fator nuclear κ B (NF- κ B) para o núcleo do linfócito B. O NF- κ B está presente no citoplasma do linfócito associado aos inibidores do κ B (I κ Bs), que bloqueiam a entrada do NF- κ B no núcleo. Após a ativação celular ocorre a fosforilação dos I κ Bs, por um complexo enzimático conhecido como I κ B cinases (IKK), que possui uma subunidade reguladora conhecida como inibidor do κ B cinase γ (IKK- γ) ou modulador essencial do fator nuclear κ B (NEMO) (Israel et al., 2000). Em seguida ocorre a ubiquitinação dos I κ Bs e consequente degradação desses inibidores no proteassomo, permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo do linfócito B (Berberich et al., 1994; Ghosh et al., 1994; Maniatis et al., 1999). Esses eventos resultam na ativação dos linfócitos B, que se proliferam e formam os centros germinativos (GC). Nesta região as células B sofrem “Switch” de classes (CSR) onde múltiplos genes da região variável (V) recombina-se com os seguimentos J e D; e hipermutações somáticas (SHM), que correspondem a mutações pontuais ao longo de toda região variável da cadeia leve e pesada de imunoglobulinas (Durandy et al., 2005).

Nas respostas primárias de anticorpos os produtos codificados pelos segmentos VDJ, são reunidos à cadeia pesada μ , codificada pelo segmento $C\mu$, para a síntese da IgM. O segmento $C\mu$ é ativado por um promotor localizado após os segmentos VDJ, denominado $E\mu$. Durante a troca de classe de imunoglobulinas, o segmento $C\mu$ e o $C\delta$ são deletados e o linfócito B passa a expressar diferentes segmentos ($C\gamma$, $C\alpha$ ou $C\epsilon$) que codificam regiões constantes das cadeias pesadas das imunoglobulinas IgG, IgA ou IgE, respectivamente (Honjo et al., 2000; Manis et al., 2002). Cada segmento constante é precedido por sequências de DNA especializadas, denominadas regiões de “switch” (S). Após a ativação do linfócito B pela interação CD40-CD40L e por citocinas, a sequência de DNA localizada entre duas diferentes regiões S é deletada e os segmentos VDJ são justapostos a um dos diferentes genes C (Rothman et al., 1989; Stavnezer, 2000) efetivando a troca de classe da imunoglobulina. Ao final deste processo, é produzida uma imunoglobulina com diferente região constante da cadeia pesada, porém com os mesmos segmentos VDJ. SHM introduz mutações *missense* e muito raramente deleções ou inserções dentro das regiões V das imunoglobulinas, levando a expressão de BCR com alta afinidade pelos antígenos. O processo de SHM ocorre também em três etapas; com início da transcrição do DNA alvo seguido de clivagem do DNA e reparo do DNA que sofreu SHM (**FIGURA 1**) (Durandy et al., 2005).

Durante a CSR e SHM as enzimas Citidina desaminase induzida por ativação (AID) e a Uracil-DNA Glycosylase (UNG) são cruciais para a realização destes processos (Cunningham-Rundles e Ponda, 2005). Embora seja desconhecido o processo através do qual a AID e a UNG medeiam CSR e SHM (Durandy et al., 2005), defeitos na síntese destas proteínas trazem prejuízo para a CSR e SHM (Revy et al., 2000). A expressão da AID é limitada aos centros germinativos, e induz a ativação das células B *in vitro* na presença de LPS ou CD40L solúvel em combinação com a interleucina 4 (IL-4) (Revy et al., 2000). Embora o mecanismo de CSR e mutações somáticas não sejam bem compreendidos (Revy et al., 2000), eventuais falhas no CSR em células B deficientes de AID e de UNG parecem ocorrer antes da clivagem da região S (Imai et al., 2003b).

FIGURA 1. Troca de classe das Imunoglobulinas. (A) Nas respostas primárias de linfócitos B os produtos codificados pelos segmentos gênicos VDJ são ligados ao gene C μ para que ocorra a síntese da IgM. A transcrição desta região inicia-se após ativação do promotor denominado E μ . Após a ativação do linfócito B o DNA entre duas diferentes regiões S é deletado e os segmentos VDJ são justapostos com um dos diferentes gene C. Este evento de recombinação é mediado pela AID e pela UNG. Ao final deste processo uma imunoglobulina com diferente região constante da cadeia pesada, porém com os mesmos segmentos VDJ é produzida. O papel da AID e da UNG na troca de classe de imunoglobulina está representado ao final da figura. C, citosina, G, guanina, U, uracila; AID, Citidina desaminase induzida pela ativação; UNG, Uracil-DNA glicosilase; Regiões S, regiões de "switch" (S)

Fonte: Adaptado de Edry e Melamed 2007; Notarangelo et al., 2006.

A importância da interação CD40-CD40L para a troca de classe de imunoglobulina foi definitivamente determinada, quando estudiosos demonstraram que mutações no gene CD40L (*CD40LG*) são responsáveis por falhas na troca de classe do isótipo de IgM para os demais isótipos IgG, IgA e IgE (Aruffo et al., 1993; Korthauer et al., 1993; Di Santo et al., 1993; Allen et al., 1993; Fuleihan et al., 1993).

A troca de classe das imunoglobulinas também pode ocorrer na ausência da interação CD40L-CD40 e de centro germinativo. Quantidades significativas de IgA e IgE estão presentes no soro de alguns pacientes deficientes de CD40L, AID, UNG e CD40 (Life et al., 1994) e alguns mecanismos que geram a troca de classes T independentes já foram determinados. Glicoproteínas virais e polissacarídeos bacterianos podem estimular os linfócitos B a produzirem IgG e IgA na ausência de CD40L (Mond et al., 1995; Vos et al., 2000; Szomolanyi et al., 2001).

Na zona marginal (MZ) do baço ou na lâmina própria intestinal, o estimulador do linfócito B (BlyS), expresso na superfície dos linfócitos B e o fator de ativação de célula B (BAFF), expresso na superfície das células dendríticas ativadas, interagem, resultando na troca de classe de anticorpos T-independentes (Litinskiy et al., 2002).

A proteína ligante do C4b (C4PB), um componente regulatório da via clássica do complemento, pode ligar-se diretamente ao domínio extracelular do CD40 nos linfócitos B humanos num sítio que difere do CD40L (Brodeur et al., 2003) e induzir a proliferação dos linfócitos B, a expressão das moléculas co-estimulatórias B7 e em sinergismo com a IL-4 induzir a troca de classe de IgM para IgE. Além disso, foi demonstrado que o C4PB colocaliza-se com os linfócitos B nas amígdalas humanas. Estes dados são muito interessantes, pois sugerem uma nova interface entre o sistema complemento e ativação dos linfócitos B.

1.2 Imunodeficiências primárias

As imunodeficiências são o resultado da ausência e/ou deficiência de moléculas e/ou células que compõem o sistema imune, podendo envolver elementos da imunidade inata como os fagócitos mononucleares, polimorfonucleares, células NK e proteínas do sistema complemento, ou da imunidade específica, como os linfócitos T e B.

Quanto a sua origem, as imunodeficiências podem ser classificadas em congênitas ou primárias e adquiridas ou secundárias (Rosen et al., 1995), podendo levar ao surgimento de infecções e, com menos frequência, desenvolvimento de tumores, enfermidades autoimunes, alergias e alterações endócrinas e neuropsiquiátricas (Mueller e Pizzo, 1995).

As imunodeficiências primárias são defeitos gênicos que frequentemente se manifestam até os sete anos de idade, mas que algumas vezes podem ser detectadas somente na vida adulta. A incidência geral estimada do conjunto de imunodeficiências primárias é de 1:2000 nascidos vivos (Bonilla et al., 2005).

A classificação tradicional de IDs é baseada em quatro categorias (linfócito T, linfócito B, fagócitos e deficiência do complemento) (Fischer, 2011). Em resumo, pacientes com deficiências no linfócito B e complemento têm propensão a ter infecções bacterianas extracelulares, e pacientes com defeitos no linfócito T estão propensos a infecções bacterianas intracelulares, virais, parasitárias e fúngicas. Defeitos no sistema fagocitário levam principalmente a infecções bacterianas ou fúngicas em áreas de barreira. Todas as imunodeficiências conhecidas foram classificadas de acordo com os componentes do sistema imunológico afetado (**FIGURA 2**).

O estudo destas imunodeficiências muito contribuiu para a compreensão sobre o funcionamento do sistema imunológico. Mais de 120 genes foram identificados, cujas anormalidades são responsáveis por mais de 150 diferentes tipos de IDP (Hong et al., 1990; Buckley et al., 1992; Iseki e Heiner et al., 1993; Conley et al., 1999; Cunningham-Rundles e Ponda, 2005; Geha et al., 2007), sendo observado que as imunodeficiências primárias atingem taxas de 1 para cada 10.000 a 100.000 nascidos vivos (Rosen et al., 1995; Conley et al., 1999). A complexidade da genética, defeitos imunológicos, e as características clínicas das IDP levou a necessidade de uma classificação, com o objetivo final de facilitar seu diagnóstico e tratamento.

A)

B)

FIGURA 2. Classificação das Imunodeficiências de acordo com os componentes do Sistema Imunológico. A) Distribuição das doenças de acordo com as classes. B) Classificação de acordo com as mutações (IDbases). 1- Defeito na função fagocítica; 2- Deficiência na produção de anticorpos; 3- Imunodeficiência combinada (linfócito T e linfócito B); 4- Outras imunodeficiências bem definidas; 5- Deficiência do sistema regulatório; 6- Defeitos no sistema imuno inato (receptores e componentes de sinalização); 7- Defeitos da via clássica do complemento; 8- Deficiência no sistema de quebra do DNA; 9- Defeitos da via alternativa do complemento; 10- Defeitos relacionados a apoptose; 11- Síndrome da febre periódica.

Fonte: Adaptado de Piirila et al., 2006.

Um estudo realizado pelo grupo latino americano de imunodeficiências primárias (LAGID), relatou que dos 3321 pacientes com IDP registrados na América Latina, 53,2% estão associadas com deficiência de anticorpos, sendo a deficiência de IgA como mais predominante. 22,6% apresentaram outras imunodeficiências primárias bem definidas, 9,5% apresentaram imunodeficiência combinada (envolvendo células B e T), 8,6% defeitos congênitos, 3,3% alteração do sistema imunológico e 2,8% deficiência do complemento (Zelasko et al., 1998; Leiva et al., 2007; Condino-Neto et al., 2010).

Já um estudo realizado pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Brasil), mostrou que num período de 15 anos (1981-1996), 166 casos de doença de imunodeficiência primária (PID) foram registrados. As IDP foram diagnosticadas de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde e as crianças que foram incluídas no presente estudo passaram por um diagnóstico rigoroso de imunodeficiência primária. As seguintes frequências foram observadas: defeitos predominantemente humorais (60,8%), defeitos de

células T (4,9%), imunodeficiência combinada (9,6%), distúrbios de fagócitos (18,7%) e deficiências do complemento (6%). Deficiência de IgA foi o distúrbio mais frequente (60 casos), seguido por hipogamaglobulinemia transitória (14 casos), doença granulomatosa crônica (14 casos), e agamaglobulinemia ligada ao X (9 casos). Sintomas alérgicos ocorreram em 41% dos casos. Durante o período de observação, 23 crianças (13,8%) morreram, principalmente de infecções de repetição. (Grumach et al., 1997).

1.3 Síndrome de Hiper IgM

É uma imunodeficiência primária, rara, caracterizada por níveis séricos normais ou elevados de IgM associados com baixos níveis séricos de IgG, IgA e IgE. Pacientes com HIGM apresentam defeito na troca de isótipo de cadeia pesada das imunoglobulinas e defeito na hipermutação somática dos genes, o que resulta num defeito na produção de anticorpos com alta afinidade para o antígeno (Berek et al., 1991; Kuppers et al., 1993; Liu et al., 1989; Rajewsky, 1996; Quartier et al., 2004; Lee et al., 2005). Esta pode ser causada por mutações no gene CD40L (Aruffo et al., 1993; Korthauer et al., 1993; Di Santo et al., 1993; Allen et al., 1993; Fuleihan et al., 1993), no gene *AICDA* (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000), no gene CD40 (Ferrari et al., 2001), no gene UNG (Imai et al., 2003), e no gene NEMO (Jain et al., 2001) e no inibidor do κB - α (I κ B α) (Courtois et al., 2003). Porcentagem das mutações que acometem os genes causadores de HIGM, descritos na literatura estão demonstrados na **TABELA 1**.

TABELA 1 - Porcentagem das mutações que causa defeito nas moléculas envolvidas no “Switch” de classes de imunoglobulinas.

Imunodeficiência Primária				Mutações					Outra	(%)
				Missense	Nonsense	Deleção	Inserção	Sítio de Splice		
CD40L	Síndrome de Hiper IgM ligada ao X (XHIM)	de	XL	78	61	40	26	43	2	59,2%
IKBKG	Deficiência NEMO	no	XL	28	7	29	17	5	0	20%
AICDA	Síndrome de Hiper IgM ligada ao X	de não	AR	51	18	6	1	4	0	18,8%
CD40	Deficiência molécula CD40	na	AR	3	0	0	0	1	0	<1%
UNG	Deficiência enzima UNG	na	AR	2	0	2	0	0	0	<1%

AICDA, Citidina desaminase induzida por ativação; *UNG*, Uracil-DNA glicosilase; *NEMO*, modulador essencial do fator nuclear κ B; *XL*, ligada ao X; *AR*, autossômico recessivo. **Fonte:** Extraído de Immunodeficiency mutation databases, 2006.

Esta síndrome foi inicialmente descrita por Burtin e por Rosen e colaboradores em 1961, sendo mais comumente observada em indivíduos do sexo masculino, na forma de uma herança recessiva ligada ao cromossomo X (Krantman et al., 1980; Notarangelo et al., 1991). A ocorrência dessa desordem em pacientes do sexo feminino, em irmãos e irmãs afetados sem uma história de doença em gerações passadas sugeriu a existência de um padrão de herança autossômica (Stiehm e Fudenberg, 1966; Pascual-Salcedo et al., 1983). Pacientes portadores de HIGM são propensos a infecções bacterianas do trato respiratório e digestivo, e sua incidência estimada em 1/500.000 nascimentos (Durandy et al., 2005).

1.4 Defeitos genético-moleculares

Até o momento foram identificados cinco defeitos moleculares associados à HIGM (**FIGURA 3**). A HIGM1 é uma desordem ligada ao cromossomo X causada por mutações no gene que codifica a molécula CD40 ligante (CD154, CD40L ou TNFSF 5) (Cunningham-Rundles e Ponda, 2005) sendo observada em 59,2% dos pacientes com HIGM (Cooper et al., 2003). A HIGM2 é causada por mutações no gene *AICDA* e abrange 18,8% dos pacientes (Revy et al., 2000). Menos de 1% dos pacientes

apresentam mutações no gene *TNFRSF5* que codifica a molécula CD40, sendo este defeito responsável pela HIGM3, imunológica e clinicamente indistinguível da HIGM1 (Ferrari et al., 2001). Menos de 1% dos pacientes que possuem defeitos durante o CSR sem falhas na SHM são classificados como HIGM4 (Etzioni e Ochs, 2004). Deficiências de UNG têm sido excluídas em todos esses pacientes através do sequenciamento genético e também não foram encontradas mutações no gene da AID. Portanto, pode-se sugerir que fatores importantes não definidos, envolvidos no processo de CSR, sejam encontrados nos pacientes com HIGM4 (Imai et al., 2003a). Na HIGM4 ocorre hiperplasia dos tecidos linfóides sem formação de centro germinativo (Lougaris et al., 2005). Os pacientes apresentam infecções piogênicas recidivantes, diminuição do número de células B de memória CD27⁺, níveis normais ou elevados de IgM e baixos ou ausentes de IgG, IgA e IgE (Cunningham-Rundles e Ponda, 2005). Estes indivíduos não sofrem infecções oportunistas, indicando que o compartimento de células T não é afetado. A hiperplasia dos órgãos linfóides é mais frequente na HIGM4 do que na HIGM2. Semelhantes a HIGM2, citopenias são encontradas em um quarto dos pacientes. A proliferação das células B ocorre normalmente após a ativação com LPS em conjunto com IL-4. Entretanto a CSR *in vitro* para IgE e IgG é defeituosa nos pacientes com HIGM2 (Cunningham-Rundles e Ponda, 2005). Também são observadas nestes pacientes infecções do trato intestinal, sepse, linfadenite e osteomielite (Imai et al., 2003a). Defeitos na UNG são observados em menos de 5% dos pacientes com HIGM4 (Etzioni e Ochs, 2004).

Cerca de 1 a 2% dos pacientes com HIGM (Etzioni e Ochs, 2004) apresentam uma enfermidade ligada ao X associada à displasia ectodérmica anidrótica, causada por mutações *missense* no gene que codifica o modulador essencial de NF-κB (NEMO ou IKKG). Sem o NF-κB a troca de isótipo de cadeia pesada de imunoglobulinas e a ativação das células B ficam prejudicadas. Infecções bacterianas recorrentes ocorrem precocemente na infância, infecções oportunistas são menos comuns (Simonte e Cunningham-Rundles, 2003), mas o fenótipo clínico é notavelmente heterogêneo. Em alguns pacientes esta falha implica na presença de dentes incisivos cônicos e hipodontia, ao passo outros desenvolvem osteopetrose e linfodema. As abrangências das infecções e dos defeitos na produção de anticorpos são similarmente diversas. O fato do NF-κB ser encontrado no citoplasma de várias células, indica que defeitos nesta molécula podem afetar vários outros tecidos (Cunningham-Rundles e Ponda, 2005).

FIGURA 3. Representação esquemática da interação do CD40 e CD40L e dos defeitos moleculares na síndrome de HIGM. Células TCD4⁺ ativadas expressando o CD40L interagem, nos linfonodos, com células B expressando o CD40 e secretam interleucinas (IL's) que são reconhecidas pelos seus respectivos receptores (IL-R). Estes sinais ativam a via de sinalização do NFκB e resulta na expressão de AID e UNG. Mutações que afetam a ativação da célula B mediada pelo CD40 resultam nas várias formas de HIGM. *MHC II*, Complexo principal de histocompatibilidade classe II; *TCR*, Receptor da célula T; *CD40L-ID*, Imunodeficiência ligada ao X causada por defeitos no CD40L; *CD40-ID*, imunodeficiência causada por defeitos no CD40; *XL-EDA-ID*, imunodeficiência ligada ao X associada à displasia ectodérmica; *AID-ID*, imunodeficiência causada por deficiência de AID; *UNG-ID*, imunodeficiência causada por deficiência de UNG.

Fonte: Adaptado de Durandy et al., 2006.

Defeitos no gene *NFKBIA* que codifica IκBα, um inibidor do NF-κB, também são responsáveis por outra forma de HIGM, fenotipicamente similar ao observado em pacientes com defeitos no NEMO. Esta mutação impede a fosforilação do IκBα e a ativação do NF-κB. Diferentemente da deficiência de NF-κB, este fenótipo está associado a uma deficiência de células T, falta de resposta ao CD3 *in vitro* e ausência de células T de memória (Cunningham-Rundles e Ponda, 2005).

Apesar de não haverem estudos com pacientes com deficiência no complexo INO80, sabemos que estes pacientes apresentam um fenótipo clínico de HIGM com perfil autossômico recessivo.

A administração regular de imunoglobulinas endovenosas (400-600 mg / Kg / mês) é a mais importante forma de tratamento, reduz significativamente a gravidade e a frequência das infecções, e diminui ou normaliza os níveis de IgM, particularmente se o tratamento for iniciado precocemente (Levy et al., 1997; Tamizawa et al., 2004). O transplante de células tronco hematopoiéticas (HSCT) tem sido proposto e aplicado com sucesso nos pacientes com mutações no CD40L (Tamizawa et al., 2004).

Considerando a heterogeneidade clínica e genética dos pacientes portadores da HIGM, o estudo molecular e genético é extremamente importante para a definição do diagnóstico diferencial, delineamento terapêutico, aconselhamento genético e prognóstico dos casos. O diagnóstico molecular, ainda no início da vida dos pacientes com HIGM é de fundamental importância para o adequado tratamento dos portadores desta síndrome, diminuindo a taxa de mortalidade e melhorando sua qualidade de vida (Erdos et al., 2008). Além disso, a identificação de mecanismos genético-moleculares defeituosos contribui para o entendimento da resposta imune humana e sua suscetibilidade a infecções.

1.5 Molécula CD40L

A molécula CD40L é uma glicoproteína de membrana expressa na forma de um homotrímero composto por 261 aminoácidos, que atua na indução e ativação dos linfócitos T. Ela possui uma cauda citoplasmática curta e uma grande porção extracelular, e pertence à família dos receptores TNF. Seu gene possui 05 exons, sendo codificado no cromossomo Xq26.3 (Notarangelo et al., 1996). Na porção extracelular do CD40L encontra-se a porção homóloga ao TNF que interage como receptor. Esta região é parte codificada pelo exon 4 e todo o exon 5, e corresponde a região que mais sofre mutações (65%) (Luttges et al., 2004). As células B são intrinsecamente normais, visto que elas podem sofrer CSR *in vitro* sobre ativação através de CD40L solúvel e citocinas (Durandy et al., 2005).

Pacientes com deficiência de CD40L são propensos a infecções piogênicas (Cunningham-Rundles e Ponda, 2005) e oportunistas por *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma gondii*, indicando um defeito na imunidade celular que pode ser tratado com transplante de medula óssea (Durandy et al., 2005). Esta é uma notável diferença com as síndromes de HIGM causadas pela AID e UNG, que são codificadas por dois genes que são seletivamente expressos em células B nos centros germinativos. Como essas proteínas especificamente agem na CSR e SHM, não afetam a resposta imune celular (Muramatsu et al., 2000; Di Noia e Newburger, 2002). Mas nos pacientes com mutações na AID ou UNG são observadas infecções por bactérias encapsuladas, mas não por patógenos oportunistas (Lougaris et al., 2005).

A maior porcentagem das mutações encontradas na molécula CD40L é *missense* (39,5%) seguidas de mutações *nonsense* (18,6%), deleções (deleção *frameshift*, 12,8%) e inserções (inserção *frameshift*, 10,5%) (Notarangelo et al., 1996).

Recentemente, estudos realizados em pacientes brasileiros deficientes de CD40L, realizado em nosso laboratório revelou seis mutações, sendo elas, um defeito de *splicing* levando a deleção do exon 3 (r.345_402del do gene CD40L (*CD40LG*), uma nova substituição *missense* g.11856 G>C (c.476 G>C, pW140C), uma substituição *nonsense* g.11855 G>A (c.475G>A, p. W140X), e três deleções g. 3074_3077delTAGA, levando a alteração no processamento do RNA. Também foi observada uma redução significativa nos níveis de expressão de CD40L na superfície de linfócitos CD3⁺ e CD4⁺ dos pacientes. A análise dos linfócitos T por microscopia confocal revelou que as células dos homozigotos com expressão residual do CD40L em sua superfície também apresentam redução na densidade da expressão da molécula CD3, sugerindo a necessidade da integridade molecular do CD40L para a expressão normal do CD3.

1.6 Molécula CD40

O receptor de membrana CD40 foi inicialmente descrito como um antígeno expresso em carcinomas de bexiga humana (Koho et al., 1984), mais tarde, foi demonstrado que o CD40 era expresso nas células B no início da diferenciação,

parando de ser expresso quando o linfócito B atingia o estágio de células totalmente diferenciadas. Inicialmente era considerado um marcador de célula B específico, hoje se sabe que é expresso também em monócitos/macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, células musculares, fibroblastos e células epiteliais (van Kooten et al., 1997; Tan et al., 2002; Hakkarainen et al., 2003). O CD40 é uma glicoproteína transmembrânica tipo I, composta por 277 aminoácidos e é classificada como pertencente à superfamília dos receptores de necrose tumoral (TNF) (van Kooten et al., 2000; Schonbeck et al., 2001; Banchereau et al., 2000).

Seu gene possui 09 exons e está localizado no cromossomo 20q12 (Lafage-Pochitaloff et al., 1994). A deficiência do CD40 leva a uma herança autossômica recessiva da HIGM (Ferrari et al., 2001) que é imunológica e clinicamente indistinguível da forma ligada ao X, que é causada por uma mutação no gene CD40LG.

Atualmente, existem 4 mutações descritas no gene CD40, sendo 3 mutações missense e 1 defeito de splicing (Kutukculer et al., 2003; Ferrari et al., 2001).

1.7 Citidina Desaminase Induzida por Ativação (AID)

Há mais de 50 anos atrás Frank MacFarlane Burnet, sem provas experimentais formulou a hipótese de que haveria um processo de randomização que teria como consequência a alteração e variação da imunoglobulina (Burnet et al., 1976). A primeira evidência experimental mostrou de fato que a imunização altera a sequência de aminoácido, alterando a cadeia leve da imunoglobulina (Weigert et al., 1970; Crews et al., 1981; Selsing et al., 1981). Meia década depois, após o avanço da tecnologia, ficou demonstrado que, além da mutação, ocorrem eventos de rearranjo de genes somáticos e assim se começou a pesquisa sobre a diversificação do gene da imunoglobulina (Neuberger et al., 2008).

A AID é um membro da família das *RNA-editing desaminases* que contêm proteínas capazes de criar novos produtos funcionais a partir do RNAm pela substituição de bases nitrogenadas (Simpson e Thiemann, 1995). É codificada pelo gene *AICDA*, e aparece como elemento chave controlando os passos requeridos para a diferenciação terminal das células B. O gene *AICDA* contém 198 aminoácidos, está localizado no cromossomo 12q13 e possui 5 exons e regiões de

introns adjacentes. Foram identificados 10 tipos de mutações diferentes em genes de 18 pacientes em 12 famílias. Essas mutações são substituições de aminoácidos, geração de códons de parada e deleção. Em outro grupo de pacientes estudados, a maioria desta era homozigota e apontavam mutações dentro do exon 2, 3, 4 ou 5 (Kasahara et al., 2003). Mutações na sequência codificadora deste gene são responsáveis pela síndrome de HIGM2 (Revy et al., 2000) que é uma herança autossômica recessiva, contudo, uma forma autossômica dominante tem sido observada em alguns pacientes (Kasahara et al., 2003).

Estruturalmente essa proteína contém uma região ativa de desaminação da citidina, sequência conservada em toda a grande família das citidina desaminases (Muramatsu et al., 1999). Uma segunda região de sinal de localização nuclear (NLS) e outra terceira de sinal de exportação nuclear (NES) são observadas respectivamente nas partes N-terminal e C-terminal da molécula (Ito et al., 2004). A quarta e última parte da AID é semelhante ao domínio da proteína APOBEC-1. Mutações recessivas têm sido encontradas ao longo do gene, incluindo no domínio citidina desaminase, região NLS e no domínio semelhante à APOBEC-1.

Em condições normais, AID é estritamente expressa nas células B que sofrem CSR e SHM (Durandy et al., 2005), sendo seletivamente expressa nos centros germinativos (Muramatsu et al., 1999). A sequência da AID está relacionada a uma proteína conhecida como APOBEC-1 (Polipeptídeo catalítico de editoração do mRNA da apoliproteína B, *apoliprotein B mRNA editing catalytic polipeptide 1*), que converte a citosina do mRNA da apoliproteína B em uracila por desaminação e, assim, inicialmente se acreditava que a AID atuava como uma citidina desaminase de mRNA, embora esta possibilidade ainda exista, evidências atuais sugerem que a AID também atua no DNA, desaminando diretamente resíduos de citidina para uridina nos genes de imunoglobulinas. A enzima AID pode ligar-se e desaminar o DNA de fita simples, mas não o de fita dupla, assim o DNA de fita dupla deve estar localmente desenrolado, para que a AID possa atuar, e isso parece ocorrer como resultado da transcrição de sequências vizinhas. Fazendo uma analogia com outras citidinas desaminases, acredita-se que a AID inicie com ataque nucleofílico no anel pirimidina da citidina exposta (Muramatsu et al., 2000; Yu et al., 2004). A desaminação da citidina não é suficiente para os processos de CSR e SHM, e cofatores são requeridos para a ligação ao domínio N-terminal e C-terminal da AID (Durandy et al., 2005). O resíduo de uracila produzido pela AID pode ser o substrato

para a enzima de reparo por excisão de base, uracil-DNA glicosilase (UNG), a qual remove uma base pirimidina para formar um sítio sem base no DNA. A endonuclease 1 (APE1) pode excisar o restante do resíduo introduzindo um corte na fita simples de DNA no local do sítio original da citosina. A UNG e a APE1 atuam em todas as células para reparar eficientemente as frequentes conversões citosina para uracila, e os sítios sem uma base que ocorrem como resultado de danos espontâneos ao DNA (Muramatsu et al., 2000; Yu et al., 2004)

Foi relatado recentemente que a expressão da AID é sensível ao estrogênio, em tecidos como mama e ovário (Pauklin et al., 2009). Além disso, a expressão da AID tem sido observada em vários tecidos sob condições de estimulação associada com transformação celular (Pauklin et al., 2009; Gourzi et al., 2006). A sua expressão neste caso é muito menor em relação à expressão nos linfócitos B do centro germinativo. A expressão da AID é mutagênica e, portanto, representa uma ameaça para a estabilidade genômica. Após ser ativada, a AID é translocada para dentro do núcleo, mas especificamente nas regiões S e V dos genes das imunoglobulinas (Reynaud et al., 2003). Dados recentes sugerem que o microRNA miR-155 tem um papel na inibição da expressão da AID em células B do centro germinativo (Teng et al., 2008). Sabe-se que membros da família miR-181 também agem na inibição da expressão da AID, no entanto é importante ressaltar que o papel do microRNA miR-181 *in vivo* continua desconhecida (Teng et al., 2008; Dorsett et al., 2008; De Yebenes et al., 2008).

Defeitos em outras moléculas envolvidas na sinalização do CD40, como proteína TRAF (Hu et al., 1994) ou na ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B com a TANK (Cheng e Baltimore, 1996) ou NIK (Malinin et al., 1997) são excluídos deste subgrupo de HIGM. Além disso, a ativação através de algum agonista do CD40, nos monócitos e células dendríticas é consistentemente observada (Revy et al., 1998), sugerindo que o defeito intrínseco nos pacientes com HIGM2 se origina nas células B, no evento de sinalização do CD40 ou no mecanismo de CSR (Revy et al., 2000).

Deficiência de AID resulta não apenas em CSR profundamente prejudicada, mas também na SHM dos genes das regiões variáveis das imunoglobulinas, resultando em defeito na maturação por afinidade dos anticorpos (Imai et al., 2003a). Foram descritos três pacientes exibindo SHM normal, embora CSR encontrava-se drasticamente prejudicada *in vitro* e *in vivo* (Ta et al., 2003). Nos pacientes

portadores desta falha, as células B não sofrem CSR *in vitro* na presença de CD40L solúvel, e o sequenciamento do gene CD40 e a expressão da molécula CD40 são normais (Durandy et al., 1997).

A HIGM2 caracteriza-se por linfadenopatia, hiperplasia das células do centro germinativo (Revy et al., 2000), infecções piogênicas recidivantes, mas não por patógenos oportunistas (Quartier et al., 2004; Cunningham-Rundles e Ponda, 2005; Lougaris et al., 2005) e baixa resposta a protocolos de imunização (Durandy et al., 2005). A autoimunidade é observada em 25% dos pacientes. (Quartier et al., 2004; Cunningham-Rundles e Ponda, 2005). A autoimunidade não é relatada em condições de HIGM quando SHM e subgrupos de células B de memória são computados como normais. Em estudo realizado com 29 pacientes portadores de deficiência de AID (Quartier et al., 2004), em cinco casos a tonsilectomia e adenoidectomia preveniram o aparecimento de infecções do trato respiratório superior. Dentro deste conceito, estudos concluíram que a AID não é somente necessária para a homeostase de células B, mas é extremamente importante para a regulação negativa de doenças autoimunes (Hase et al., 2008).

1.8 Uracil-DNA glicosilase (UNG)

Pelo menos quatro diferentes Uracil-DNA Glicosilase (UDGs) foram identificados em células de mamíferos. Estes são UNG1/UNG2, SMUG1, TDG e MBD4 (Krokan et al., 2000; Takao et al., 2002; Pearl et al., 2000). As mais bem estudadas são as UNG1 e UNG2, estas são pertencentes à família das glicosilases (Caradonna e Muller-Weeks, 2001).

O gene *UNG* contém 07 exons e está localizado no cromossomo 12q23 (Aasland et al., 1990). Dois diferentes promotores levam a formação de duas diferentes isoformas; a UNG1, mitocondrial, ubiquamente expressa; e a UNG2, nuclear e expressa em células em proliferação, incluindo linfócitos B que sofrem CSR (Durandy et al., 2005). Estas duas isoformas são resultado de *splicing* alternativo utilizando promotores alternativos (Haug et al., 1998). Estas contêm diferentes sequências N-terminal, mas os 269 aminoácidos são comuns nas duas isoformas. Utilizando Northern blot e dot blot do RNA, foi detectado presença da UNG1 em todos os tecidos, tendo nível mais elevado no músculo esquelético,

coração, testículos, glândula adrenal e tireoide. A UNG2 teve expressão limitada nos tecidos, sendo expressa em testículo, placenta, colon, intestino delgado e timo (Haug et al., 1998) . Usando Ugi, um inibidor da UNG, Begum confirmou a importância da UNG em RSE. Ugi, no entanto, não inibiu a clivagem de DNA no locus da cadeia pesada de imunoglobulinas durante a RSE. Além disso, os mutantes da UNG são incapazes de remover uracila, mas foram capazes de resgatar a RSE em células UNG^{-/-}, sugerindo que a UNG tem outras funções desconhecidas além da função de remover a uracila, que são fundamentais na etapa de reparação de RSE (Begum et al., 2004).

Análise genética mostrou quatro pacientes com deficiência na UNG, sendo duas mutações *missense* e duas deleções *frameshift* (Imai et al., 2003). Todas as mutações ocorreram dentro do domínio catalítico da proteína UNG. As células destes pacientes não foram capazes de fazer RSE após ativação com CD40L solúvel e IL-4 (Imai et al., 2003).

Pacientes com deficiência de UNG apresentam o mesmo fenótipo clínico dos deficientes de AID (Revy et al., 2000; Imai et al., 2003b). Em estudo com três pacientes com defeitos na UNG, foram observadas características muito semelhantes aos portadores da HIGM2, incluindo suscetibilidade a infecções bacterianas, hiperplasia linfóide, concentração de IgM sérica aumentada e concentrações de IgG e IgA diminuídas (Imai et al., 2003 b). As células B desses pacientes foram incapazes de sofrer CSR *in vitro* após ativação com anticorpos anti-CD40 ou CD40L solúvel, IL-4 ou IL-10. Transcritos de RNA do AID foram encontrados indicando que o bloqueio no CSR não era em consequência da sinalização direcionada pela falta da expressão da AID. Deficiências de CSR associadas com alterações parciais no padrão de SHM foram detectadas, o que relembra o fenótipo de camundongos deficientes de UNG, embora o defeito de CSR em seres humanos seja mais pronunciado (Imai et al., 2003b).

1.9 Complexo INO80

O acondicionamento genômico da cromatina eucariótica apresentam barreiras que restringem o acesso das enzimas que processam o DNA (Kornberg e Lorch, 1999; Luger e Richmond, 1998). Para superar essas barreiras, as células possuem uma série de multi-proteínas, ATP-dependentes que remodelam a cromatina. Cada uma dessas proteínas contém uma subunidade de ATPase da superfamília SnF2/SWI2 (Eisen et al., 1995; Peterson, 1996). Os complexos que fazem a remodelação da cromatina tem a função de aumentar a mobilidade do nucleossomo e estão claramente envolvidos na transcrição. (Armstrong e Emerson, 1998; Kadonaga, 1998; Workman e Kingston, 1998).

O gene *INO80* contém 36 exons, está localizado no locus 15q15.1 e se estende por aproximadamente 135kb. A proteína INOC1 é formada de 1556 aminoácidos, sua massa molecular tem 177kD (Bakshi et al., 2006) e contém sinais de localização nuclear N-terminal e C-terminal (Bakshi et al., 2006).

O complexo INO80 é uma ATPase, membro da família SnF2 de ATPases e funciona como um componente integral de uma multi subunidade responsável pela remodelação da cromatina. Os complexos INO80 de levedura e eucariotos são superiores e compartilham um núcleo comum com subunidades conservadas, os complexos divergiram substancialmente durante a evolução e adquiriram novas subunidades com aparentemente espécies funções específicas. Estudos recentes têm mostrado que o complexo INO80 contribui para uma grande variedade de cromatina, dependentes de transações nuclear, incluindo a transcrição, reparo do DNA e replicação DNA. Camundongos Knockout para INO80 mostram hipersensibilidade a agentes que causam danos ao DNA, além de defeitos na transcrição. Estes resultados indicam que o remodelamento da cromatina impulsionado pela ATPase INO80 pode conectar a transcrição com a reparação de danos ao DNA. É importante ressaltar que o complexo INO80 foi visto somente em modelos experimentais. Isso ocorre, porque ainda não existem pacientes com deficiência no complexo INO80.

Considerando a heterogeneidade clínica e genética dos pacientes portadores da HIGM, o estudo genético-molecular é importante para a definição do diagnóstico

diferencial, delineamento terapêutico, aconselhamento genético e prognóstico dos casos. O diagnóstico molecular ainda no início da vida dos pacientes com HIGM é de fundamental importância para o adequado tratamento dos portadores desta síndrome, diminuindo a taxa de mortalidade e melhorando sua qualidade de vida (Érdos et al., 2008). Além disso, a identificação de mecanismos genético-moleculares defeituosos contribui para o entendimento da resposta imune humana e sua suscetibilidade a infecções.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os dados clínicos e genético-moleculares de pacientes com AR-HIGM, cuja história clínica sugere deficiência nas moléculas AID, UNG, CD40 ou gene *INO80*

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os valores relativos das populações de linfócitos CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD19⁺CD40⁺ nas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Esta análise será feita através da técnica denominada citometria de fluxo;
- Analisar quantitativamente a expressão dos genes *AICDA*, *UNG* e *CD40* por meio de PCR em tempo real;
- Analisar por transcrição reversa acoplada com a reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) a estrutura global dos transcritos dos pacientes com alteração na expressão dos genes, já analisados por PCR em tempo real;
- Investigar mutações nos genes *AICDA*, *UNG* e *CD40* dos pacientes por sequenciamento do DNA genômico (DNAg) ou pelo DNA complementar (cDNA); além do gene *INO80*
- Estabelecer e correlacionar as alterações genético-moleculares com o fenótipo dos pacientes estudados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Avaliação clínica dos pacientes com AR-HIGM

3.1.1 Critérios de inclusão

Inicialmente contávamos com 14 pacientes brasileiros encaminhados pela rede de médicos pertencentes ao BRAGID¹ (Grupo brasileiro de Imunodeficiência), destes dois foram diagnosticados com deficiência do CD40L e um veio a falecer, totalizando 11 pacientes. Todos os pacientes brasileiros apresentaram quadro clínico compatível com AR-HIGM, transcritos para uma ficha de dados clínicos padrão (**ANEXO A**). Todos os procedimentos foram realizados após a leitura e concordância com os termos de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO B.1 e B.2**) de acordo com o parecer 740/CEP ICB-USP.

O estudo genético molecular destes pacientes foi inicialmente realizado no Brasil, onde foram elucidados três casos de AR-HIGM. Pela dificuldade do diagnóstico genético, fui fazer um estágio de aperfeiçoamento no Hospital Necker Enfants Malades, junto com a Dra. Anne Durandy para aprofundar meus conhecimentos teóricos e técnicos na investigação de HIGM autossômico e consequentemente tentar elucidar os outros oito casos de HIGM. Durante minha permanência na França, tive a oportunidade de trabalhar com quatro outros casos de HIGM (um Francês e três Turcos). Estes pacientes assinaram previamente o termo de consentimento francês e foram previamente investigados para os genes *AICDA*, *UNG* e *CD40*, e nenhuma alteração genética foi encontrada. Após longas discussões, decidimos estudar o gene *INO80* nestes pacientes. Minha permanência na França me fez perceber a dificuldade que os pesquisadores e médicos têm em finalizar um diagnóstico genético de AR-HIGM. Essa percepção foi importante para a valorização que este trabalho apresenta, visto que as dificuldades técnicas e desafios científicos ao elucidar tais casos acontecem em quaisquer laboratórios, inclusive o da Dra. Anne Durandy, referência internacional no assunto.

¹ (Grupo Brasileiro de Imunodeficiências - www.bragid.org.br)

Após firmarem termo de consentimento informado, coletamos uma amostra de sangue dos pacientes em condições clínicas estáveis e seguimos o fluxograma demonstrado na **FIGURA 4**.

FIGURA 4. Fluxograma. Inicialmente foram selecionados os pacientes com sinais de deficiência de AID, UNG E CD40. Posteriormente coletou-se o sangue dos pacientes e dos controles para a fenotipagem dos leucócitos por citometria de fluxo, análise das anomalias na estrutura do DNA, e avaliação da expressão gênica e estrutura dos transcritos.

Dos 15 pacientes pertencentes a este estudo 5 são do sexo masculino e 10 do sexo feminino, todos apresentam quadro clínico e laboratorial compatível com AR-HIGM. As famílias brasileiras foram encaminhadas com histórico de infecções de repetição e concentrações séricas normais ou elevados do isótipo IgM, associados com baixas concentrações e/ou ausência dos isótipos IgG, IgA e IgE.

Todos os pacientes do sexo masculino foram analisados laboratorialmente quanto à expressão da molécula CD40 ligante, que se apresentou normal em comparação com os controles sadios. Estes pacientes que apresentaram CD40L normal foram conduzidos a investigar possíveis defeitos genético-moleculares nas enzimas Citidina desaminase induzida por ativação (AID), Uracil-DNA glicosilase (UNG) e da molécula CD40.

A faixa etária do grupo de pacientes pertencentes ao estudo variou de 04 a 42 anos, com idade média de 19 anos. A idade de manifestação dos primeiros sintomas variou de 02 meses a 15 anos, com idade média de 07 anos e 04 meses. Já o estabelecimento diagnóstico vaiou de 02 anos e 06 meses a 39 anos, com uma média de 18 anos e 02 meses. Os dados clínicos e laboratoriais deste grupo estão descritos na **TABELA 2.1 e TABELA 2.2.**

TABELA 2.1 - Características clínicas e imunológicas dos pacientes com fenótipo de AR- HIGM. Deficiência das enzimas AID, UNG e molécula CD40. (Continua)

Pt	Sexo	Idade dos primeiros sintomas	Infecções severas e recorrentes		Outras manifestações	Hiperplasia Linfóide	Idade (anos)	Níveis séricos de Ig (Antes da IVIG ^d)		
			TRS ^b	TRI ^c				IgG	IgA	IgM (mg/dL)
AS	F	15 anos	Otite Sinusite	Pneumonia	Toxoplasmose ocular congênita	Linfodomegalia Hepatomegalia/ Esplenomegalia	21	54,4	<23,6	559
DA	M	8 meses	Amigdalite Otite	Pneumonia	Artrite ITU Neutropenia Tuberculose	-	3	22,1	18,1	368,1
EJ	M	4 anos	Amigdalite Otite	Pneumonia	Diarréia	-	6	30,4	<8	405
GF	F	5 anos	Amigdalite Otite Rinite Sinusite	Pneumonia Bronquiectasia	Choque Séptico Diarréia ITU	-	40	<5	<5	1025
IM	F	5 anos	Otite	Pneumonia Bronquiectasia Atelectasia	Cistite Diarréia Estomatite	-	7	Nd	Nd	960
KM	F	2 meses	Amigdalite Asma Otite Sinusite	Pneumonia	-	Adenomegalia	8	<0,8	<0,8	483
MC	F	9 meses	Otite Sinusite	Pneumonia Bronquiolite	Diarréia ITU Micobacteriose Tinea pedis Vitiligo	-	5	<33,3	<6,67	834
MV	F	2 meses	Otite	Pneumonia	Ataxia Telangiectasia Diarréia	Adenomegalia	2	<140	<22,9	284,5

TABELA 2.1 - Características clínicas e imunológicas dos pacientes com fenótipo de AR- HIGM. Deficiência das enzimas AID, UNG e molécula CD40. (Conclusão)

RC	F	2 meses	Amigdalite Otite Sinusite	Broncopneumonia Pneumonia	Anemia Diarréia Estomatite Gastrite Crônica Urticaria Herpes Zoster Eosinofilia gastrointestinal	Hepatomegalia Esplenomegalia Linfodomegalia Tonsilas hipotróficas	5	199	<32	363
RS	F	2 meses	Amigdalite Otite Sinusite	Pneumonia	ITU	-	8	<0,36	31	988
YE	M	6 meses	-	Pneumonia	Estomatite	Hepatomegalia/ Esplenomegalia	5	231,2	29,6	34,1

Pt, paciente, *TRS*, trato respiratório superior; *TRI*, trato respiratório superior; *IVIG*, infusão de gamaglobulina intravenosa; *ITU*, infecção do trato urinário; *Nd*, não detectado.

TABELA 2.2 - Características clínicas e imunológicas dos pacientes com fenótipo de AR- HIGM. Deficiência no complexo INO80.

Pt	Sexo	Idade dos primeiros sintomas	Infecções severas e recorrentes		Outras manifestações	Hiperplasia Linfóide	Idade (anos)	Níveis séricos de Ig (Antes da IVIG ^d)		
			TRS ^b	TRI ^c				IgG	IgA	IgM (mg/dL)
AN	M	10 anos	Sinusite	Bronquite Pneumonia	Anemia hemolítica autoimune Herpes Zoster Uveíte	Linfadenomegalia Esplenomegalia	14	62	<6	215
KO	F	20 anos	Otite Sinusite	Pneumonia	-	Linfadenopatias	26	Nd	30	290
OD	M	4 anos	Amigdalite Otite	Bronquite Pneumonia	-	Linfadenopatias	6	470	30	170
SE	F	5 meses	-	Pneumonia	Septicemia	Hepatomegalia	1	371	39	334

Pt, paciente, *TRS*, trato respiratório superior; *TRI*, trato respiratório superior; IVIG, infusão de gamaglobulina intravenosa; *ITU*, infecção do trato urinário; *Nd*, não detectado.

As manifestações clínicas mais comuns em pacientes com diagnóstico clínico de AR-HIGM estão descritas na **FIGURA 5**, onde podemos observar que há predominância de infecções no trato respiratório superior, trato respiratório inferior e hiperplasias linfóides (Durandy et al., 2002).

FIGURA 5. Porcentagem das manifestações clínicas mais comuns em pacientes com suspeita de deficiência das enzimas AID, UNG, molécula CD40 e complexo INO80. ITU, Infecção do trato urinário.

3.1.2 Heredograma das famílias estudadas

Através do estudo das genealogias é possível identificar as formas de herança e, para isto, usamos o heredograma para confirmar o padrão de herança autossômica recessiva. Os heredogramas estão representados em duas figuras, a **FIGURA 6A** estão os heredogramas das famílias brasileiras e **FIGURA 6B** estão os heredogramas das famílias estrangeiras, totalizando 15 famílias estudadas. Podemos observar consanguinidade na família dos pacientes EJ e MV.

A)

B)

FIGURA 6. Heredograma dos pacientes com AR-HIGM. Todos os pacientes apresentaram indícios de imunodeficiência primária com herança autossômica recessiva. **A)** Pacientes brasileiros. Podemos observar consanguinidade nos pacientes EJ e MV. **B)** Pacientes estrangeiros, sendo 1 francês e 3 Turcos.

Na admissão ao estudo, todos os pacientes responderam a um questionário padrão onde constavam os antecedentes pessoais, enfocando principalmente processos infecciosos, neoplasias e antecedentes familiares. O perfil clínico de cada paciente foi analisado detalhadamente. Os pacientes e seus familiares receberam uma explicação detalhada sobre o plano de pesquisa do projeto e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido foi assinado pelos pais e/ou responsáveis.

Os critérios de inclusão utilizados para esta etapa inicial foram aqueles descritos pelo Comitê de Classificação das Imunodeficiências Primárias da União Internacional de Imunologia (Notarangelo et al., 2009) sugestivos de HIGM.

3.2 Protocolo para a análise genético-molecular

3.2.1 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

A coleta de sangue ocorreu sempre em condições clínicas estáveis. A amostra de sangue periférico dos pacientes e dos voluntários sadios foi coletado em frascos de polipropileno estéreis contendo heparina.

A seguir, o sangue coletado foi diluído volume/volume em solução salina tamponada (PBS) (NaCl 0,14 M; Na₂PO₄ 0,01 M; pH 7,2) estéril, sendo 20 mL do sangue já diluído, adicionados vagarosamente em tubo de polipropileno estéril contendo 10 mL de Ficoll-Hypaque. Esta mistura foi centrifugada a 600 x g por 30 minutos a 25 °C, e a interface contendo a camada de PBMC foi coletada e transferida para novos frascos de 50 mL de polipropileno estéreis. Os frascos foram completados com PBS até atingir 50 mL para lavagem da suspensão celular e as amostras foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 25 °C. Este procedimento foi repetido mais uma vez e as células mononucleares foram quantificadas numa câmara de Neubauer, sendo a viabilidade celular verificada pela utilização de Trypan blue na concentração de 0,4% (Sigma Chemical Co.). O mesmo procedimento foi seguido para coleta de sangue dos familiares e controles.

3.2.2 Ativação dos Linfócitos B

Após a obtenção de PBMC total conforme dito no item 3.2.1, 5×10^6 células foram cultivadas com 1 mL de meio RPMI suplementado com 20% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em cultivo com 25 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich) e 5 ng/mL de interleucina-4 (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ por cinco dias (Revy et al., 2000).

3.2.3 Extração do RNA total

O RNA total das células foi preparado utilizando-se o kit TRIzol Reagent. Esta técnica baseia-se num procedimento que mantém a integridade do RNA, enquanto ocorre a lise celular que, combinada com a adição de clorofórmio, permite a separação do RNA na fase aquosa. O RNA é recuperado após precipitação com álcool isopropílico (Chomczynski e Sacchi, 1987).

Após ativação dos linfócitos B, conforme descrito no item 3.2.2, uma suspensão de $10-15 \times 10^6$ células foi disposta em tubos eppendorf livres de RNase. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 30 °C, para obtenção das células. A solução de TRIzol, no volume de 1 mL, foi adicionada ao “pellet” e homogeneizado para provocar a lise das células e foi incubada por 5 minutos na temperatura de 30 °C e recebeu 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de TRIzol. Após nova homogeneização vigorosa por 15 segundos e incubação por 3 minutos a 30 °C, a amostra foi centrifugada durante 15 minutos a 12000 g e 4 °C. No término da centrifugação formaram-se 3 fases na solução. A fase aquosa (superior) foi cuidadosamente retirada e transferida para um novo tubo eppendorf livre de RNase e foi adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de TRIzol adicionado no início do experimento. Em seguida, a solução foi incubada por 10 minutos na temperatura de 30 °C e, após centrifugação por 10 minutos em 12000 g na temperatura de 4 °C, o RNA ficou precipitado no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e ao “pellet” de RNA foi adicionado 1 mL de etanol 75%, sendo a solução novamente centrifugada durante 5 minutos a 7500 x g. Após a retirada cuidadosa do etanol por aspiração, os tubos contendo o RNA total foram armazenados durante 5 a 10 minutos em temperatura ambiente, dentro do fluxo laminar, para a evaporação do etanol residual. O RNA foi ressuspenso em 15-50 µL de água MilliQ ultrapura, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 1:10.000.

A quantidade e qualidade do RNA extraído foram aferidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 280 nm e 260 nm, utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000. Após a leitura no espectrofotômetro a integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA, corado com brometo de etídio, comparando-se o padrão de corrida eletroforética do RNA extraído com um padrão de massa molecular

conhecido. As amostras de RNA foram armazenadas a – 80 °C para posterior utilização.

3.2.4 *Reação de transcrição reversa*

O RNA total extraído das células foi submetido à transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Dois microgramas da amostra de RNA total foram adicionados a um microtubo eppendorf livre de RNase com capacidade de 0,2 mL numa solução contendo 50 µM de oligo (dT) primer e a solução foi completada para um total de 12 µL com água DEPC 1:10.000. O oligo (dT) hibridiza na cauda 3' poli (A) presente no RNA mensageiro maduro em que o processo de splicing já foi realizado. Assim utilizamos para as análises apenas RNAm já processados.

A seguir, este primeiro microtubo foi incubado durante 5 minutos a 65 °C. Após a incubação com as amostras no termociclador a 4 °C, acrescentou-se a cada microtubo contendo o RNA total, oligo (dT) e água DEPC, uma solução total de 8µL contendo 2 µL de dNTP (2,5 mM de dATP, dCTP, dTTP, dGTP cada), 4 µL de tampão RT (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM) e 1 µL (5U) da enzima transcriptase reversa. A seguir, no termociclador as amostras foram incubadas durante 60 minutos numa temperatura de 42 °C. Após o término, as amostras foram aquecidas por 10 minutos a 92 °C para inativar a enzima transcriptase reversa e o cDNA produzido foi congelado a –20 °C para uso posterior.

3.2.5 *Análise por RT-PCR*

Utilizamos a técnica da transcrição reversa acoplada com a reação de polimerase em cadeia, comumente chamada de RT-PCR (do inglês, "Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction") para análise das estruturas dos transcritos de AID, UNG e CD40 produzidos pelos pacientes brasileiros e INO80 para os pacientes estrangeiros.

A reação de RT-PCR combina a síntese do cDNA, à partir de amostras de RNA, seguido do PCR sendo um método rápido e sensível para análise estrutural

dos transcritos produzidos. Combinamos pares de *primers* para sequenciarmos todo o RNAm dos genes da AID, UNG, CD40 e INO80.

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando um volume final de 25 μL , com 2 μL de cDNA, e 2,5 μL de cada par de oligonucleotídeos apropriados à [0,5 mM], 0,2 μL à [25 mM] de dNTP, 10 mM Tris cloreto (buffer) (pH 8.3), 1,25 μL de 50 mM MgCl_2 e 0,3 μL de Taq polimerase [5U] (Invitrogen) no termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf).

Para controle da integridade do cDNA produzido utilizamos um par de primers para análise dos transcritos da β -actina e outro para análise dos transcritos da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (do inglês, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ou GADPH), que são controles internos de expressão gênica não variáveis.

Os produtos amplificados foram analisados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA corados com brometo de etídio.

TABELA 3 - Relação dos pares de primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo-relativo. (Continua)

RNAm	Primer	Sequencia (5'- 3')	T.A.	Prod uto
AID cDNA total	Forward	TAATTGAAGTGAGATTTTTCTGG	60 °C	580
	Reverse	AAAACAGAGAAGACTTGAAGGA		
AID exons 2-3	Forward	TCTTGATGAACCGGAGGAAG	60 °C	309
	Reverse	GAACCCCAACCTCAGTCTGA		
AID exons 3-4	Forward	ATTGCTCTTCCTCCGCTACA	60 °C	331
	Reverse	GGAAGGGCTGCATGAAAAT		
AID exons 4-5	Forward	GGAATACTTTTGTAGAAAACCACGA	60 °C	153
	Reverse	GCATTTTCGTACTTTGGGACTTT		
UNG exons 1-5	Forward	CTCCTCAGCTCCAGGATGAT	60 °C	570
	Reverse	CTCTTTATAAATGTTCTCCAAACTGG		
UNG exons 4-7	Forward	AGTGTTCAAAGGCCTGTTCC	60 °C	504
	Reverse	GGAACTTCGTAAGTGGCAAATA		
INO80 primer 1	Forward	TTGTTCTATGGCCTCGGAGT	60 °C	419
	Reverse	CCTCGCTGGATTCATCACTT		
INO80 primer 2	Forward	GCAGAAAGTGGCTAAAGAGCA	60 °C	410
	Reverse	TGCATCGTGAGAAAACCTTG		
INO80 primer 3	Forward	CCTCTGAAGAATCCCCTCGT	60 °C	449
	Reverse	GAGTTTTTCGCTGTTGCCTCT		
INO80 primer 4	Forward	ACCGCAAGAGAGCAGAGAAG	60 °C	443
	Reverse	AGCCCGGATAGATGGGTTAG		
INO80 primer 4	Forward	TGCAAAAGAAAGTCGAGCAG	60 °C	452
	Reverse	GGGCATCCTGAGTGTAGAGG		
INO80 primer 5	Forward	GGTGCTACCATATTGGGGAAA	60 °C	454
	Reverse	CCTCAGCATAAATGGCTTCA		
INO80 primer 6	Forward	AAGGACATTGAGAGCCATGC	60 °C	446
	Reverse	ACCCTTAACCACTGTCTCG		
INO80 primer 7	Forward	TTTCCCTAAAGCCATACCACA	60 °C	433
	Reverse	CAGTGGCTGCTGAAAACAAG		

TABELA 3 - Relação dos pares de primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo-relativo. (Conclusão)

INO80 primer 8	Forward	TCCACTCTCCTTTCCAAACC	60 °C	456
	Reverse	TCAAGGGCATAACAGCTTTCC		
INO80 primer 9	Forward	CTGTGGAGCATCAGACCTCA	60 °C	430
	Reverse	CCTGCTTTGTCTGCCCTAAG		
INO80 primer 10	Forward	ATAGCGACTGGAACCCCACT	60 °C	454
	Reverse	AAGGAGTCATCTCCGTCAGC		
CD40 cDNA total	Forward	CCTGGTCTCACCTCGCTATG	60 °C	905
	Reverse	CTCTGGCCAACTGCCTGT		
β-actina cDNA total	Forward	GTGGGCATGGGTGAGAAG	60 °C	552
	Reverse	GGCCATCTCTTGCTCGAA		

T.A., temperatura de anelamento; *pb*, pares de base.

3.2.6 Reação de PCR em Tempo Real

Após ativação dos linfócitos B com LPS e IL-4, o cDNA dos pacientes foram amplificados por meio de PCR em tempo real, através do sistema SYBR Green Real Time (Applied Biosystems). A reação de PCR em tempo real leva à identificação e quantificação através de um sinal fluorescente, o qual incrementa em proporção direta à quantidade de produto de PCR em uma reação. Usaremos o SYBR® Green, que se une especificamente a DNA de dupla fita e em estado de excitação emite luz. Deste modo, quanto mais se acumula o produto do PCR, maior será a fluorescência. Isto nos permitirá correlacionar a intensidade de sinal coletado com a quantidade de produto amplificado.

Cada 10 µL de mix de PCR conterá 3 µL do cDNA da amostra, 5 µL de Sybr® Green Master Mix (1 X Sybr® Green Buffer, 3 mM de MgCl₂, 200 nM de dNTP blend, 0.63 U de Amplitaq Gold®, 0.25 U de AmpErase®), 2 µL de primers específicos para o gene de interesse e gene constitutivo (Luengo-Blanco Prando et al., 2008). O gene escolhido para controle interno da reação será o gene da β -Actina (NM 001101). As sequências dos primers estão descrita na **TABELA 4**.

TABELA 4 - Relação dos pares de primers utilizados na reação de PCR em tempo real.

RNAm	Primer	Sequencia (5'- 3')	T.A.	Produto (pb)
AID	Forward	GAAGAGGCGTGACAGTGCTAC	60 °C	115
	Reverse	GTCTAGGTCCCAGTCCGAGAT		
UNG	Forward	ACACCAAGTCTTCACCTGGAC	60 °C	129
	Reverse	GGAACAGGCCTTTGAACACTA		
CD40	Forward	GGGGTTTCTGATACCATCTGC	60 °C	135
	Reverse	ACAGGCAGGCACAAACAAG		
<i>β-actina</i>	Forward	TCACCGAGCGCGGCT	60 °C	60
	Reverse	TAATGTACGCACGATTTCCC		

T.A, temperatura de anelamento; *pb*, pares de base.

3.3.7 Fenotipagem dos linfócitos $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD19^+CD40^+$

Os valores relativos das populações de linfócitos $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ e $CD19^+CD40^+$, foram realizadas sem necessidade de ativação prévia. Para a avaliação dos linfócitos $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ e $CD19^+CD40^+$, foi usada 5 alíquotas de PBMC's contendo 10^6 células/100 μ L de meio RPMI foram transferidas para 5 tubos contendo os seguintes anticorpos monoclonais: Tubo 1, controle isotípico apropriado para servir como controle para discriminar a fluorescência positiva da negativa; Tubo 2 e 3, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8; tubo 4 e tubo 5, anti-CD19, anti-CD40. Os fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais aqui utilizados estão descritos na **TABELA 5**.

TABELA 5 - Anticorpos utilizados na fenotipagem dos linfócitos.

Anticorpos	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD8	Anti-CD19	Anti-CD40
Fluoroc.	FITC	PE-Cy5	PE	APC	FITC

Fluoroc, fluorocromo; *PE*, ficoeritrina; *FITC*, isicianato de fluoresceína; *PE-Cy5* ficoeritrina-Cy5; *APC*, Allophycocyanin.

Em seguida os tubos foram armazenados durante 30 minutos à 4°C protegidos da luz para a ligação dos anticorpos aos receptores. A seguir, as suspensões celulares incubadas com os anticorpos, foram lavadas duas vezes adicionando 1 mL PBS nos tubos e centrifugando-os 800 x g (2800 rpm) por 5 minutos. A seguir as células foram ressuspensas e fixadas em 0,3 mL de PBS + 1% de paraformaldeído para leitura no citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) onde foram analisadas 10.000 células, utilizando como parâmetros: FSC-H (do inglês, *forward scatter*) correspondendo ao tamanho celular e SSC-H (do inglês, *side scatter*) correspondendo a granulosidade celular. Após a construção de um “gate” selecionando os linfócitos, os parâmetros FL1 x FL2, FL1 x FL3 e FL2 x FL3 foram analisados neste “gate” de linfócitos.

3.2.7 Extração do DNAG

Para detectarmos os defeitos genéticos de cada paciente, amostras de DNA genômico (DNAG) foram extraídas das PBMC's. O DNAG de cada paciente foi extraído utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification. Em microtubos de 1,5 mL contendo 300 µL de sangue, foram adicionados 900 µL de solução de lise celular misturando-se o conteúdo do tubo por inversão e a seguir as amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 10 minutos. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g durante 30 segundos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 µL de solução de lise nucléica e 100 µL de solução para precipitação proteica. O conteúdo do tubo foi homogeneizado durante 20 segundos no vórtex. Em seguida, as

amostras foram centrifugadas a 15000 x g durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. O DNAg foi precipitado em 300µL de isopropanol absoluto e a amostra centrifugada a 15000 x g durante 1 minuto. Após descartar o sobrenadante, o DNAg foi lavado com 300 µL de etanol 70% centrifugando as amostras a 15000 x g por 5 minutos. A seguir o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o DNAg foram mantidos em temperatura ambiente durante 10 minutos para a evaporação do etanol residual. Após este período, o DNA foi reidratado em 30 a 150 µL de solução de reidratação e incubado em banho maria durante uma hora a 65 °C. Após esta etapa, o DNA foi armazenado a -20 °C até a sua utilização.

A quantidade e qualidade do DNAg foram aferidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 280 nm e 260 nm, utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000. Após a leitura no espectrofotômetro a integridade do DNAg foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA corados com brometo de etídio, sendo comparada com um padrão de massa molecular conhecido.

3.2.8 Amplificações dos exons dos genes AICDA, UNG e CD40

Após a extração do DNA genômico, os 5 exons que codificam a proteína AID foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Numa reação de 25 µL foram adicionados: 100-200 ng de DNA, 2,5µl de cada par de oligonucleotídeos apropriados a 0,5 mM, 0,2 µL de dNTP à 25 mM, 2,5 µL de tampão à 10 mM (Tris cloreto-buffer) (pH8.3), 1,25 µL de MgCl₂ à 50mM e 0,3 µL de Taq polimerase [5U] (Invitrogen) e a solução foi completada para o volume total de 25 µL com água MilliQ ultrapura – q.s.p. Os oligonucleotídeos para amplificação das regiões de interesse estão especificados nas **TABELAS 6.1, 6.2 e 6.3.**

TABELA 6.1 - Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene *A/CDA*.

Exon	Primer	Sequência (5'- 3')	T.A.	Produto (pb)
1	Forward	CATTAATTGAAGTGAGATTTTCTGG	60 °C	144
	Reverse	GAGCAAATCTGAGTAATGAG		
2	Forward	AATCCAGAGTGACCAGATTA	60 °C	252
	Reverse	GCAAGCAGTTTAATGGTCAA		
3	Forward	AGTGAATTTTAGCGTGGTC	60 °C	379
	Reverse	GATGCGGAATGAATGAGTT		
4	Forward	TTTGGAACCTGAACTGTCTT	60 °C	239
	Reverse	CTCTACAGTCTTTTTTGGAG		
5	Forward	ACCTCGTTTTGAAGCCAT	60 °C	168
	Reverse	GACAGTGGATAAAAAACAG		

Forward, amplificação no sentido 5'-3'; *Reverse*, amplificação no sentido 3'-5'; *pb*, pares de bases; *T.A.*, temperatura de anelamento.

TABELA 6.2 - Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene *UNG*.

Exon	Primer	Sequência (5'- 3')	T.A.	Produto (pb)
1	Forward	GTTCGCTGCCTCCTCAGC	60 °C	216
	Reverse	GTGAAGGGGGAGGAAGGC		
2	Forward	CAGCCCTGGGCTCTTACTGT	60 °C	400
	Reverse	CCATAAGGGTAAATGTGGAG		
3	Forward	TGAATTCTTATGGTTTCCAATG	58,5 °C	220
	Reverse	ATAGTATTTTTTAAATTAGGG		
4	Forward	CAGGGTCTGTGCTGCTTAC	60 °C	253
	Reverse	GACTATCTGGGGCACTGTTCA		
5	Forward	AGGGCTGGCTGTAACCTTCTAAC	60 °C	222
	Reverse	CCAGCGACTGCTAGATTTTT		
6	Forward	GCTGATTTGCCTGAGCCTAC	60 °C	317
	Reverse	AGTCCCTGCTGTGTTTGGTC		
7	Forward	CCACTGCAGCAAGACTCTGT	60 °C	271
	Reverse	TTTGAGAAGCTGCTGTTAACGT		

Forward, amplificação no sentido 5'-3'; *Reverse*, amplificação no sentido 3'-5'; *pb*, pares de bases; *T.A.*, temperatura de anelamento.

TABELA 6.3 - Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do CD40.

(Continua)

Exon	Primer	Sequência (5'- 3')	T.A.	Produto (pb)
1	Forward	CTGGTCTCACCTCGCTATGG	61 °C	85
	Reverse	CTGTGAGTTGTTTTGCCCC		
2	Forward	TGAAGAAGTTGCAACGGAGA	60 °C	172
	Reverse	TCTAGCCCCATCATGGAGTC		
3	Forward	ACTCATGGAGTTGGCCAGAG	60 °C	209
	Reverse	GGGAAAGGGACGCTTGGGAAC		
4	Forward	GCAATGTGGGGAGTGAGG	60 °C	257
	Reverse	AATCAGTTTTGGAGGGGGAC		
5	Forward	AGGTGGTCCACTGTGATGGT	60 °C	173
	Reverse	AGGTGGTCCACTGTGATGGT		

TABELA 6.3 - Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do CD40.

(Conclusão)

6	Forward	CTGTGTGTGTGCATTTGTGC	60 °C	152
	Reverse	AGGAAGGTGGGAAGTGAAGG		
7	Forward	TGCATGCTGAAGTCCTGATT	60 °C	140
	Reverse	TCAGGTGGGGAGGTGTTG		
8	Forward	TTTAGAAAAGGTGGCCAAGAAG	60 °C	67
	Reverse	GAGAACCCGGGACAGAGTTT		
9	Forward	GACCTCACACCTTGCCTCTC	60 °C	236
	Reverse	ACAGGCAGTTGGCCAGAG		

Forward, amplificação no sentido 5'-3'; *Reverse*, amplificação no sentido 3'-5'; *pb*, pares de bases; *T.A*, temperatura de anelamento.

As condições da reação foram de 2 minutos a 95 °C, então 35 ciclos de 45 segundos a 95 °C para desnaturação do DNA, 30 segundos para anelamento dos primers e 45 segundos a 72 °C para extensão dos segmentos de interesse e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. A reação de PCR foi realizada no termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf). Os primers para amplificação dos exons foram construídos com auxílio do programa OligoPerfect™ Designer².

Os produtos amplificados foram analisados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE- X mM de TRis, X mM de ácido acético e X mM de EDTA) corados com brometo de etídio e os produtos gerados foram comparados com um padrão de massa molecular conhecido.

3.2.9 Amplificação do gene *INO80*

Após a extração do DNA genômico, os 36 exons que codificam a proteína INOC-1 foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Numa reação de 25 µL foram adicionados: 100-200 ng de DNA, 2,5 µL de cada par de oligonucleotídeos apropriados a 0,5 mM, 0,2 µL de dNTP à 25 mM, 2,5 µL de tampão à 10 mM (Tris cloreto-buffer) (pH8.3), 1,25 µL de MgCl₂ à 50 mM e 0,3 µL de Taq polimerase [5U] (Invitrogen) e a solução foi completada para o volume total de 25 µL com água MilliQ ultrapura – q.s.p. Os oligonucleotídeos para amplificação das regiões de interesse estão especificados **TABELA 7**.

TABELA 7. Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene *INO80*.

(Continua)

Exon	Primer	Sequência (5'- 3')	T.A.	Produto (pb)
1	Forward	CTTCACATTGGGAACAAGCA	59 °C	424
	Reverse	AAACTGTTCTCTGAAATAAATTGAC		
2	Forward	TGATATTTTCTTTTGCCTCTTTCA	59 °C	464
	Reverse	GCCACTTTCTGCTTTTCTTCA		
3	Forward	AGCAGGCAGTTCTGGAATGT	60 °C	383
	Reverse	TTGAATCCTCCAGATTTTCTCAA		
4	Forward	CATGTCATAAGGGGAAGTGGG	60 °C	410
	Reverse	CTCCCAAAGTGCTGGGATTA		
5	Forward	TGTTACTGATCTCTTTGTGGGAAG	59 °C	384
	Reverse	GGAGAGTTTTTCAGATAAAGCAAA		
6	Forward	TGTTGTCAGTGTGAGGTGGAA	60 °C	453
	Reverse	TCCAACAGATTAGTTTCTTTGCAG		
7	Forward	TCTTGCTTGGCTTGACATTTT	60 °C	314
	Reverse	TGAGAACATTCAGAACTCTCTTACG		
8	Forward	ACAAGGACATTAATCAAGTTGCAG	59 °C	450
	Reverse	GTGTCATTGGTTAGATGTACAATTTTC		
9	Forward	AAAAGTAAACAGTTGGTAAAGGAATTG	59 °C	390
	Reverse	AATTCGCAAAAATTAATGTATATAACC		
10	Forward	CCGTGAACCCAGGGATAAGT	60 °C	360
	Reverse	GTGAAAGAGACCCAGCTCCA		
11	Forward	TCAGATTATGAGAAATTTTGTTC	60 °C	476
	Reverse	CTCCCAAAGTGCTGGAATTG		
12	Forward	AGCAGTGGGTAAAAGTGCTGA	60 °C	359
	Reverse	TCTGAGGCAAGAACCCAGTC		
13	Forward	TGAATGTGCAGATTTGGGATT	60 °C	387
	Reverse	CAACCTCCCAAAGTGCTGAG		
14	Forward	TATTCCACCATTGGCAGGAG	60 °C	373
	Reverse	CCAGCTGATTGCCTACAACA		
15	Forward	CACTGCACATCTCCCTACCA	60 °C	368
	Reverse	GTGTGTGTGTGCGTGTGTGT		

TABELA 7. Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene *INO80*.

(Continua)

16	Forward	TGTTTTTCAGTTGAATACATGATGG	60 °C	366
	Reverse	GGGGCAAGTCTTTTATGTGG		
17	Forward	CACACATACACATGCATCTAGGC	60 °C	368
	Reverse	GTTTTCTTCCCCGCTGATTT		
18	Forward	TGGGAAAAAGTTTCAGTCTGC	59 °C	367
	Reverse	TCCTCTTTGATCCATGCAAGT		
19	Forward	TGTCCACATTACAGGTTTATAGAG	60 °C	440
	Reverse	GAGCCAGAGGTTGCAGTGA		
20	Forward	TGATGCCAGATAAGCAAAGG	59 °C	437
	Reverse	TTCCTTCCATAAGATCCCTCAA		
21	Forward	TGCCTGGTAATATGGCAAGA	59 °C	392
	Reverse	GCTACAAATCACAGAGCCTATAAAGA		
22	Forward	CTTGCACCAAAGTGGCTAGA	59 °C	384
	Reverse	TGCCCAGCCTACAAACTTTA		
23	Forward	TGAAAGTAGGAAAGTAGGAAAGAACTG	60 °C	444
	Reverse	CCCACTCCTCTGGGAACCTT		
24	Forward	TTTACAGGGAAGAAAGCTCTTAAAGT	60 °C	412
	Reverse	CAGAATCACAAATGCCACACA		
25	Forward	GGACAGCTTAGTGTGCCAGA	59 °C	493
	Reverse	AAAGGAAGCAGAAACCTCAAGA		
26	Forward	GCGTTGCATTCTCCCTTTAG	60 °C	381
	Reverse	GTTTTGGGGCTCCCATTAAG		
27	Forward	GGGGTTACTCTCTCCCCATT	59°C	291
	Reverse	CATTTCAAGCACTAGAGGGAAA		
28	Forward	CAGGCCTAGGTAACCACCAA	59°C	381
	Reverse	TCCAGTCAAAGAGCAACTAGAGTC		
29	Forward	GCTCAATATCATAGAAACGAATCAGA	60°C	401
	Reverse	TTTCGTCAGGACCAATGAAAG		
30	Forward	TGAACTGAAATGAAAAGGGAGAA	60°C	358
	Reverse	TTTCCCTAAATACAGCCTCTGG		
31	Forward	CCACTGGTTATCTGCCTTAAACA	60°C	309
	Reverse	GAGAAGCCATGTACCCCAA		
32	Forward	CCTTATGCAGTTTTTCTTCCGTA	60°C	478
	Reverse	TGAGAAACCAACCTGTCCTCA		

TABELA 7. Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene *INO80*.

(Conclusão)

33	Forward	AAACAAATGAGGACAGGTTGG	59°C	427
	Reverse	TTTTCTCATTTCACTTGACAAAGC		
34	Forward	AGACCTCCTCATGGGTCCTAA	60°C	513
	Reverse	GCAAGGGGTGAGTCAACAGT		
35	Forward	AGGAATTGCCACCACTTCT	60°C	458
	Reverse	CCTGCTGGACATTTCCACTT		
36	Forward	CCCAGATTCCTGTGTACAGATG	60°C	400
	Reverse	ATTTGCCTCTGGCCATCA		

Forward, amplificação no sentido 5'-3'; *Reverse*, amplificação no sentido 3'-5'; *pb*, pares de bases; *T.A*, temperatura de anelamento.

3.2.10 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o Kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (Amersham) conforme as instruções do fabricante.

3.2.11 Reações de Sequenciamento

Após as amplificações dos exons, investigamos as mutações subjacentes pela análise do DNA genômico através da técnica de sequenciamento genético para identificarmos as alterações genético-moleculares responsáveis pelo fenótipo de deficiência de AID, UNG e CD40 nos pacientes brasileiros e INO80 nos pacientes estrangeiros.

As reações de sequenciamento foram realizadas a partir de produtos de PCR utilizando o **ABI 3730 DNA Analyser**, um sistema de análise de DNA de 48 capilares com a tecnologia Applied Biosystems. As reações de sequenciamento são feitas utilizando o **BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit** (código 4337456). As corridas são feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências são analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados de registros de mutações para a síndrome de Hiper-IgM³ e a descrição das mudanças de sequências dos genes da *AID*, *UNG* e *CD40* seguiram a nomenclatura do banco de dados de registros de mutações para a deficiência de *AID*⁴, *UNG*⁵ e *CD40*⁶.

3.2.12 Análise estatística

Para compararmos as diferenças nos níveis relativos de expressão dos genes *AICDA*, *UNG* e *CD40* entre o grupo de pacientes e o grupo de indivíduos controle, utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney. As diferenças entre ranks foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. (Whitney, 1997). O software utilizado para análise estatística foi GraphPrism 5.

³ (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneseqview?db=core;gene=ENSG00000102245)

⁴ (<http://bioinf.uta.fi/AICDAbase/>)

⁵ (<http://bioinf.uta.fi/UNGbase/>)

⁶ (<http://bioinf.uta.fi/CD40base/>)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste presente estudo, realizamos o estudo clínico e genético-molecular de pacientes com diagnóstico clínico de HIGM com perfil autossômico recessivo (Callard e Smith et al., 1994; Conley e Larche et al., 1994), que é caracterizada pela deficiência nas enzimas Citidina desaminase induzida pela ativação (AID), Uracil N-glicosilase (UNG) e molécula CD40.

No total, 15 pacientes foram investigados (AS, DA, EJ, GF, IM, KM, MC, MV, RC, RS, YE, AN, OD, KO e SE), sendo 1 francês e 3 turcos. Os pacientes brasileiros foram investigados para os genes *AICDA*, *UNG* e *CD40*. Os pacientes estrangeiros foram investigados para o gene *INO80*.

A avaliação do histórico clínico revelou que de todos os pacientes pertencentes ao estudo apresentaram 100% pneumonias, 80% Otite média aguda, 53% sinusite, 46% amigdalite, 40% diarreias recorrentes, 26% ITU, 20% estomatite, uma apresentou micobacteriose cutânea. Em 20% dos pacientes houve infecções por patógenos oportunistas (*Mycobacterium marinum*, *Toxoplasma gondii*, *Varicella-zoster*, *Pseudomonas aeruginosa*, levedura e *Mycobacterium tuberculosis*). A infecção causada por patógenos oportunistas extracelulares são observados em pacientes com AR-HIGM (Minegishi et al., 2000).

A Hiperplasia linfóide, que se desenvolveu em 60% dos pacientes, foi relatada previamente como uma característica comum em pacientes com deficiência da AID (Minegishi e Lavoie et al., 2000; Revy et al., 2000; Muto et al., 2000; Zhu et al., 2003). A intensa proliferação de células B no centro germinativo leva a um crescimento deste, e não é devido a um defeito na apoptose, onde a molécula Fas é presente em numerosos macrófagos e estes apresentam um grau de apoptose alto a ponto de ter um aumento do centro germinativo (Revy et al., 2000; Muto et al., 2000). Uma possível explicação para a intensa proliferação observada nestes pacientes é que, na ausência da AID, antígenos continuamente induzem a proliferação de linfócitos B (Fagarasan et al., 2001; Kinoshita et al., 2001). Após a investigação clínica, os pacientes do sexo masculino passaram por uma investigação da molécula CD40L por citometria de fluxo, assim descartando a possibilidade de deficiência no ligante do CD40. Os pacientes que foram excluídos desta possibilidade passaram pela triagem da molécula CD40, que é expresso na superfície de linfócitos B CD19⁺.

4.1 Fenotipagem dos linfócitos

4.1.1 Fenotipagem dos linfócitos $CD3^+CD4^+$

Os linfócitos são encontrados no sangue contribuindo para 20-30% dos leucócitos. Esta percentagem varia muito de acordo com a idade do paciente. Analisamos os linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ de indivíduos controles e dos 11 pacientes brasileiros. Destes, podemos observar que os valores relativos de linfócitos $CD3^+CD4^+$ da paciente RC apresentou-se baixo, e de uma maneira geral, todos os 11 pacientes pertencentes ao estudo tiveram um valor relativo de linfócitos $CD3^+CD4^+$ levemente mais baixo em comparação com os controles sadios. Não houve diferença estatística entre os dados analisados ($p=0,0709$, $n=11$, Teste de Mann-Whitney) (**FIGURA 7**).

FIGURA 7. Fenotipagem dos linfócitos CD3⁺CD4⁺ de pacientes com HIGM. Gráfico dos valores relativos da subpopulação de linfócitos CD3⁺CD4⁺. Não foi observada diferença estatística significativa entre o grupo de pacientes e controles, a barra horizontal entre os pacientes e controles indica a mediana de cada grupo. O “dot plot” de cada paciente apresentado é representativo de dois experimentos independentes. O “dot plot” para a marcação dos linfócitos CD3⁺CD4⁺ dos pacientes e controles estudados foram realizados a partir de um “gate” na população de linfócitos. Não houve diferença estatística entre os dados analisados ($P=0.0709$, $n=11$, teste de Mann-Whitney).

4.1.2 Fenotipagem dos linfócitos $CD3^+CD8^+$

Com relação aos valores relativos de linfócitos $CD3^+CD8^+$, podemos observar que os pacientes estudados apresentam valores levemente mais elevados, em comparação com o grupo e controles sadios. Não houve diferença estatística entre os dados analisados ($p=0,7427$, $n=11$, Teste de Mann-Whitney) (**FIGURA 8**).

Sabemos que a porcentagem de células $CD3^+CD8^+$ no sangue é menor do que de células $CD3^+CD4^+$. Isso acontece porque há um mecanismo de compensação celular, onde quando há diminuição na produção de células $CD3^+CD4^+$ consequentemente ocorre um aumento da porcentagem de células $CD3^+CD8^+$ no sangue.

FIGURA 8. Fenotipagem dos linfócitos $CD3^+CD8^+$ de pacientes com HIGM. Gráfico com valores relativos da subpopulação de linfócitos $CD3^+CD8^+$ também não foi observada diferença estatística significativa entre o grupo de pacientes e controle, a barra horizontal entre os pacientes e controles indica a mediana de cada grupo. O “dot plot” de cada paciente apresentado é representativo de dois experimentos independentes. O “dot plot” para a marcação dos linfócitos $CD3^+CD8^+$ dos pacientes e controles estudados foram realizados a partir de um “gate” na população de linfócitos. Não houve diferença estatística entre os dados analisados ($P=0.7427$, $n=11$, teste de Mann-Whitney).

4.1.3 Fenotipagem dos linfócitos CD19⁺CD40⁺

Sabemos que o CD40 é um receptor da superfície celular que se expressa na superfície de todas as células B CD19⁺ (Clark, 1990). Também pode ser expresso em monócitos, células dendríticas, células endoteliais e células epiteliais (van Kooten e Banchereau, 2000). Até o presente momento, todos os pacientes afetados pela síndrome HIGM devido a um defeito CD40 foram diagnosticados por meio de citometria de fluxo com base na falta de expressão de CD40 na superfície dos linfócitos B (Lougaris et al., 2005). A partir destes dados analisamos a sua expressão nos pacientes com AR-HIGM para triagem de possíveis casos de deficiência de CD40. Os valores relativos dos linfócitos CD19⁺CD40⁺ dos pacientes RC e RS apresentaram-se baixo em comparação com o controle sadio (**FIGURA 9**).

FIGURA 9. Fenotipagem dos linfócitos CD19⁺CD40⁺ de pacientes com HIGM. Podemos observar uma diminuição da expressão da molécula CD40 nas pacientes RC e RS. O “dot plot” de cada paciente apresentado é representativo de dois experimentos independentes. O “dot plot” para a marcação dos linfócitos CD19⁺CD40⁺ dos pacientes e controles estudados foram realizados a partir de um “gate” na população de linfócitos.

4.2 Análise genético-molecular

O estudo de imunodeficiências primárias em humanos tem sido essencial para o avanço da imunologia. Em particular, o estudo de imunodeficiência com hiper-IgM (HIGM) tem esclarecido os complexos mecanismos moleculares que controlam a troca de classe de imunoglobulinas e o processo de hipermutação somática (Notarangelo et al., 2006).

A maturação do repertório de anticorpos envolve dois processos, a recombinação para mudança de classe, levando à produção de anticorpos de isotipos diferentes (IgG, IgA e IgE) (Berek et al., 1991; Kuppers et al., 1993; Liu et al., 1989; Rajewsky, 1996). No momento do diagnóstico a média da concentração plasmática da IgG foi de 107,95 mg/dL (mínimo não detectado e máximo de 470), IgA foi 18,81 mg/dL (mínimo não detectado e máximo de 39) e a IgM foi 487,51 mg/dL (mínima de 34,1 e máxima de 1025). De acordo com estes valores, 14 pacientes apresentaram um padrão de IgM acima do valor normal, 13 apresentaram o valor de IgG baixo e 14 também apresentaram os valores de IgA abaixo do normal, de acordo com a idade e de acordo com os percentis 97, 50 e 03, adaptado de Fujimura, 1991. É importante notar que pacientes com suspeita de deficiência da AID não são suscetíveis a infecções por enterovírus como é observado em pacientes agamaglobulinêmicos (Mease e Ochs et al., 1985; McKinney e Katz et al., 1987). Isto sugere que a presença de anticorpos IgM, mesmo na ausência da hipermutação somática e na ausência do *switch* de classes, representam um meio eficaz de defesa contra patógenos extracelulares.

Considerando a heterogeneidade clínica e genética desses pacientes, o estudo molecular é fundamental para a realização do diagnóstico diferencial, delineamento terapêutico, aconselhamento genético e prognóstico dos casos. Além disso, a identificação de mecanismos genético-moleculares defeituosos contribuirá para o avanço do conhecimento sobre a resposta imune humana e sua suscetibilidade às infecções, área considerada estratégica no campo da biomedicina.

4.2.1 Estudo genético-molecular dos genes *AICDA* e *UNG*

A expressão dos genes *AICDA* e *UNG* é restrita às células B do centro germinativo (Revy et al., 2000).

Até os dias atuais, 80 mutações já foram relatadas no gene *AICDA*⁷, destas, 51 são *missense*, 18 *nonsense*, 6 deleções, 1 inserção e 3 defeitos no sítio de *Splice*. Dos 5 exons que codificam o gene *AICDA*.

O gene *UNG* inicialmente foi descrito contendo somente 4 exons com aproximadamente 13,5kb, incluindo a região promotora (Haug et al., 1994). Hoje sabe-se que todo o gene contém 7 exons, que geram através do mecanismo de *splicing* alternativo, duas isoformas da enzima (*UNG1* e *UNG2*), sendo uma mitocondrial e uma nuclear. Este gene se localiza no cromossomo 12q23-q24.1 (Haug et al., 1998). Existem 04 mutações descritas na literatura, todas acometem o domínio catalítico da proteína (Imai et al., 2003).

Sabendo que mutação nos genes *AICDA* e *UNG* causam AR-HIGM, analisamos sua expressão por Real Time – PCR. Nesta etapa avaliamos a expressão dos genes em questão utilizando cDNA extraído de células PBMCs de pacientes e controles, que foram previamente ativadas por 5 dias com LPS e IL-4, e células não estimuladas (Revy et al., 2000). O controle positivo utilizado na reação foi o gene da β -actina.

É claro que as enzimas AID e UNG têm um significado biológico importante, pois criam a diversidade de genes de imunoglobulinas e participam da hipermutação somática de genes. A importância da UNG na imunidade adaptativa foi inicialmente demonstrada usando camundongos *knockout* (Rada et al., 2002) e, posteriormente, em pacientes humanos carregando mutações inativadoras no gene *UNG* (Imai et al., 2003).

Analisamos conjuntamente as alterações na estrutura do DNA e RNAm. As células vivas dependem do funcionamento correto de milhares de genes, e cada um deles pode ser danificado por uma mutação nos diversos sítios da sequência que codifica as proteínas (exons), nas regiões flanqueadoras desses exons, regiões de processamento do RNAm (sítios de “*splice*”), ou nas regiões que promovem a expressão gênica (promotores).

Nesta etapa utilizamos três diferentes métodos na busca por mutações, Real Time-PCR, RT-PCR e o sequenciamento. Durante as investigações elucidamos duas mutações diferentes no gene *A/CDA*, em quatro pacientes não consanguíneos.

Para confirmar a viabilidade da estrutura dos transcritos de mRNA, utilizamos a análise pelo método RT-PCR semi-quantitativo. Nesta técnica utilizamos o cDNA obtido a partir do transcrito primário de células ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. O gene da β -actina foi utilizado como controle positivo da reação (**FIGURA 10**).

FIGURA 10. Expressão da β -actina. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio após a reação de RT-PCR. As células foram mantidas em cultivo com 25 ng/mL de LPS e 5 ng/mL de interleucina - 4 (IL-4) e foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por cinco dias (Revy et al., 2000). Destas, foi extraído o cDNA utilizado na técnica de RT-PCR. Transcritos da β -actina utilizados como controle interno da expressão gênica. *LPS*, Lipopolisacarídeo; *IL-4*, interleucina-4 (-), células não estimuladas, (+), células estimuladas.

4.2.1.1 Paciente AS

Nesta etapa, utilizamos células PBMCs ativadas e não ativadas. Podemos observar uma baixa expressão dos genes *AICDA* e *UNG* por Real Time – PCR, em comparação com o controle (**FIGURA 11A**). A baixa expressão do gene *AICDA* por Real Time – PCR foi confirmada com a ausência de banda no gel de agarose (**FIGURA 11B**). A partir destes dados, o sequenciamento genético do DNAg foi realizado para os genes *AICDA* e *UNG*, mas nenhuma alteração importante foi encontrada. O cDNA do paciente não pôde ser sequenciado pelo fato de não haver amplificação suficiente que permitisse essa análise.

FIGURA 11. Análise genético-molecular da paciente AS. **A)** Expressão relativa do gene *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. Totas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. Cont., Controle; AS, Paciente AS; pb, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas.

4.2.1.2 Paciente DA

Observamos uma diminuição da expressão relativa dos genes *AICDA* e *UNG* do paciente DA (**FIGURA 12A**). Quando analisamos o RNAm, observamos um padrão de banda diferente do padrão de banda apresentado pelo controle (**FIGURA 12B**), indicando uma possível deleção. O sequenciamento do cDNA revelou a deleção
 c.426_543delGATTATTTTACTGCTGGAATACTTTTGT
 AGAAAACCACGAAAGAACTTTCAAAGCCTGGGAAGGGCTGCATGAAAATTCAGT
 TCGTCTCTCCAGACAGCTTCGGCGCATCCTTTT, deleção do exon 4 que contém 117pb.

FIGURA 12. Análise genético-molecular do paciente DA. **A)** Expressão relativa do gene *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. **C)** Sequenciamento genético do cDNA para o gene *AICDA*, mostra a deleção do exon 4. Todas as reações de Real Time-PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; *DA*, Paciente DA; *pb*, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas.

4.2.1.3 Paciente EJ

O paciente EJ demonstrou baixa expressão relativa nos genes *AICDA* e *UNG* (**FIGURA 13A**). O padrão de bandas da corrida eletroforética apresentou-se normal em comparação com o controle (**FIGURA 13B**), e quando sequenciamos os genes, encontramos uma substituição *missense* na base de número 260 do cDNA, gerando a troca de uma cisteína para uma serina (**c.260C>G**) no exon 3 do gene *AICDA* (**FIGURA 13C**). Para confirmar a importância do aminoácido mutado, analisamos qual região da proteína AID esta mutação afeta. Esta troca de aminoácidos já está descrita na literatura, tendo um único caso no mundo (Durandy e Peron et al., 2006). A partir desta informação, descobrimos que a alteração ocorre no domínio da citidina desaminase (**FIGURA 13D**), causando a disfunção da enzima AID. Além de demonstrar que esta mutação acomete um sítio importante na função da AID, é importante destacar que este aminoácido mutado faz parte de um sítio conservado entre espécies, confirmado assim a sua importância na funcionalidade da proteína (**FIGURA 13E**).

FIGURA 13. Análise genético-molecular do paciente EJ. **A)** Expressão relativa dos genes *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. **C)** Cromatogramas correspondentes ao sequenciamento do gene *AICDA*. Mutação *missense* c.260G>C (p. Cys87Ser) localizadas no exon 3. **D)** O gene *AICDA* é responsável por codificar quatro domínios, NLS, domínio da citidina desaminase, domínio Apobec e NES. A seta vermelha indica a localização da mutação *missense* c.260G>C (p.Cys87Ser), que afeta o domínio da citidina desaminase, responsável pela função da AID. Círculos pretos são demonstrativos de mutações *missenses*, círculos vermelhos, deleções e/ou inserções; círculos verdes, mutações nonsense e círculos alaranjados, mutações *frameshift*. **E)** Sítio conservado em quatro outras espécies. O quadrado vermelho indica o aminoácido mudado. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; *EJ*, Paciente EJ; *pb*, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas.

4.2.1.4 Paciente GF

A paciente GF também demonstrou baixa expressão relativa nos genes *AICDA* e *UNG* (**FIGURA 14A**). O padrão de bandas da corrida eletroforética apresentou-se normal em comparação com o controle (**FIGURA 15B**), e quando sequenciamos os genes, encontramos a mesma substituição *missense* que o paciente EJ apresentou, na base de número 260 do cDNA, gerando a troca de uma cisteína para uma serina (c.260C>G) no exon 3 do gene *AICDA* (**FIGURA 14C**). Para confirmar a importância do aminoácido mutado, fomos verificar a qual região da proteína AID esta mutação afeta. Esta troca de aminoácidos já está descrita na literatura, tendo um único caso no mundo (Durandy e Peron et al., 2006). A partir desta informação, descobrimos que a alteração ocorre no domínio da citidina desaminase (**FIGURA 14D**), causando a disfunção da enzima AID. Além de demonstrar que esta mutação acomete um sítio importante na função da AID, é importante destacar que este aminoácido mutado faz parte de um sítio conservado entre espécies, confirmado assim a sua importância na funcionalidade da enzima AID (**FIGURA 14E**).

FIGURA 14. Análise genético-molecular da paciente GF. **A)** Expressão relativa dos genes *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. **C)** Cromatogramas correspondentes ao sequenciamento do gene *AICDA*. Mutação *missense* c.260G>C (p. Cys87Ser) localizadas no exon 3. **D)** O gene *AICDA* é responsável por codificar quatro domínios, NLS, domínio da citidina desaminase, domínio Apobec e NES. A seta vermelha indica a localização da mutação *missense* c.260G>C (p.Cys87Ser), que afeta o domínio da citidina desaminase, responsável pela função da AID. Círculos pretos são demonstrativos de mutações *missenses*, círculos vermelhos, deleções e/ou inserções; círculos verdes, mutações nonsense e círculos alaranjados, mutações *frameshift*. **E)** Sítio conservado em quatro outras espécies. O quadrado vermelho indica o aminoácido mudado. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; *GF*, Paciente GF; *pb*, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas; *Ser*, Serina; *Pro*, Prolina; *Cys*, Cisteína; *Tyr*, Tirosina; *Val*, Valina.

4.2.1.5 Paciente IM

A análise dos genes *AICDA* e *UNG* da paciente IM revelou uma baixa expressão relativa dos genes, por Real Time-PCR em comparação com o controle (**FIGURA 15A**). A baixa expressão do gene *AICDA* por Real Time – PCR foi confirmada com a ausência de banda no gel de agarose (**FIGURA 15B**). A partir destes dados, o sequenciamento genético do DNAg foi realizado para os genes *AICDA* e *UNG*, mas nenhuma alteração importante foi encontrada. O cDNA do paciente não pôde ser sequenciado pelo fato de não haver amplificação suficiente que permitisse essa análise.

FIGURA 15. Análise genético-molecular da paciente IM. A) Expressão relativa do gene *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; *IM*, Paciente IM; *pb*, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas

4.2.1.6 Paciente KM

A análise dos genes *AICDA* e *UNG* da paciente KM revelou uma baixa expressão relativa dos genes, por Real Time-PCR em comparação com o controle (**FIGURA 16A**). A baixa expressão do gene *AICDA* por Real Time – PCR foi confirmada com a ausência de banda no gel de agarose (**FIGURA 16B**). A partir destes dados, o sequenciamento genético foi realizado com o cDNA amplificado da paciente, mas não foi encontrado mutação.

FIGURA 16. Análise genético-molecular da paciente KM. **A)** Expressão relativa do gene *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; *KM*, Paciente KM; *pb*, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas.

4.2.1.7 Paciente MC

A paciente MC apresenta um padrão de expressão diferente dos outros pacientes. Esta paciente apresentou uma alta expressão dos genes *AICDA* e *UNG* (**FIGURA 17A**). A partir deste momento, a ideia era que esta paciente apresentasse alguma inserção, mas a amplificação por RT-PCR mostrou que o padrão de banda apresentado é normal em comparação com o controle da reação (**FIGURA 17B**). O sequenciamento genético do cDNA para os genes *AICDA* e *UNG* não mostrou alteração.

FIGURA 17. Análise genético-molecular da paciente MC. **A)** Expressão relativa do gene *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; *MC*, Paciente MC; *pb*, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas.

4.2.1.8 Paciente MV

Observando as análises a expressão relativa dos genes *AICDA* e *UNG* por Real Time – PCR, observamos uma baixa expressão em comparação com o controle da reação (**FIGURA 18A**). Analisando a amplificação dos produtos de PCR, podemos ver um padrão normal de bandas quando comparamos com o controle da reação (**FIGURA 18B**). A partir destes dados, o sequenciamento genético do cDNA foi realizado para os genes *AICDA* e o sequenciamento genético do DNAg foi realizado para o gene *UNG*, mas nenhuma alteração importante foi encontrada.

FIGURA 18. Análise genético-molecular da paciente MV. **A)** Expressão relativa do gene *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. Cont., Controle; AS, Paciente AS; pb, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas.

4.2.1.9 Paciente RC

A análise genética da paciente RC mostrou uma diminuição da expressão relativa dos genes *AICDA* e *UNG* por Real Time-PCR (**FIGURA 19A**). Quando analisamos o RNAm, observamos um padrão de banda diferente do padrão de banda apresentado pelo controle (**FIGURA 19B**), indicando uma possível deleção. O sequenciamento do cDNA revelou a deleção c.426_543delGATTATTTTTACTGCTGGAATACTTTTGTAGAAAACCGAAAGAAC TTTCAAAGCCTGGGAAGGGCTGCATGAAAATTCAGTTCGTCTCTCCAGACAGCT TCGGCGCATCCTTTT, deleção total do exon 4 (contém 117pb). Esta deleção ocorre por um defeito no sítio de *splice*, este erro acarreta na deleção total do exon 4.

FIGURA 19. Análise genético-molecular da paciente RC. **A)** Expressão relativa do gene *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. **C)** Sequenciamento genético do cDNA para o gene *AICDA*, mostra um defeito de *splice*, acarretando na deleção total do exon 4. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; *DA*, Paciente DA; *pb*, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas

4.2.1.10 Paciente YE

A expressão relativa dos genes *AICDA* e *UNG* para o paciente YE apresentou-se normal em comparação com o controle (**FIGURA 20A**). Este mesmo dado foi confirmado com a amplificação dos genes e corrida eletroforética (**FIGURA 20B**). O sequenciamento do cDNA foi realizado para o gene *AICDA* e para o gene *UNG* foi realizado o sequenciamento do DNAg. Nesta caso, a AR-HIGM foi descartada neste paciente.

FIGURA 20. Análise genético-molecular da paciente RC. A) Expressão relativa do gene *AICDA* e *UNG* realizada com células PBMC ativadas e não ativadas com LPS e IL-4. **B)** Corrida eletroforética realizada com RNAm extraído de células previamente ativadas com LPS e IL-4. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; *AS*, Paciente AS; *pb*, Pares de bases, (+), células estimuladas; (-), células não estimuladas.

4.2.2 Estudo genético-molecular do gene CD40

Tem sido demonstrado em modelos animais que a expressão de CD40 é controlada por uma regulação pós-transcricional, que ocorre através de *splicing* alternativo (Tone et al., 2001). Em particular, existem cinco isoformas da molécula CD40 (tipos I, II, III, IV e V) gerados por *splicing* alternativo que ocorrem na região entre o exon 05 e exon 09. Os tipos III e IV, ao contrário do tipo II, contêm uma região transmembrana que permite que elas sejam expressas em superfície celular. Estes dados sugerem que a sinalização através de CD40 é regulada por um *feedback* negativo, que depende do mecanismo de *splicing* alternativo para formar o produto final. Dados semelhantes foram obtidos em seres humanos também. Assim, podemos especular que um desequilíbrio da expressão pode gerar um produto de *splicing* alternativo errado, que leva a um fenótipo de HIGM (Tone et al., 2001).

Muito se sabe sobre as consequências que um defeito no CD40 causa no sistema imunológico. Esta informação foi derivada de estudos feitos com pacientes deficientes de CD40 e camundongos *knockout*, e tem demonstrado o papel crítico quando há uma ausência de sinalização entre as células B e células T via interação CD40-CD40L. Na verdade, o distúrbio imunológico que resulta em um defeito no CD40 ou CD40L é considerado uma imunodeficiência combinada ao invés de humoral. Pacientes com deficiência de CD40 pode oferecer a única oportunidade para investigar essa questão através da observação clínica.

Até o momento, foram demonstradas somente 4 mutações que acarretam uma deficiência no CD40, sendo 03 mutações *missense* e um erro de *splicing* em sitio indefinido (Ferrari et al., 2001; Kutukculer et al., 2003). Analisamos geneticamente os pacientes que demonstraram uma baixa expressão da molécula CD40 na superfície da célula B CD19⁺. Dos 11 pacientes estudados, observamos uma diminuição do CD40 na paciente RS.

Analisando a expressão relativa do gene *CD40*, observamos uma baixa expressão por Real Time-PCR (**FIGURA 21A**). A análise por RT-PCR do cDNA apresentou-se normal em comparação com o controle da reação (**FIGURA 21B**).

FIGURA 21. Análise genético molecular do gene CD40. **A)** A análise por Real Time-PCR mostrou uma diminuição da expressão gênica quando comparado com o controle. É importante ressaltar que os primers utilizados estão localizados fora das regiões de *splicing* alternativo. **B)** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio após a reação de RT-PCR. Análise do gene *CD40* por RT-PCR feito com o transcrito de células não estimuladas. Todas as reações de Real Time –PCR foram feitas em triplicata. *Cont.*, Controle; (-), células não estimuladas; *pb*, Pares de base.

4.2.3 Estudo genético-molecular do gene *INO80*

A partir do momento que se sabe que mutantes do complexo INO80 apresentam hipersensibilidade a agentes que causam danos ao DNA, e que a enzima AID quando super expressa, pode causar danos ao DNA por um mecanismo ainda não descrito, investigamos se os pacientes estrangeiros (1 francês e 3 turcos), que foram investigados previamente para os genes *AICDA*, *UNG* e *CD40* apresentam algum tipo de alteração no complexo INO80. A primeira análise realizada nestes pacientes foi feita pelo grupo de pesquisadores da Dra. Anne Durandy, onde se observou que um dos quatro pacientes apresentou alteração na proteína, verificada por Western- Blot (dados não mostrados).

O sequenciamento genético dos 36 exons que compõe o gene *INO80* foi realizado e foram encontradas duas mutações *missense* em heterozigose. A primeira mutação foi encontrada no exon 4, onde há uma troca de uma Guanina para uma Adenina na base 24012 do DNAg (**g.24012 G>A**) (**FIGURA 22A**). A segunda mutação foi encontrada no exon 26, onde há uma substituição de uma Guanina para uma Timina na base 99976 do DNAg (**g.99976 G>T**) (**FIGURA 22B**) do paciente OD. As mutações foram confirmadas no cDNA do paciente.

FIGURA 22. Análise genético molecular do gene INO80. **A)** Sequenciamento genético do exon 4 do gene *INO80*, mostrando a troca de uma Guanina para uma Adenina na base 24012 do DNAg (**g.24012 G>A**). **B)** Sequenciamento genético do exon 26 do gene *INO80*, mostrando a troca de uma Guanina para uma Timina na base 99976 do DNAg (**g.99976 G>T**) no do paciente OD. As mutações foram confirmadas no cDNA do paciente. *Ser*, Serina; *Glu*, Ácido Glutâmico; *Ala*, Alanina; *Leu*, Leucina; *Asp*, Ácido aspártico; *Val*, Valina.

Os pacientes brasileiros com a síndrome de HIGM vivem num meio ambiente diverso, distinto dos padrões do hemisfério norte, estando sujeitos à exposição a diferentes antígenos microbianos e patógenos característicos de regiões tropicais, além de serem expostos precocemente a um protocolo de imunizações que inclui microrganismos vivos, potencialmente patogênicos para eles. Não há conhecimento detalhado sobre as possíveis repercussões que tais práticas induzem nestes pacientes e quais padrões de mutações levam a síndrome de HIGM em pacientes nesta população brasileira, amplamente miscigenada.

Em resumo, nossos pacientes apresentaram infecções de repetição com predomínio em via respiratória superior, inferior e hiperplasia linfóide, sendo que uma paciente apresentou infecção por micobacteriose cutânea, atípico para deficientes da enzima AID.

Identificamos duas mutações *missense* e duas deleções do exon 4 por defeito de *splicing* no gene *AICDA*. Identificamos também duas mutações *missense* no gene *INO80*. É importante ressaltar que as deleções do exon 4 são inéditas na literatura. Além disso, o paciente OD é o primeiro caso de paciente com mutação no gene *INO80*. As expressões gênicas dos genes *AICDA* e *UNG* foram simultaneamente baixas, o que sugere uma cooperação entre as enzimas, o que ainda não foi analisado na literatura.

Os resultados obtidos neste trabalho foram fundamentais, pois permite que a equipe médica que atende cada uma das famílias realize um aconselhamento genético com os pacientes com o diagnóstico genético confirmado, onde os futuros recém-nascidos poderão ser tratados com IVIG antes do desenvolvimento dos sintomas da AR-HIGM, o que será de inestimável valor para estes indivíduos uma vez que a IVIG previne as infecções causadas pelos patógenos extracelulares melhorando a qualidade de vida desses pacientes.

Até agora, nenhuma relação genótipo-fenótipo pode ser estabelecida entre os pacientes com deficiência de AID. A descrição de novos casos é extremamente útil para que no futuro talvez, consigamos estabelecer essa relação. No futuro, com o aumento dos deficientes identificados no Brasil, será possível definir com precisão o perfil de mutações nos pacientes brasileiros.

5 CONCLUSÃO

- A citometria de fluxo demonstrou ser uma importante técnica na triagem e diagnóstico inicial de pacientes com deficiência na molécula CD40.
- As mutações observadas nos genes AICDA, UNG, CD40 e INO80 foram heretogêneas. Identificamos uma mutação *missense* em dois pacientes, duas deleções do exon 4 por defeito no mecanismo de *splicing*, e duas mutações *missense* em heterozigose no gene *INO80*. Estes dados são de extrema importância, porque ainda não foi realizado um estudo genético em pacientes brasileiros com AR-HIGM.
- A análise genético-molecular se mostrou de extrema importância, pois futuramente será possível um aconselhamento genético nas famílias onde foi finalizado o diagnóstico genético, possibilitando assim uma triagem dos futuros recém-nascidos.
- Infelizmente, o fato de existirem poucos pacientes com diagnóstico genético confirmado de AR-HIGM, a heterogeneidade genotípica e fenotípica dos mesmos, impossibilita a realização da correlação genótipo-fenótipo. Num futuro próximo, com o estudo de mais pacientes, este dado poderá ser obtido.

REFERÊNCIAS*

- Aasland R, Olsen LC, Spurr NK, et al. Chromosomal assignment of human uracil-DNA glycosylase to chromosome 12. *Genomics*. 1990;7(1):139-41.
- Allen R, Armitage R, Conley M, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*. 1993;259:990-3.
- Armstrong JA e Emerson BM. Transcription of chromatin: these are complex times. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8:165-72.
- Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell*. 1993;72:291-300.
- Bakshi R, Mehta AK, Sharma R, et al. Caracterização de um SWI2/SNF2 humana como proteína hINO80: demonstração de atividade catalítica e DNA de ligação. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339:313-20.
- Bakshi R, Prakash T, Dash D, et al. Em silico caracterização da subfamília de INO80 SWI2/SNF2 proteínas remodelação da cromatina. *Biochem. Biophys Res Commun*. 2004;320:197-204.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- Barrett TB, Shu G, Clark EA. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J Immunol*. 1991;146(6):1722-9.
- Begum NA, Kinoshita K, Kakazu N, et al. Uracil DNA glycosylase activity is dispensable for immunoglobulin class switch. *Science*. 2004;305(5687):1160-3.
- Berberich L, Shu G, Clark EA. Cross linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-Kappa B. *J Immunol*. 1994;153:4357-67.
- Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*. 1991;67:1121-9.
- Bonilla FAI, Bernstein L, Khan D, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;94(5 Suppl 1):S1-63.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Brodeur SR, Angelini F, Bacharier LB, et al. C4b-binding protein (C4PB) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity*. 2003;18:837-48.

Buckley RH. Immunodeficiency diseases. *JAMA*. 1992;268(20):2797-806.

Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin*. 1976;26(2):119-21.

Caradonna S, Muller-Weeks S. The nature of enzymes involved in uracil-DNA repair: isoform characteristics of proteins responsible for nuclear and mitochondrial genomic integrity. *Curr Protein Pept Sci*. 2001;2(4):335-47.

Cheng G, Baltimore D. TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev*. 1996;10(8):963-73.

Chomczynski P, and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.

Clark EA. CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens*. 1990;36(1):33-6.

Condino-Neto A, Franco JL, Trujillo-Vargas C, et al. Critical issues and needs in management of primary immunodeficiency diseases in Latin America. *Allergologia et Immunopathologia*. 2010. In press.

Conley ME, Notarangelo LD. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol*. 1999;93(3):190-7.

Conley ME, Larche M. Hyper IgM syndrome associated with defective CD40-mediated B cell activation. *J Clin Invest*. 1994;94(4):1404-9.

Cooper, M. A., T. L. Pommering, et al. Primary immunodeficiencies. *Am Fam Physician*. 2003;68(10):2001-8.

Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, et al. A hypermorphic Ikb α mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest*. 2003;112:1108–15.

Crews S, Griffin J. A single VH gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: somatic mutation is correlated with the class of the antibody. *Cell*. 1981;25(1):59-66.

Cunningham-Rundles C and Ponda P. Molecular Defects in T- and B-cell Primary Immunodeficiency Diseases. *Nat Rev*. 2005;5:880-92.

DiSanto JP, Bonnefoy JY. "CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM." *Nature*.1993;361(6412):541-3.

Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity*. 2008;28(5):630-8.

Durandy, A. Hyper-IgM syndromes: a model for studying the regulation of class switch recombination and somatic hypermutation generation. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(4):815-8.

Durandy A, Hivroz C, Mazerolles F, et al. Abnormal CD40-mediated activation pathway in B lymphocytes from patients with hyper-IgM syndrome and normal CD40 ligand expression. *J Immunol*. 1997;158(6):2576-84.

Durandy A, Revy P, Imai K, et al. Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. *Immunol Rev*. 2005;203:67-79.

Durandy A, Peron S, Taubenheim N, et al. Activation-induced cytidine deaminase: structure-function relationship as based on the study of mutants. *Hum Mutat*. 2006;27(12):1185-91.

Durandy A, Wahn V, Petteway S, et al. Immunoglobulin replacement therapy in primary antibody deficiency diseases--maximizing success. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;136(3):217-29.

Eisen JA, Sweder KS e Hanawalt PC. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:2715-23.

Erdos M, Lakos G, Dérfalvi B, et al. Molecular genetic analysis of Hungarian patients with the hyper-immunoglobulin M syndrome. *Mol Immunol*. 2008;45(1):278-82.

Etzioni A, Ochs HD. The hyper IgM syndrome--an evolving story. *Pediatr Res*. 2004;56(4):519-25.

Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, et al. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature*. 2001;413(6856):639-43.

Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:12614-9.

Fujimura M. Níveis séricos das subclasses de imunoglobulina G em crianças normais e nefróticas [tese (Doutorado)]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1991.

Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, et al. Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 90:2170-3.

Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases: P An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;12:776-94.

Ghosh S, May MJ and Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225–60.

Gourzi P, Leonova T. A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus. *Immunity*. 2006;24(6):779-86.

Graf D, Muller S, Korthauer U, et al. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol*. 1995;25:1749–54.

Grumach AS, Duarte AJ, Bellinati-Pires R, et al. Brazilian report on primary immunodeficiencies in children: 166 cases studied over a follow-up time of 15 years. *J Clin Immunol*. 1997;17(4):340-5.

Hakkarainen T, Hemminki A, Pereboev AV, et al. CD40 is expressed on ovarian cancer cells and can be utilized for targeting adenoviruses. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(2):619-24.

Hase K, Takahashi D, Masashi E, et al. Activation-induced cytidine deaminase deficiency causes organ-specific autoimmune disease. *PLoS One*. 2008;3(8):e3033.

Haug T, Skorpen F, Aas AP, et al. Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(6):1449-57.

Holder MJ, Liu YJ, Defrance T, et al. Growth factor requirements for the stimulation of germinal center B cells: evidence for an IL-2-dependent pathway of development. *Int Immunol*. 1991;3:1243-51.

Hong R. Update on the immunodeficiency diseases. *Am J Dis Child*. 1990;144(9): 983-92.

Hu HM, O'Rourke K, Boguski MS, et al. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J Biol Chem*. 1994;269:30069-72.

Imai K, Catalan N, Plebani A, et al. Hyper-IgM syndrome type 4 with a B lymphocyte-intrinsic selective deficiency in Ig class-switch recombination. *J Clin Invest*. 2003;12:136-42.

Iseki M, Heiner DC. Immunodeficiency disorders. *Pediatr Rev.* 1993;14(6):226-36.

Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B? *Trends Cell Biol.* 2000;10:129–33.

Ito S, Nagaoka H. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(7):1975-80.

Jabara HH, Brodeur SR and Geha RS. Glucocorticoids upregulate CD40 ligand expression and induce CD40L-dependent immunoglobulin isotype switching. *J Clin Invest.* 2001;107:371-8.

Jain A, Ma CA, Liu S, et al. Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. *Nat Immunol.* 2001;2:223-38.

Kadonaga JT. Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell.* 1998;92:307-13.

Kasahara Y, Kaneko H, Fukao T, et al. Hyper-IgM syndrome with putative dominant negative mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(4):755-60.

Kinoshita K, Harigai M, Fagarasan S, et al. A hallmark of active class switch recombination: transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12620-3.

Koho H, Paulie S, Ben-Aissa H, et al. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. *Cancer Immunol Immunother.* 1984;17(3):165-72.

Kornberg RD and Lorch Y. Twenty-ve years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* 1999;98:285-94.

Korthäuer U, Graf D, Mages H, Brière F, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature.* 1993;11:539-41.

Krantman HJ, Stiehm ER, Stevens RH, et al. Abnormal B cell differentiation and variable increased T cell supression in immunodeficiency with hyper-IgM. *Clin Exp Immunol.* 1980;40:147-56.

Krokan HE, Nilsen H, Skorpen Frank, et al. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett.* 2000;476(1-2):73-7.

Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, et al. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*. 1993;12:4955–67.

Kutukculer N, Moratto D, Aydinok Y, et al. Disseminated cryptosporidium infection in an infant with hyper-IgM syndrome caused by CD40 deficiency. *J Pediatr*. 2003;142(2):194-6.

Lafage-Pochitaloff M, Herman P, Birg F, et al. Localization of the human CD40 gene to chromosome 20, bands q12-q13.2. *Leukemia*. 1994;8(7):1172-5.

Lee W, Torgerson T, Schumacher M, et al. Molecular analysis of a large cohort of patients with the hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome. *Blood*. 2005;105:1881-90.

Leiva LE, Zelazc M, Oleastro M, et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol*. 2007;27:101-8.

Life P, Gauchat JF, Schnuriger V, et al. T cell clones from an X-linked hyper-immunoglobulin (IgM) patient induce IgE synthesis in vitro despite expression of nonfunctional CD40 ligand. *J Exp Med*. 1994;180:1775–84.

Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al. DCs induce CD40 independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol*. 2002;3:822-9.

Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, et al. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*. 1989;342:929–31.

Lougaris V, Badolato R, Ferrari S, et al. Hyper immunoglobulin M syndrome due to CD40 deficiency: clinical, molecular, and immunological features. *Immunol Rev*. 2005;203:48-66.

Luengo-Blanco M, Prando C, Bustamante J, et al. Essential role of nuclear factor-kappaB for NADPH oxidase activity in normal and anhidrotic ectodermal dysplasia leukocytes. *Blood*. 2008;112(4):1453-60.

Luger K, Richmond TJ. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol*. 1998;8:33-40.

Luttges J, Stigge C. Rare ductal adenocarcinoma of the pancreas in patients younger than age 40 years. *Cancer*. 2004;100(1):173-82.

Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, et al. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*. 1997;385(6616):540-4.

Maniatis T. A ubiquitin ligase complex essential for the NF- κ B, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev.* 1999;13:505–10.

Manis JP, Tian M, Alt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* 2002;23:31–9.

McKinney RE, McKinney S, Katz L, et al. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis.* 1987;9(2):334-56.

Mease PJ, Ochs HD, Corey L, et al. Echovirus encephalitis/myositis in X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med.* 1985;313(12):758.

Minegishi Y, Lavoie A, Cunningham-Rundles C, et al. Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome. *Clin Immunol.* 2000;97(3):203-10.

Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:655–92.

Mueller BU and Pizzo PA. Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies. *J Pediatr.* 1995;126(1):1-10.

Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, et al. Activation induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell.* 2000;102:565-75.

Muramatsu M, Sankaranand VS, Shrikant A, et al. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.* 1999;274(26):18470-6.

Neuberger MS. Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(2):124-32.

Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clinical Immunology.* 2009;124(6):1161-78.

Notarangelo LD, Lanzi G, Peron S, et al. Defects of class-switch recombination. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(4):855-64.

Notarangelo LD, Paroli O, Albertini A, et al. Analysis of X-chromosome inactivation in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1): evidence for involvement of different hematopoietic cell lineages. *Hum Genet.* 1991;8:103-34.

Notarangelo LD, Peitsch MC. CD40Lbase: a database of CD40L gene mutations causing X linked hyper IgM syndrome. *Immunol Today.* 1996;17:511-6.

Pascual-Salcedo D, De la Concha EG, et al. Cellular basis of hyper IgM immunodeficiency. *J Clin Lab Immunol*. 1983;10(1):29-34.

Pauklin S, Petersen-Mahrt SK. Progesterone inhibits activation-induced deaminase by binding to the promoter. *J Immunol*. 2009;183(2):1238-44.

Pearl LH. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutat Res*. 2000;460(3-4):165-81.

Peterson CL. Multiple Switches to turn on chromatin? *Curr. Opin. Genet. Dev*. 1996; 6:171-5.

Quartier P, Bustamante J, Sanal O, et al. Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency. *Clin Immunol*. 2004;110:22-9.

Rada C, Williams GT, Nilsen H, et al. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol*. 2002;12(20): 1748-55.

Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996; 381:751-8.

Revy P, Geissmann F, Debré M, et al. Normal CD40-mediated activation of monocytes and dendritic cells from patients with hyper-IgM syndrome due to a CD40 pathway defect in B cells. *Eur J Immunol*. 1998;28(11):3648-54.

Revy P, Muto T, Levy Y, et al. Activation induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*. 2000;102:565-75.

Reynaud CA, Aoufouchi S, Faili A, et al. What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat Immunol*. 2003;4(7):631-8.

Rosen FS, Cooper MD, Ralph JP, et al. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med*. 1995;333(7):431-40.

Rosen FS, Kevy SV, Merler E, et al. Recurrent bacterial infections and dysgammaglobulinemia: deficiency of 7S gammaglobulins in the presence of elevated 19S gammaglobulins. *Pediatrics*. 1961;28:182-95.

Rothman P, Li SC, Alt FW. The molecular events in heavy chain class-switching. *Semin Immunol*. 1989 Sep;1(1):65-77.

Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res*. 2001; 89(12):1092-103.

Selsing E, Storb U. Somatic mutation of immunoglobulin light-chain variable-region genes. *Cell*. 1981;25(1):47-58.

Simpson L, Thiemann OH. Sense from nonsense: RNA editing in mitochondria of kinetoplastid protozoa and slime molds. *Cell*. 1995;81(6):837-40.

Snapper CM, Marcu KB, Zelazowski P. The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility". *Immunity*. 1997;6(3):217-23.

Stavnezer J. Molecular processes that regulate class switching. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;245:127-68.

Stiehm ER, Fudenberg HH. Clinical and immunologic features of dysgammaglobulinemia type I. Report of a case diagnosed in the first year of life. *Am J Med*. 1966;40(5):805-15.

Stout RD, Suttles J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today*. 1996;17:487-92.

Szomolanyi-Tsuda E, Brien JD, Dorgan JE, et al. Antiviral T-cell-independent type 2 antibody responses induced in vivo in the absence of T and NK cells. *Virology*. 2001;280:160–8.

Ta VT, Nagaoka H. AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol*. 2003;4(9):843-8.

Takao M, Kanno S. Novel nuclear and mitochondrial glycosylases revealed by disruption of the mouse Nth1 gene encoding an endonuclease III homolog for repair of thymine glycols. *EMBO J*. 2002;21(13):3486-93.

Tan J, Town T. CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *EMBO J*. 2002;21(4):643-52.

Teng G, Hakimpour P, Landgraf P, et al. MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity*. 2008;28(5):621-9.

Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000; 67(1): 2-17.
Van Kooten C. and Banchereau J. Functional role of CD40 and its ligand. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;113(4):393-9.

Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, et al. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev*. 2000;176:154–70.

Weigert MG, Cesari IM. Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature*. 1970;228(5276):1045-7.

Whitney J. Testing for differences with the nonparametric Mann-Whitney U test. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 1997;24(1):12.

Workma JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67:545-79,

Yu K, Huang FT, Lieber MR. DNA substrate length and surrounding sequence affect the activation-induced deaminase activity at cytidine. *J Biol Chem.* 2004; 279(8):6496-500.

Zelazco M, Carneiro-Sampaio M, Cornejo de Luigi M, et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: First report from eight countries participating in the LAGID. *J Clin Immunol.* 1998;18(2):161-6.

Zhu H, Wang ZY, Hansoon HA. Visualization of proliferating cells in the adult mammalian brain with the aid of ribonucleotide reductase. *Brain Res.* 2003;977(2): 180-9.

ANEXOS

ANEXO A – Estudo de Pacientes com Suspeita de Imunodeficiência Primária

Paciente encaminhado por:					
Nome	H.C.	Ano Nascimento _____	Sexo M F	Idade - Diagnóstico Anos _____ Meses _____	
	Tel:				
Consangüinidade Sim () Não (0) Tipo _____		Nº. Gesta: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 NE*	No. filhos: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 NE*	Sadios: Sim()Não () Infec.repet. Sim () Não ()	
Antecedentes Familiares				Heredograma	
Falecimentos precoces Sim () Não ()		Parentesco _____	Idade de óbito _____	Dx IDP Sim () Não () DGC Sim()Não () Outra _____	
Vacinas	BCG Sim () Não () Não especificado ()	Idade de aplicação _____ meses	Reação adversa Sim() Não ()	Adenomegalias BCG disseminada Outra _____	
Hep B – S ()N ()NE*	DPT/dT– S ()N ()NE*	Tríplice – S ()N ()NE*	Hib – S ()N ()NE*	Varicela – S ()N ()NE*	VTV – S ()N ()NE*
Sabin – S ()N ()NE*	Salk – S ()N ()NE*	Sarampo – S ()N ()NE*	Mening – S ()N ()NE*	Pneumo S ()N ()NE*	Pólio – S ()N ()NE*
Reação adversa? ()sim ()não.			Especificar: vacina _____ Manifestação _____		
DNPM	BDNPM S()N()NE*		RDNPM S()N()NE*. Detalhar:		
DPE	>p90% S()N()	<p10% S()N(0)	>p10% e <p90% S()N(0)		
1ª manifestação			Motivo de Estudo		
Idade _____ano _____meses		Local		Infec. Repetição Sim ()Não () Manifest. Grave Sim ()Não () História Familiar Sim ()Não () Outro Sim ()Não (0). Especificar: _____	
Manifestações	No. de episódios	Microorg. isolado Sim ()Não ()	Microorganismo Isolado		Localização
1 Otite					
2 Pneumonia					
3 Pneumonia / DP					
3 Amigdalite					
4 Linfonodo					
5 ITU					
6 Meningite					
7 Artrite					
8 Osteomielite					
9 Diarréia					
10 Infecções de Pele Especificar:					
11 Artrite					
12 Sepse					
13 Colangite esclerosante					

14 Outras					
Granulomas Sim () Não (0)	Nº episódios	Localização 1 TGI 2 Urinário	3 Cardíaco Outra: _____	Microorg. Isolado	No. Hospitalizações
Exames Laboratoriais – início investigação					
HMG	Hb	Leuco	NT	LT	PLQ
Imunoglobulinas (antes da reposição de Gama)	IgG	IgM	IgA	IgE	
Complemento	C3	C4	CH50		
Quimiotaxia		Mono	PMN		
Mono	Mig. Espontânea				
PMN	Mig estim. soro nl				
	Mig. estim. soro pcte				
Superóxido	Mono	PMN	NBT		
Espontâneo			Repouso		Estimulado
Estimulado					
Tratamento 1 IFN γ 2 ITRA 3 FLUCO 4 SMX +TMP 5 Prednisona 6 TMO 7 Outros	Administração Sim () Não (0) Data de início _____	Tratamento atual Sim () Não (0)	Óbito Sim () Não (0) Idade _____	Causa 1 Conhecida 2 Desconhecida	
			Autópsia Sim () Não ()	Laudo	

* = não especificado

OUTRAS MANIFESTACOES – LIVRE RELATO DE OCORRENCIAS

ANEXO B.1 – Termo de Consentimento livre e esclarecido (maiores de 18 anos)

ESTUDO: DEFEITOS GENÉTICO-MOLECULARES E ASPECTOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM SÍNDROME DE HIPER-IGM AUTOSSÔMICA

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu (nome e profissão),,
 residente e domiciliado a,
 portador da cédula de identidade, RG, e inscrito no
 CPF/MF..... nascido(a) em ____ / ____ / ____ , abaixo assinado(a),
 concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo
 “Defeitos genético-moleculares e aspectos clínicos de pacientes com síndrome de
 Hiper-IgM autossômica.”, declaro que obtive todas as informações necessárias, bem
 como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

O principal objetivo deste estudo é analisar o espectro clínico, imunológicos, epidemiológicos e defeitos genético-moleculares estabelecendo correlação genótipo x fenótipo de pacientes brasileiros com síndrome de Hiper IgM autossômica.

Estou ciente que:

- I. O estudo se faz necessário para que se possa analisar o espectro clínico, imunológicos, epidemiológicos e defeitos genético-moleculares estabelecendo correlação genótipo x fenótipo de pacientes brasileiros com síndrome de Hiper IgM autossômica;
- II. Serão realizados:
 - a) Exame de sangue consistirá de não mais de 20 mL de sangue a serem extraídos em um período de um mês, sendo que cada amostra será de

não mais de 20 mL. Os riscos da retirada de sangue são hematoma local (rouxidão), algum desconforto e, raramente, tontura.

- III. Essa(s) coleta(s) será (ao) feita(s) apenas para este estudo e, com indivíduos portadores da Hiper-IgM autossômica, em nada influenciará (influenciarão) o meu tratamento; não vai (vão) me curar; não vai (vão) me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue);
- IV. A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo;
- V. Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI. A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII. Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII. Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Estes estudos podem melhorar o entendimento da doença levando a formas mais eficazes de diagnóstico e tratamento no futuro. É provável que o voluntário em questão não seja beneficiário direto destes avanços.

Quaisquer dúvidas, que possam ocorrer com relação a esse estudo, poderão ser contatados:

- Dr. Antonio Condino Neto na Universidade de São Paulo, Laboratório de Imunodeficiência, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo –SP 05508-900, telefone (11) 3091-7435.

- Stefanie Gomes Klaver na Universidade de São Paulo, Laboratório de Imunodeficiência, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo-SP 05508-900, Telefone (11) 8038-1035 ou (11) 3091-7435

São Paulo, de de 2011.

() Paciente

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Stefanie Gomes Klaver
Telefone: (11) 3091-7435

ANEXO B.2 – Termo de Consentimento livre e esclarecido (menores de 18 anos)

ESTUDO: DEFEITOS GENÉTICO-MOLECULARES E ASPECTOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM SÍNDROME DE HIPER-IGM AUTOSSÔMICA

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(à) seu (sua) filho(a).

Eu....., RG , abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) nascido(a) em ____ / ____ /____ , seja voluntário do estudo “Defeitos genético-moleculares e aspectos clínicos de pacientes com síndrome de Hiper-IgM autossômica”. Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

O principal objetivo deste estudo é analisar o espectro clínico, imunológicos, epidemiológicos e defeitos genético-moleculares estabelecendo correlação genótipo x fenótipo de pacientes brasileiros com síndrome HIGM autossômica.

Estou ciente de que:

- I. O estudo se faz necessário para que se possa analisar o espectro clínico, imunológicos, epidemiológicos e defeitos genético-moleculares estabelecendo correlação genótipo x fenótipo de pacientes brasileiros com síndrome de Hiper IgM autossômica;
- II. Serão feitas do(a) meu(minha) filho(a): coleta de sangue consistirá de não mais de 20 mL de sangue a serem extraídos em um período de 1 meses, sendo que cada amostra será de não mais de 20 mL. Os riscos da retirada de

sangue são hematoma local (rouxidão), algum desconforto e, raramente, tontura;

- III. Estas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o tratamento de meu (minha) filho(a); e não vai (vão) me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue);
- IV. A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- V. Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- VI. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho(a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médicos a que ele(ela) estiver sendo submetido;
- VII. Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;
- VIII. Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;
- IX. Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP - no Fone 3091-7733 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

a) Nós como pais, concordamos em passar o telefone e endereço para o pesquisador.

- Contatos dos pais:

Nome pai: _____

Nome mãe: _____

Telefone residencial: _____ Telefone celular: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Quaisquer dúvidas, que possam ocorrer com relação a esse estudo, poderão ser contatadas:

- Dr. Antonio Condino Neto na Universidade de São Paulo, Laboratório de Imunodeficiência, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo –SP 05508-900, telefone (11) 3091 7435.
- Stefanie Gomes Klaver na Universidade de São Paulo, Laboratório de Imunodeficiência, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, São Paulo-SP 05508-900, Telefone (11) 8038-1035 ou (11) 3091-7435.

OBS: Assinalar abaixo com (x):

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 2011.

() Paciente / () Responsável

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Stefanie Gomes Klaver
Telefone: (11) 3091-7435