

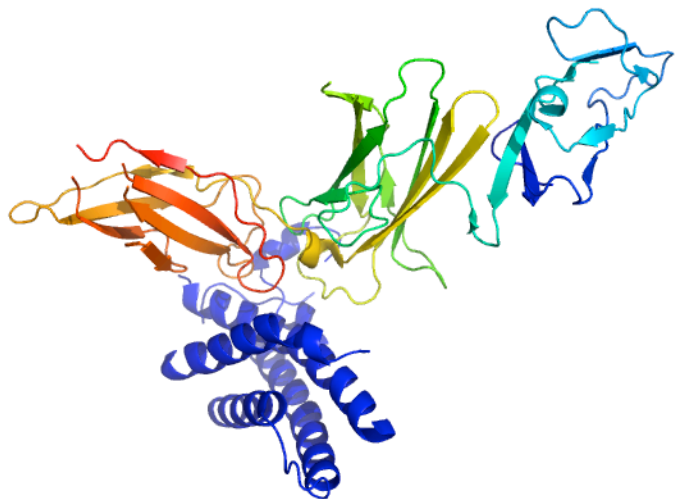


Tesis doctoral

**Inmunodeficiencias primarias  
causadas por defectos en la  
inmunidad dependiente de los  
sistemas Interleucina (IL)-12/  
Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-23/  
IL-17-IL-22.**

Ithaisa Sologuren Marrero

Las Palmas de Gran Canaria, 2016













UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

**Universidad de Las Palmas de Gran Canaria**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Departamento de Ciencias Clínicas**

**Programa de Doctorado: Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas**

## **Tesis doctoral**

Immunodeficiencias primarias causadas por defectos en la  
inmunidad dependiente de los sistemas Interleucina  
(IL)-12/Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-23/IL-17-IL-22.

Ithaisa Sologuren Marrero

Las Palmas de Gran Canaria, 2016



**DR. JUAN FRANCISCO LORO FERRER DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLINICAS DE LA  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

**CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 6 de noviembre de 2015, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS CAUSADAS POR DEFECTOS EN LA INMUNIDAD DEPENDIENTE DE LOS SISTEMAS INTERLEUCINA (IL)-12/INTERFERON GAMMA (IFN- $\gamma$ ) E IL-23/IL-17-IL-22" presentada por la doctorando Dña. Ithalsa Sologuren Marrero y dirigida por el Dr. D. Jose Carlos Rodríguez Gallego

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 6 de noviembre de dos mil quince.







**Anexo II**

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento/Instituto/Facultad: DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS/ FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Programa de doctorado: MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS

**Título de la Tesis**

INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS CAUSADAS POR DEFECTOS EN LA INMUNIDAD DEPENDIENTE DE LOS SISTEMAS INTERLEUCINA (IL)-12/INTERFERON GAMMA (IFN- $\gamma$ ) E IL-23/IL-17-IL-22.

Tesis Doctoral presentada por D/D<sup>a</sup> ITHAISA SOLOGUREN MARRERO

Dirigida por el Dr/a. D/D<sup>a</sup>. JOSE CARLOS RODRÍGUEZ GALLEGO

**El/la Director/a,**

**(firma)**

**El/la Doctorando/a**

**(firma)**

Las Palmas de Gran Canaria, a 26 de Octubre del 2015



Don JOSE CARLOS RODRÍGUEZ GALLEGO, Profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

CERTIFICA

Que el trabajo de investigación titulado “Inmunodeficiencias primarias causadas por defectos en la inmunidad dependiente de los sistemas interleucina (IL)-12/Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-23/IL-17-IL-22”, ha sido realizado por doña Ithaisa Sologuren Marrero, bajo mi dirección y asesoramiento, considerando que es apto para su defensa ante tribunal y reúne las condiciones exigibles para optar al grado de doctor.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 26 de Octubre de 2015.

Fdo:

Jose Carlos Rodriguez Gallego





*“Nuestra recompensa  
se encuentra en el esfuerzo  
y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa”.*

*Mahatma Gandhi*

A mi familia



## AGRADECIMIENTOS

Son tantos los agradecimientos que no sé por dónde empezar, aunque creo que lo mejor será empezar por el principio. Desde que aterricé en el laboratorio de Inmunología del Hospital Dr. Negrín han pasado ya 10 años que se dice pronto. Y fue casi de casualidad. Realicé mis prácticas de la carrera de Biología en el Servicio de Microbiología del mismo hospital, y la adjunta María José Pena, a la que tengo mucho que agradecer, me invitó a visitar y conocer el Servicio de Inmunología y casi sin darme cuenta allí me establecí hasta el día de hoy. Creo que lo más valioso de nuestro Servicio de Inmunología son las personas que allí trabajan, somos una piña, un gran equipo.

Agradecer al Dr. Carlos Rodríguez Gallego, "The Boss", aunque yo lo llamaría más bien "la piedra angular" de mi camino. Necesitaría muchas páginas para agradecerle todo lo que me ha enseñado. Por su apoyo, sus ánimos, su estrictez a la hora de enseñarnos a trabajar en el laboratorio, sus consejos, sobre todo el famoso "estudia, estudia" y su incansable persistencia para que de una vez acabara la tesis. Cuando hablamos de una total dedicación a la profesión, creo que los investigadores sacamos un sobresaliente, pero me pregunto cómo se hace para conseguir ese cocktail perfecto entre inteligencia, capacidad de sacrificio y disfrute, todo a la vez y todo en una misma persona. Pues vaya por dónde esa persona es Carlos, y yo sólo puedo decir que lo admiro. ¡Cuánto me queda por aprender!.

A Florentino, jefe de Servicio, le agradezco su confianza y comprensión para abordar siempre cualquier tema, solicitud o petición que necesitara tratar con él.

Unas gracias muy especiales a Esther Santiago y Maika por enseñarme todo lo que sé. Siempre me tendieron la mano cuando lo necesité. A Ana por enseñarme también algunas técnicas en su zona de control que es "genética", ya que yo pertenezco al comando de la sección de "celular". Nuestras secciones nunca se han batido en duelo, puesto que nos necesitamos los unos a los otros. Diría más bien que nuestras secciones cumplen con la definición de SIMBIOSIS.

Aunque parece que con la tesis se cierra una etapa, siempre estaré vinculada a esta mi segunda casa. Dejo atrás experiencias, amigos, compañeros, risas y llantos. Pero me llevo la emoción de aquellos instantes. ¿Cómo olvidarlo?. Quizá el recuerdo se modifique porque nuestra memoria es traicionera pero la esencia de todo lo vivido permanece.

Me gustaría citar tras cada nombre de amigo y compañero lo que han significado para mí, pero no es mi vida la que tengo que contar aquí. Aunque mi corazón sí que se ve obligado a nombrar al menos a algunos de ellos aunque sea en mensaje encriptado:

Al Dr. Pedro Lara por su comprensión.

Al Dr. Gregorio Carretero por confiar en mí y financiar mis primeros años como investigadora en este laboratorio.

Al Dr. Jose Carlos Rodríguez, Antonio Macías y a Fran, por darme la oportunidad en mis comienzos y poder conocer de primera mano el trabajo llevado a cabo en la unidad de investigación del hospital.

A Elisa Bordón, por sus buenos consejos y por su apoyo desde el principio y por compartir tan buenos momentos.

A las "Siames" por su buen hacer y su espíritu de sacrificio. A Nereida por estar siempre ahí, para lo bueno y lo malo y a Yanira por ser mi compi de fatigas, por aguantarme y por colaborar en todas las publicaciones científicas. Bien merecido tiene un hueco en todas ellas.

A Ayoze mi compañero y amigo desde los inicios, por su cariño incondicional, su paciencia y su disposición para enseñar a cualquiera que lo necesitara.

A mi querido Javi "el rubio", por revolucionarnos el laboratorio y transmitirnos siempre su buen feeling y darnos el mejor consejo, y es que -hay más vida después del labo-. A veces nos olvidamos de que hay que VIVIR.

A las 3 Marías o Mari Cármenes; A M. Carmen Quintana, la "súper" por sus consejos, su apoyo y su cariño, a M. Carmen Marrero, por hacerme ver que siempre hay que ponerse en el lugar de los demás y comprender que nadie nace sabiendo, y a M. Carmen Acevedo por ser mi alma gemela en estos últimos años.

A Maite por ser nuestra nueva capitana y por estar siempre dispuesta a ayudarnos.

A la Dra. Isabel García, por su paciencia conmigo, sus buenas palabras, sus consejos y sobre todo ser tan buena compañera y una gran profesional en este mundillo, ¡Qué gran señora!.

A Fany por comprendernos siempre a la perfección sin apenas decimos nada y por apoyarnos cuando se avecinaba un chaparrón.

Y a Marta cómo no, una de las últimas investigadoras supervivientes en nuestro laboratorio. Gracias por los momentos compartidos estos últimos años.

A todos los compis de laboratorio y de otros servicios con los que he vivido algunos instantes; Antoli, Vero, Tony, Euse, Gina, Belén, Isa Mo, Rita, Mari Nieves, Judith, Ruth,

Almudena, Nuria, Yanira B, Ángela, Érika, Lidia, Pedro Valerón, Luis Dehesa, Candy y Esther Robaina.

En cuanto al apoyo logístico, quería dar las gracias a Juan Verona, por estar siempre dispuesto a colaborar y embellecer nuestro trabajo. A Ruymán y Dani Rodríguez por aportar su pequeño granito de arena y llenarme de buenas ideas. A Julio por su cooperación, paciencia y gran ayuda para el diseño final y maquetado de la tesis.

Y por último una mención especial si cabe a mis amigos y personas cercanas; a mi gran amiga Haleh por su cariño y su fe en mí cuando me flaqueaban las fuerzas para seguir adelante. Nunca te agradeceré lo suficiente. A Irma, Ibalia, John, Sole Cano y Manu por creer en mí y animarme siempre. A Salva por todo, gracias.

Quiero dar las gracias a todos pacientes y a sus familiares. Sin ellos todo este trabajo no hubiera sido posible. También agradecer a Jean-Laurent Casanova y a su equipo, su estrecha colaboración en todo cuanto pudiéramos necesitar y sacar adelante nuestras investigaciones.

**Este trabajo ha sido financiado por:**

Fundación Canaria de Investigación Sanitaria (FUNCANIS)

Servicio Canario de Salud (SCS)



# LISTA DE PUBLICACIONES

Esta tesis está basada en las siguientes publicaciones, las cuales están indicadas en números romanos como capítulos independientes.

## **I: Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R beta 1 deficiency.**

Cárdenes M, Angel-Moreno A, Fieschi C, **Sologuren I**, Colino E, Molinés A, García-Laorden MI, Campos-Herrero MI, Andújar-Sánchez M, Casanova JL, Rodríguez-Gallego C. *J Med Genet.* 2010 Sep;47(9):635-7.

## **II. Partial recessive IFN- $\gamma$ R1 deficiency: genetic, immunological and clinical features of 14 patients from 11 kindreds.**

**Sologuren I**, Boisson-Dupuis S, Pestano J, Vincent QB, Fernández-Pérez L, Chappier A, Cárdenes M, Feinberg J, García-Laorden MI, Picard C, Santiago E, Kong X, Janniére L, Colino E, Herrera-Ramos E, Francés A, Navarrete C, Blanche S, Faria E, Remiszewski P, Cordeiro A, Freeman A, Holland S, Abarca K, Valerón-Lemaun M, Gonçalo-Marques J, Silveira L, García-Castellano JM, Caminero J, Pérez-Arellano JL, Bustamante J, Abel L, Casanova JL, Rodríguez-Gallego C. *Hum Mol Genet.* 2011 Apr 15;20(8):1509-23.

## **III. Clinical features of Candidiasis in patients with inherited interleukin 12 receptor $\beta$ 1 deficiency.**

Ouederni M, Sanal O, Ikinçiogullari A, Tezcan I, Dogu F, **Sologuren I**, Pedraza-Sánchez S, Keser M, Tanir G, Nieuwhof C, Colino E, Kumararatne D, Levy J, Kutukculer N, Aytakin C, Herrera-Ramos E, Bhatti M, Karaca N, Barbouche R, Broides A, Goudouris E, Franco JL, Parvaneh N, Reisli I, Strickler A, Shcherbina A, Somer A, Segal A, Angel-Moreno A, Lezana-Fernandez JL, Bejaoui M, Bobadilla-Del Valle M, Kachboura S, Sentongo T, Ben-Mustapha I, Bustamante J, Picard C, Puel A, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL, Rodríguez-Gallego C. *Clin Infect Dis.* 2014 Jan;58(2):204-13.





# INDICE

|  |    |
|--|----|
| ABREVIATURAS .....   | 13 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL.....  | 18 |
| 1. MICOBACTERIAS.....  | 18 |
| 2. CANDIDA SPP.....  | 21 |
| 3. EL SISTEMA INMUNOLÓGICO .....   | 23 |
| 3.1. Definición.....   | 23 |
| 3.2. Inmunidad innata y adquirida.....   | 23 |
| 3.3. Th1, Th2, Th17.....   | 25 |
| 4. INMUNIDAD FRENTE A MICOBACTERIAS.....   | 29 |
| 4.1. Modelos Experimentales.....   | 29 |
| 4.2. Estudios de asociación genética en humanos.....                                       | 31 |
| 4.3. Inmunodeficiencias primarias y enfermedad por micobacterias.....                      | 33 |
| 4.4. Susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacterias (MSMD).....                 | 35 |
| 4.4.1. Deficiencia del receptor 1 de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ R1).....              | 40 |
| 4.4.2. Deficiencia del receptor 2 de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ R2).....              | 42 |
| 4.4.3. Deficiencia de la cadena $\beta$ 1 del receptor de la IL-12 (IL-12R $\beta$ 1)..... | 43 |
| 4.4.4. Deficiencia de la subunidad p40 de la IL-12 (IL-12p40).....                         | 44 |
| 4.4.5. Deficiencia de ISG15 .....  | 45 |
| 4.4.6. Deficiencia de IRF8.....  | 45 |
| 4.4.7. Deficiencia de STAT1. ....  | 46 |
| 4.4.8. Deficiencia de NEMO.....  | 47 |
| 4.4.9. Deficiencia de gp91phox.....  | 48 |
| 5. INMUNIDAD FRENTE A CANDIDA SPP.....   | 49 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.1. Modelos experimentales.....                                     | 49  |
| 5.2. Inmunodeficiencias primarias y enfermedad por Candida spp. .... | 50  |
| HIPÓTESIS.....   | 57  |
| OBJETIVOS GENERALES.....   | 61  |
| OBJETIVOS CONCRETOS.....   | 65  |
| CAPÍTULO I.....  | 65  |
| CAPÍTULO II.....   | 69  |
| CAPÍTULO III.....  | 73  |
| DISCUSIÓN GENERAL.....   | 134 |
| CONCLUSIONES GENERALES.....  | 156 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 160 |

## ABREVIATURAS

|                     |  |
|---------------------|--|
| ADNmt               | ADN mitocondrial   |
| AIRE                | Regulador autoinmune ( <i>autoimmune regulator</i> )   |
| APECED              | Síndrome de poliendocrinopatía de tipo I ( <i>autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy</i> ) |
| APS-I               | Poliendocrinopatía autoinmune de tipo I ( <i>autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I</i> )                   |
| BCG                 | Bacilo de Calmette-Guérin ( <i>bacille Calmette-Guérin</i> )   |
| CCL                 | Quimiocina con dominio de unión C-C ( <i>chemokine C-C motif ligand</i> )  |
| CIDs                | Inmunodeficiencias combinadas ( <i>combined immunodeficiencies</i> )   |
| CMC                 | Candidiasis mucocutánea crónica  |
| CMCD                | Candidiasis mucocutánea crónica aislada  |
| CXCL                | Quimiocina con dominio de unión C-X-C ( <i>Chemokine C-X-C motif ligand</i> )                                      |
| CMV                 | Citomegalovirus  |
| CTLs                | Linfocitos T citotóxicos CD8+ ( <i>cytotoxic T lymphocytes</i> ).  |
| DCs                 | Células dendríticas ( <i>dendritic cells</i> )   |
| DP-IFN- $\gamma$ R1 | Autosómica dominante parcial IFN- $\gamma$ R1 ( <i>autosomal dominant partial IFN-<math>\gamma</math>R1</i> )      |
| EBV-B               | Linfocitos B transformados con el virus de Epstein-Barr  |
| ELISA               | Enzimoimmunoanálisis de adsorción ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )                                     |
| FQ                  | Fibrosis quística  |
| GAFF                | Factor gamma activado ( <i>gamma activated factor</i> )  |
| GAS                 | Secuencias activadas por IFN- $\gamma$ ( <i>interferon-gamma activated sequence</i> )                              |
| GOF                 | Ganancia de función ( <i>gain-of-function</i> )  |
| GW                  | Genome-wide  |
| GWAS                | Estudios de asociación del genoma completo ( <i>genome-wide association study</i> )                                |
| HHV8                | Herpesvirus humano 8   |
| HLA                 | Antígeno leucocitario humano ( <i>human leukocyte antigen</i> )  |

|                |   |
|----------------|---|
| IC             | Intervalo de confianza  |
| IDP            | Inmunodeficiencia primaria  |
| IFN            | Interferón  |
| IL             | Interleucina  |
| IP-10          | Proteína 10 inducible por IFN- $\gamma$ ( <i>IFN-<math>\gamma</math>-induced protein 10</i> )                         |
| IRF8           | Factor 8 regulador de interferón ( <i>interferon regulatory factor 8</i> )  |
| IRF9           | Factor 9 regulador de interferón ( <i>interferon regulatory factor 9</i> )  |
| ISG15          | Gen 15 estimulado por interferón ( <i>interferon-stimulated gene 15</i> )   |
| ISGF3          | Gen del factor 3 estimulado por interferón ( <i>interferon-stimulated gene factor 3</i> )                             |
| ISRE           | Elemento de respuesta estimulado por IFN ( <i>IFN-stimulated response elements</i> )                                  |
| KS             | Sarcoma de Kaposi   |
| LPS            | Lipopolisacárido.   |
| mAb            | Anticuerpo monoclonal   |
| MAC            | Complejo Mycobacterium avium ( <i>Mycobacterium avium complex</i> )   |
| MHC            | Complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>major histocompatibility complex</i> )                                     |
| MIG            | Monocina inducida por IFN- $\gamma$ ( <i>monokine induced by IFN-<math>\gamma</math></i> ).                           |
| MRCA           | Antecesor común más reciente ( <i>Most recent common ancestor</i> )   |
| MSMD           | Susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacteria ( <i>Mendelian susceptibility to mycobacterial disease</i> ) |
| MBTC           | Complejo Mycobacterium tuberculosis ( <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> )                                     |
| NEMO           | Modulador esencial de NF- $\kappa$ B ( <i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i> ).                          |
| NF- $\kappa$ B | Factor nuclear $\kappa$ B ( <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> ).   |
| NLR            | Receptores tipo NOD ( <i>NOD-like receptors</i> ).  |
| NOD            | Dominio de oligomerización y de unión a nucleótidos ( <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> )              |
| PHA            | Fitohemaglutinina ( <i>phytohemagglutinin</i> ).  |
| PBMCs          | Células monocleares de sangre periférica ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ).                               |

|                     |  |
|---------------------|--|
| PRR                 | Receptores de reconocimiento de patrones ( <i>pattern recognition receptors</i> ).                               |
| RC-IFN- $\gamma$ R1 | Autosómica recesiva completa IFN- $\gamma$ R1 ( <i>autosomal recessive complete IFN-<math>\gamma</math>R1</i> )  |
| RIG                 | Gen inducido por ácido retinoico ( <i>retinoic acid-induced gene</i> ).  |
| RLR                 | Receptores tipo RIG ( <i>RIG-like receptors</i> )  |
| RP-IFN- $\gamma$ R1 | Autosómica recesiva parcial IFN- $\gamma$ R1 ( <i>autosomal recessive partial IFN-<math>\gamma</math>R1</i> )    |
| SCC                 | Carcinoma de células escamosas ( <i>squamous-cell carcinoma</i> )  |
| SCEC                | Carcinoma esofágico de células escamosas ( <i>squamous-cell carcinoma of the esophagus</i> )                     |
| SCID                | Inmunodeficiencia combinada grave ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )                                    |
| SIDA                | Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida   |
| STAT                | Transductor de señal y activador de la transcripción ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> ) |
| Tfh                 | Linfocito T folicular  |
| TGF- $\beta$        | Factor de crecimiento transformante $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )             |
| Th1                 | Linfocitos T colaborador tipo 1  |
| Th17                | Linfocitos T colaborador tipo 17   |
| Th2                 | Linfocitos T colaborador tipo 2  |
| Th22                | Linfocitos T colaborador tipo 22   |
| Th9                 | Linfocitos T colaborador tipo 9  |
| TLR                 | Receptor tipo Toll ( <i>Toll-like receptor</i> )   |
| TNF                 | Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor necrosis factor</i> )  |
| Treg                | Linfocito T regulador  |
| iTreg               | Linfocito T regulador inducido   |
| nTreg               | Linfocito T regulador natural  |
| UI                  | Unidades internacionales   |
| UV                  | Ultravioleta   |
| VIH                 | Virus de la inmunodeficiencia humana   |
| VPH                 | Virus del papiloma humano  |



# **Introducción general**

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1. MICOBACTERIAS

### Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*. Comprende más de 100 especies, incluyendo especies virulentas como *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), el agente infeccioso de la tuberculosis y *M. leprae* (Reichencach J *et al*, 2001). Además existen diversas subcepas de la vacuna del Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), derivadas de una cepa atenuada de *M. bovis*.

El complejo de *M. tuberculosis* (MBTC -*Mycobacterium tuberculosis complex*-) incluye patógenos típicos asociados a humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. Canettii*) y varios linajes adaptados a diferentes especies de mamíferos como *M. caprae*, *M. orygis* y *M. pinnipedii*, *M. microti*, que afecta a roedores y *M. bovis*, que afecta a un rango amplio de especies incluido el humano. Aunque difieren ampliamente en términos de respuesta del huésped, distribución geográfica, epidemiología, fenotipos y patogenicidad, todas las especies pertenecientes al MTBC están estrechamente relacionadas a nivel genético (Brosch R *et al*, 2002).

La tuberculosis continúa siendo un problema de salud global importante afectando a millones de personas cada año. Se estima que *M. tuberculosis* infecta a un tercio de la población mundial, con aproximadamente 9,0 millones de nuevos casos de tuberculosis y aproximadamente 1,5 millones de muertes en 2013 (Abel L *et al*, 2014; WHO, 2014). La infección por *M. tuberculosis* varía a nivel epidemiológico (niños y adultos), clínico (enfermedad diseminada frente a enfermedad pulmonar) y de patogénesis (infección primaria frente a reactivación) (Alcaïs A *et al*, 2005). En el 90-95% de los casos, los individuos no desarrollan la enfermedad y la infección permanece latente y los pacientes totalmente asintomáticos (Fortin A *et al*, 2007; Boisson-Dupuis S *et al*, 2015). Aproximadamente el 5% de los individuos inmunocompetentes que están infectados progresará a enfermedad activa durante su vida (Ottenhoff TH *et al*, 2012). En los adultos, la tuberculosis pulmonar es la forma más frecuente de enfermedad y puede reflejar una reactivación de la infección primaria latente. Entre los síntomas más frecuentes se encuentran, tos, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso y fiebre. Otras formas de enfermedad menos frecuentes, son las englobadas dentro de la tuberculosis extrapulmonar



(ganglionar, menígea, peritoneal, cardiovascular, genitourinaria, oftálmica y osteoarticular). La infección primaria puede derivar a un cuadro agudo a menudo asociado con la enfermedad extrapulmonar debido a la diseminación de la micobacteria al torrente sanguíneo (Alcañs A *et al*, 2005; Abel L *et al*, 2014; Boisson-Dupuis S *et al*, 2015). La tuberculosis diseminada es una forma grave de tuberculosis que ocurre cuando el bacilo es capaz de diseminarse al resto del cuerpo a través de la sangre o el sistema linfático. Se caracteriza por la formación de pequeñas lesiones granulomatosas en los tejidos y órganos afectados, y los pacientes presentan signos clínicos inespecíficos como tos, fiebre y linfadenopatías. En la tuberculosis primaria diseminada, los síntomas se desarrollan dentro de los primeros 2 años de la infección (Fortin A *et al*, 2007). Los niños son más propensos a la infección primaria por *M. tuberculosis*, debido a que su sistema inmunológico no está completamente maduro (Muñoz L *et al*, 2015). La incidencia de tuberculosis primaria grave depende de la edad del individuo durante la infección primaria, y disminuye entre 10-20% en niños menores de 1 año al 0,5% en niños mayores de 5 años (Abel L *et al*, 2014). La infección por *M. tuberculosis* puede también conducir a una tuberculosis crónica de progresión lenta en la que los síntomas clínicos se desarrollan tras más de 2 años de infección (Fortin A *et al*, 2007).

Además, existen otras muchas especies de micobacterias ambientales no tuberculosas (MNT -*non-tuberculous mycobacteria*-) ampliamente distribuidas que presentan generalmente una baja virulencia. Entre ellas se incluyen *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum-chelonae complex*, *M. genevense*, *M. triplex*, *M. szulgai*, *M. pneumoniae* o *M. abscessus*. Todos los humanos están expuestos a MNT que entran en contacto con la piel y las membranas mucosas, principalmente del tracto digestivo y respiratorio. Sin embargo, estas bacterias raramente infectan al individuo inmunocompetente y sólo una minoría de los individuos infectados sufrirá enfermedad localizada o diseminada. Algunos desórdenes hereditarios en humanos pueden favorecer el desarrollo de enfermedad por BCG, MNT o *M. tuberculosis*. *M. avium* puede causar infección pulmonar crónica en pacientes susceptibles. Los pacientes con fibrosis quística (FQ), presentan a menudo infección respiratoria crónica por MNT. En algunos individuos, *M. abscessus* puede causar infecciones pulmonares, considerándose en la actualidad como uno de los principales patógenos en pacientes con FQ. En pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se han aislado algunas especies de MNT como *M. kansasii* y el complejo *M. avium* (MAC -*Mycobacterium avium complex*-) (Griffith DE *et al*, 2002). Sin embargo, muy raramente estos patógenos micobacterianos causan infección

diseminada, siendo ésta más frecuente en pacientes con inmunosupresión o en pacientes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Casanova J-L *et al*, 2002; Ottenhof TH *et al*, 2002; Sharma VK *et al*, 2015). La incidencia de infecciones por MNT en la población pediátrica susceptible, está incrementada de manera distinta que en los individuos inmunocompetentes (Sharma VK *et al*, 2015). En los niños con IDPs en los que se presenta enfermedad diseminada por micobacterias es frecuentemente debida a BCG y MNT. Sin embargo, la tuberculosis causada por *M. tuberculosis* es más rara en estos niños (Alcaïs A *et al*, 2005). Diversos estudios han mostrado que la variabilidad genética contribuye en gran medida a la susceptibilidad y pronóstico de la infección por *M. tuberculosis* (Ottenhoff TH *et al*, 2002; Boisson-Dupuis S *et al*, 2015).

## 2. CANDIDA SPP.

### Género *Candida*

El género *Candida* pertenece a la familia de *Saccharomycetaceae* dentro del orden *Saccharomycetales*. Se conocen más de 200 especies diferentes ampliamente distribuidas en el hábitat natural. Muchas de estas especies forman parte de nuestra flora normal de la piel y de las membranas mucosas de los tractos digestivo, genitourinario y respiratorio. En individuos sanos y bajo condiciones normales, estas especies generalmente no causan infección. Sin embargo, las especies de *Candida* son patógenos oportunistas y en torno a un 10% de ellas se asocia con enfermedades infecciosas. En el huésped susceptible, con respuestas fisiológicas o inmunológicas alteradas, ciertas especies de *Candida* pueden causar un rango de infecciones clínicas que van desde lesiones superficiales en las mucosas hasta infecciones diseminadas o invasivas (Odds FC *et al*, 2006). La infección diseminada (candidemia) por *Candida albicans* (*C. albicans*), además representa una tasa de mortalidad importante (40%) en los individuos inmunocomprometidos (pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana -VIH- y en pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor -paciente receptor de un trasplante y pacientes con cáncer-) (Romani L, 2004; Richardson JP *et al*, 2015).

*C. albicans* es la especie de hongo más frecuentemente aislada en humanos (causan el 50% de las infecciones fúngicas), debido en parte a que es el comensal más común y se considera un constituyente normal de la microflora en aproximadamente el 30-70% de la población. Otras especies aisladas con una frecuencia cada vez más elevada son *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* o *C. dubliniensis* (Szabo EK *et al*, 2011; Richardson JP *et al*, 2015; Rizzetto L *et al*, 2015).

*C. albicans* es un hongo dimórfico con características diferentes en su forma de levadura (forma esférica) frente a las hifas (forma filamentosa). Las diferentes morfologías de *C. albicans* juegan roles distintos en la colonización, infección y enfermedad (Rizzetto L *et al*, 2015). Algunas especies de *Candida* pueden crecer de diferentes formas dependiendo del lugar de infección (Romani L, 2004). Mientras que la levadura participa en el establecimiento y diseminación de las infecciones fúngicas, identificadas en los cultivos de sangre durante las pruebas de laboratorio, las formas filamentosas como las pseudohifas o las hifas intervienen en la penetración e invasión de las mucosas. La relación establecida entre *C. albicans* y su patogenicidad con el huésped humano, dependerá de la efectividad de la respuesta inmunológica establecida, y la correcta interacción entre el

sistema inmunológico innato y adquirido del huésped (Vinh DC, 2011; Richardson JP *et al*, 2015). Las diferentes morfologías de *C. albicans* presentan distinta capacidad para polarizar las diversas subpoblaciones de células Th1, Th2 y Th17. En el individuo normal, ante una exposición ambiental con este patógeno, *C. albicans* induce de forma específica a las células Th17. Experimentos *in vitro* mostraron que la forma de levadura promueve la diferenciación de células productoras de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e induce la producción de interleucina (IL)-12, así como altas concentraciones de IL-2. Las hifas en cambio, desencadenan la producción de IL-17 en ausencia de IFN- $\gamma$  y la producción de IL-23, pero no de IL-12. Estos resultados sugieren que la morfología filamentosa de *C. albicans*, podría desencadenar la respuesta Th17 *in vivo*. Estos datos proporcionan un ejemplo de disociación entre la producción de IL-12 e IL-23 en el contexto de un patógeno natural y sugieren una posible conexión entre la respuesta innata a *C. albicans* y la polarización sesgada hacia Th17 de las células T de memoria específicas de *C. albicans* (Acosta-Rodríguez EV *et al*, 2007). Un factor de virulencia clave en la patogénesis de *C. albicans* es su capacidad de transformación entre diferentes morfologías (levadura, hifas y pseudohifas), utilizando la transición reversible a una forma de crecimiento filamentoso como respuesta a señales ambientales y así bloquear o evitar el reconocimiento por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs *-pattern recognition receptors-*) localizados en la superficie de las células del sistema inmunológico (Rizzetto L *et al*, 2015).

### 3. EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

#### 3.1. Definición

Algunos microorganismos pueden atravesar las barreras anatómicas y fisiológicas del organismo causando infección. Estas barreras incluyen la piel, las mucosas, el pH ácido del estómago, la saliva y otras secreciones, proporcionando la primera línea de defensa frente a patógenos (Turvey SE *et al*, 2010). En humanos la respuesta inmunológica, tiene lugar a través de dos sistemas conectados: el sistema inmunológico innato y el sistema inmunológico adquirido. La combinación de ambos sistemas permite identificar al patógeno, contenerlo y por último eliminarlo con la máxima eficacia y el mínimo daño en el huésped y protegerlo frente a una reinfección con el mismo patógeno (Beutler B, 2009; Medzhitov R, 2009; Palm NW *et al*, 2009; Rosenzweig DS *et al*, 2011).

#### 3.2. Inmunidad innata y adquirida

La inmunidad innata aumenta la protección ofrecida por las barreras físico-químicas. Una vez que el microorganismo logra traspasar estas barreras, la respuesta se inicia rápidamente puesto que los mecanismos de defensa celulares y bioquímicos ya están presentes constitutivamente incluso antes de producirse la infección (Turvey SE *et al*, 2010). La inmunidad innata es capaz de reconocer estructuras moleculares, no específicas, compartidas por un gran número de patógenos, a través de mecanismos efectores muy eficientes pero limitados para evitar un daño colateral en los tejidos del huésped. El reconocimiento de estas estructuras comunes permite al sistema inmunológico discriminar entre lo propio y lo extraño (Medzhitov R *et al*, 1997; Janeway CA *et al*, 2002; Palm NW *et al*, 2009). La inmunidad innata juega un papel clave en la activación y orientación de la inmunidad adquirida y en el mantenimiento de la integridad de los tejidos y su reparación. Entre los elementos que conforman la inmunidad innata se incluyen diversos tipos celulares de origen hematopoyético; neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs - *dendritic cells*-), mastocitos, eosinófilos y las células citolíticas naturales (células NK - *natural killer*-), y células de origen no hematopoyético; células epiteliales y fibroblastos (Janeway CA *et al*, 2002; Koenderman L *et al*, 2014). Para aumentar las defensas celulares, la inmunidad innata posee además diversos componentes humorales, entre los que se incluyen las proteínas del sistema del complemento y mediadores de la inflamación, así como proteínas de señalización intracelular denominadas citocinas, que actúan regulando la

actividad de las células de la inmunidad innata y adquirida (Turvey SE *et al*, 2010; Rosenzweig DS *et al*, 2011). Las células de la inmunidad innata poseen PRRs capaces de reconocer diversos patrones moleculares ampliamente distribuidos presentes en los microorganismos, los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*-) (Medzhitov R *et al*, 1997; Soehnlein O *et al*, 2010; Turvey SE *et al*, 2010). Dentro de estas categorías se engloban los receptores tipo Toll (TLRs -*Toll-like receptors*-), los receptores tipo NOD (nucleotide oligomerization domain -*NOD-like receptors*-) (o NLR), los receptores tipo RIG (*cytoplasmic retinoic acid-inducible gene*, RLRs -*RIG-like receptors*-) o los receptores KIR (*Killer-cell immunoglobulin -KIR-like receptors*). Cada uno responde de manera distinta alcanzando diferentes efectos en la respuesta inflamatoria (Beutler B, 2009; Abdullah Z *et al*, 2014; Iwasaki A *et al*, 2015).

La inmunidad adquirida actúa con posterioridad a la inmunidad innata, tardando entre 4 y 7 días en entrar en acción los mecanismos efectores, siendo un mecanismo de protección adicional desarrollado en vertebrados. Sus componentes actúan a través de receptores altamente específicos, capaces de reconocer sustancias microbianas y no microbianas y diferenciando entre moléculas y microorganismos diferentes, incluso los estrechamente relacionados. La inmunidad adquirida puede potenciar la eficacia de la respuesta inmunológica de una manera antígeno-específica a la vez que minimiza un daño colateral innecesario. Esta inmunidad dota al sistema inmunológico de la capacidad para recordar infecciones previas y proporcionar protección frente a futuras exposiciones con un mismo patógeno. Es esta capacidad para generar memoria inmunológica lo que la hace tan efectiva, ya que la memoria inmunológica resulta en una mejora tanto cualitativa como cuantitativa en segundas o posteriores exposiciones a un microorganismo. La inmunidad adquirida está compuesta por los linfocitos T y los linfocitos B. Los linfocitos T y B responden de una manera específica a sustancias extrañas denominadas antígenos, las cuales son reconocidas mediante el uso de receptores producidos por recombinación somática. El proceso de recombinación da lugar a un extensísimo repertorio de receptores de la célula T (TCR -*T-cell receptor*-) y a la generación de receptores de la célula B (BCR -*B-cell receptor*-), lo cual proporciona la especificidad y diversidad existente en los linfocitos (LaRosa DF *et al*, 2008; den Haan JM *et al*, 2014). Tras el reconocimiento, algunos linfocitos T y B se transforman en células efectoras de la respuesta inmunológica, mientras que otras permanecerán como células de memoria. Estas células de memoria son

las encargadas de facilitar una respuesta más rápida e intensa en futuras exposiciones frente al mismo patógeno (Medzhitov R, 2009; Palm NW *et al*, 2009).

La inmunidad adquirida podría clasificarse en inmunidad humoral e inmunidad celular. Los anticuerpos o inmunoglobulinas producidos por los linfocitos B conforman la inmunidad humoral. Estos anticuerpos reconocen antígenos microbianos activando diferentes mecanismos efectores para su posterior eliminación, siendo el principal mecanismo de defensa frente a microorganismos extracelulares. La defensa del sistema inmunológico frente a infección por microorganismos intracelulares como virus y algunas bacterias, está a cargo de los linfocitos T. Estos actúan favoreciendo la eliminación de células infectadas por dichos microorganismos a la vez que producen citocinas que activan a los linfocitos B, potencian la fagocitosis y controlan la respuesta inmunológica (Iwasaki A *et al*, 2015). Las células del sistema inmunológico se encuentran distribuidas ampliamente a lo largo del cuerpo y están en constante migración entre la sangre y los órganos linfoides secundarios. Esta migración facilita la detección rápida de patógenos invasores, garantizando medidas preventivas frente a la infección. (Cahalan MD *et al*, 2006).

Dentro de las poblaciones de linfocitos T podemos distinguir dos grupos principales, los linfocitos T colaboradores CD4+ (Th *-T helper cell-*) y los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs *-cytotoxic T lymphocytes-*). Los linfocitos Th CD4+ por un lado estimulan, a través de la producción de citocinas, a las células B antígeno-específicas que se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos y a células B de memoria, y por otro reclutan y activan a los fagocitos y linfocitos T CD8+ que cooperan con la aclaración del patógeno. Algunas células T naïve o vírgenes se diferencian a células de memoria encargadas de la defensa frente a futuras reinfecciones por el mismo patógeno. En función de las citocinas secretadas, se pueden diferenciar diversas poblaciones de linfocitos Th.

### 3.3. Th1, Th2, Th17

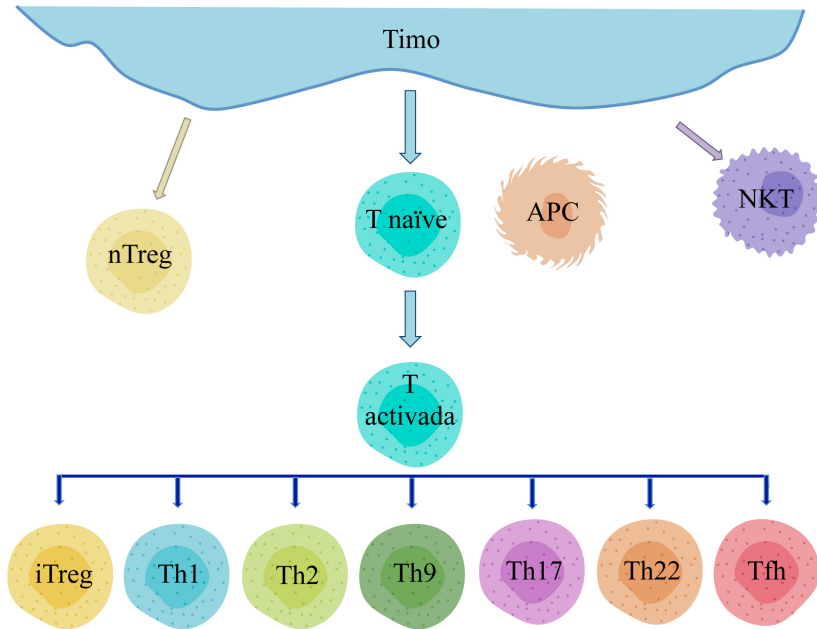
En base al perfil de citocinas que producen, la expresión de factores de transcripción específicos y la función que lleven a cabo durante la respuesta inmunológica, se han definido inicialmente, ya en los años 80, dos subpoblaciones de linfocitos Th efectores, denominados linfocitos Th1 y linfocitos Th2 (Annunziato F *et al*, 2008; Annunziato F *et al*, 2012). Los linfocitos Th1 y Th2 se diferencian a partir de linfocitos T CD4 naïve. Los linfocitos Th1 se caracterizan por la producción de IL-2, factor de necrosis tumoral  $\alpha$

(TNF- $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  y por la expresión del factor de transcripción T-bet (*T-box-containing protein expressed in T cells*). La función principal de estas células es la protección frente a microorganismos intracelulares a través de la activación de los macrófagos. La diferenciación de linfocitos Th1 se ve favorecida por la presencia de IL-12, secretada por las células presentadoras de antígeno. Las células Th2 expresan GATA-3 y producen IL-4, IL-5 e IL-13 involucradas en la erradicación de helmintos. En presencia de IL-4 las células TCD4+ naïve se diferencian a células Th2. Sin embargo, el paradigma Th1/Th2 introducido por Mosmann y Coffman se ha expandido tras el descubrimiento en el año 2005 por Harrington *et al* (2005), Langrish *et al* (2005) y Park *et al* (2005), de una tercera subpoblación de linfocitos Th CD4+ efectoras denominados Th17 presentes tanto en humanos como en ratón. Estos linfocitos se caracterizan por la presencia de los factores de transcripción expresados (STAT3 y ROR $\gamma$ t (*-Retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor gamma-t-*) y por la producción de IL-17A, IL-17F e IL-22, cuya función es proteger al huésped frente a patógenos extracelulares y hongos. Además los linfocitos Th17 se han relacionado con la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes (Acosta-Rodríguez EV *et al*, 2007; Matsuzaki G *et al*, 2007; Annunziato F *et al*, 2008; Korn T *et al*, 2009; Annunziato F *et al*, 2012; McGeachy MJ *et al*, 2012).

La participación de TGF- $\beta$  en la diferenciación de las células Th17 coloca al linaje Th17 en estrecha relación con los linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ T reguladores (Tregs -*regulatory T cells-*) (Korn T *et al*, 2009). Existe una cierta controversia sobre el papel de TGF- $\beta$  en la diferenciación de las células Th17 en ratones y humanos, posiblemente debido a que los requerimientos entre las células Th17 humanas y de ratón son diferentes. IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23 promueven la expresión de ROR $\gamma$ t y CCR6 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 6*) y la producción de IL-17, mientras que TGF- $\beta$ , que se muestra esencial para la diferenciación de las células Th17 de ratón, inhibe la diferenciación de las células Th17 humanas (Acosta-Rodríguez EV *et al*, 2007b; Sallusto F *et al*, 2012). Estudios posteriores han confirmado el efecto inhibitorio que tiene TGF- $\beta$  a altas dosis. Sin embargo TGF- $\beta$  es necesario a bajas dosis para la diferenciación de células Th17 humanas (Sallusto F *et al*, 2012; Jönsson B *et al*, 2012). TGF- $\beta$ , en combinación con otras citocinas, promueve la diferenciación de otras subpoblaciones de linfocitos Th en los compartimentos linfoides periféricos, estableciendo una posible relación en el desarrollo de varias subpoblaciones de células T (Korn T *et al*, 2009). Actualmente se distinguen otras subpoblaciones de linfocitos Th CD4+ distintas a las ya mencionadas con diversas funciones efectoras, como



las células Th9, Th22, Tregs o T foliculares (Tfh) (**Figura 1**). En la **Tabla 1** se detallan las características principales de todas ellas.



**Figura 1.** Subpoblaciones de células T CD4+.

| Tipo         | Función inmunológica   | Marcador superficie   |  |   | Factor de transcripción                         | Activador                                       | Inhibidor                                       | Citocina efectora   |
|--------------|--|---|--|---|---|---|---|---|
|              |  | Co *  | Ch*  | Cy*                                       |   |   |   |   |
| <b>Th1</b>   | Microorganismos intracelulares<br><br>-Virus<br>- Bacterias                            | CD26<br>CD94<br>CD278 (ICOS)<br>Tim-3   | CCR5<br>CCR4 <sup>hi</sup><br>CXCR3 <sup>lo</sup>          | CD178<br>CD212                            | <b>T-bet</b><br>STAT1<br>STAT4                  | IL-2<br>IL12(p70)<br>IL-18<br>IL-27<br>RANKL    | IL-4<br>IL-10<br>IL-21                          | IFN- $\gamma$<br>LT- $\alpha$<br>TNF<br>Perforina<br>Granzima A<br>Granzima B |
| <b>Th2</b>   | Microorganismos extracelulares   | Tim-1   | CCR3<br>CCR4 <sup>lo</sup><br>CXCR3<br>CXCR4 <sup>hi</sup> | CD30<br>IL-33 $\alpha$                    | <b>GATA3</b><br>STAT5<br>STAT6<br>IRF4          | IL-2<br>IL-4<br>IL-25<br>IL-31<br>IL-33<br>TSLP | IFN- $\gamma$<br>TGF- $\beta$                   | IL-4<br>IL-5<br>IL-6<br>IL-10<br>IL-13<br>IL-31                               |
| <b>Th9</b>   | -Parásitos extracelulares  |   |  | VDR                                       | GATA3<br>STAT6<br>IRF4                          | IL-4<br>TGF- $\beta$                            | IFN- $\gamma$                                   | IL-9<br>IL-10<br>CCL17<br>CCL22<br>TGF- $\beta$                               |
| <b>Th17</b>  | Microorganismos extracelulares en mucosas<br><br>- Bacterias<br>- Infecciones fúngicas | CD161 (NK1)<br>CD278 (ICOS)   | CCR4 <sup>hi</sup><br>CCR6<br>CXCR3 <sup>lo</sup>          | IL-21R<br>IL-23R                          | <b>ROR<math>\gamma</math>t</b><br>STAT3<br>IRF4 | IL-1<br>IL-6<br>IL-21<br>IL-23<br>TGF- $\beta$  | IFN- $\gamma$<br>IL-2<br>IL-4<br>IL-12<br>IL-27 | IL-17A<br>IL-17F<br>IL-21<br>IL-22<br>IL-24<br>IL-26<br>TNF<br>CCL20          |
| <b>Th22</b>  | - Patógenos microbianos  |   | CCR4<br>CCR6<br>CCR10                                      | CD140                                     | <b>AhR</b>                                      | IL-6<br>TNF                                     | TGF- $\beta$                                    | IL-22<br>TNF  |
| <b>Tfh</b>   | - Ayuda a células T y B  | CD84 (SLAMF5)<br>CD150 (SLAMF1)<br>CD200 (OX-2)<br>CD272 (BTLA)<br>CD278 (ICOS)<br>CD279 (PD-1) | CCR4<br>CXCR5  | CD126<br>CD153<br>CD154<br>IL-21R         | MAF<br>Bcl-6<br>STAT3                           | IL-6<br>IL-21<br>CXCL13                         |   | IFN- $\gamma$<br>IL-4<br>IL-17A<br>IL-117F<br>IL-21                           |
| <b>nTreg</b> | -Regulación respuesta inmunológica<br>Tolerancia inmune                                |   | CCR7   | CD25 <sup>hi</sup><br>CD127 <sup>lo</sup> | <b>FOXP3</b><br>STAT5                           |   |   | TGF- $\beta$<br>IL-10<br>IL-35  |
| <b>iTreg</b> | -Regulación tolerancia   | CD152 (CTLA-4)<br>CD223 (LAG3)<br>CD279 (PD-1)  | Expresión variable   | CD25 <sup>hi</sup><br>CD127 <sup>lo</sup> | <b>FOXP3</b><br>STAT5                           | IL-2<br>Ácido retinoico<br>TGF- $\beta$         | IL-1<br>IL-21<br>IL-23                          | IL-10<br>IL-35<br>TGF- $\beta$  |

**Tabla 1. Diferenciación de las células T CD4+.** Las subpoblaciones de células T CD4+ se clasifican según la expresión de receptores de quimiocinas o de citocinas.

\* Como marcadores de superficie, se muestran las principales moléculas coestimuladores (Co), los receptores de quimiocinas (Ch) y los receptores de citocinas (Cy).

## 4. INMUNIDAD FRENTE A MICOBACTERIAS

### 4.1. Modelos Experimentales

Estudios genéticos en ratón han mostrado que existen diversos genes que afectan a la susceptibilidad a infecciones micobacterianas. En los macrófagos de ratón, la secreción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ , activan los mecanismos microbicidas frente a micobacterias (Ottenhoff TH *et al*, 2002).

En los humanos, una vez que se ha formado el fagosoma, los macrófagos infectados y las DCs muestran antígenos específicos de *M. tuberculosis* a través de las moléculas MHC de clase II. Estas células presentadoras de antígeno profesionales (APC) viajan hasta los nódulos linfáticos donde activan a las células Th CD4<sup>+</sup> que regulan la expresión de citocinas y se encargan de la formación y mantenimiento de los granulomas. La cascada de señalización de citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ), conduce a la atracción de células mononucleares y linfocitos T y, junto con los linfocitos B y las DCs, construyen un granuloma, característico de la reacción del tejido a la tuberculosis (Muñoz L *et al*, 2015). En los humanos, los granulomas son heterogéneos y se encuentran bien organizados, y pueden llegar a ser necróticos, calcificados y caseosos, lo cual es un sello distintivo de la infección por *M. tuberculosis* (Fortin A *et al*, 2007).

El modelo de ratón se ha utilizado para el estudio de la vacunación con BCG y definir qué factores a nivel molecular intervienen en la inmunidad protectora frente a *M. tuberculosis*. Uno de los principales genes estudiados para evaluar diferencias en la respuesta a *M. bovis* (cepa BCG) ha sido el gen *Nramp1* (*-Natural resistance-associated macrophage protein 1-*, conocido también como *Slc11a1*). *Nramp1* se expresa en la membrana de los lisosomas de macrófagos y actúa como transportador de cationes pH-dependiente en la membrana fagosomal. La depleción de los cationes divalentes mediado por Nramp-1 inhibe las funciones del macrófago, como su capacidad bactericida y la inducción del estallido oxidativo, indispensables para la defensa contra infecciones (Fortin A *et al*, 2007; Abel L *et al*, 2014).

La IL-12 es crucial para combatir la infección por *M. tuberculosis* mediante la inducción de la expresión de IFN- $\gamma$  y la activación de los linfocitos antígeno-específicos capaces de formar granulomas (Cooper AM *et al*, 1997; Flynn JL *et al*, 2001). Experimentos en ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* mostraron que la administración temprana de IL-12 resultó en una disminución significativa en el número de bacterias y en un incremento en el tiempo de supervivencia, aunque los ratones aún

sucumbían a la infección. Por el contrario, IL-12 tuvo un efecto menor en la carga bacteriana en ratones C57BL/6. Este enfoque evalúa *in vivo* el impacto que tiene el efecto genético sobre la susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*. La desventaja es que este efecto genético puede ser difícil de analizar en cruces de ratón estándar (Flynn JL *et al*, 2001; Fortin A *et al*, 2007). Cooper *et al* (1997) utilizó ratones deficientes en el gen IL-12p40. Comparado con los ratones del grupo control, los ratones IL-12p40<sup>-/-</sup> fueron más susceptibles a la infección, con un incremento en la carga bacteriana y una disminución en el tiempo de supervivencia, posiblemente debido a una reducción en la producción de IFN- $\gamma$  (Cooper AM *et al*, 1997; Cooper AM *et al*, 2002).

Al igual que en humanos, los ratones con deficiencias genéticas que resultan en la pérdida de inducción, producción o respuesta a IFN- $\gamma$ , son susceptibles a infecciones por bacterias intracelulares, incluyendo micobacterias y salmonela. Experimentos con ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> demostraron que éstos eran susceptibles a infección por BCG y que presentaban defectos en la estructura del granuloma con resultados letales. Sin embargo, los ratones silvestres 129/Sv x C57BL/6 F2 fueron resistentes a la infección. Estos resultados revelan la importancia del IFN- $\gamma$  en la protección inmune frente al BCG y en el desarrollo de granulomas maduros en ratón. Se ha visto además, que los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> 129/Sv x C57BL/6 F2 son más susceptibles a *M. tuberculosis* que los ratones silvestres (Cooper AM, 2015; Jouanguy E *et al*, 1999). Además, defectos en los genes del *IFNG* e *IFNGR1* en ratones, causan una susceptibilidad no sólo a infección por micobacterias, sino también a infecciones por otras bacterias tanto intracelulares como extracelulares, y a infecciones por virus. Otro estudio en ratones deficientes en *IFNGR2* mostraron tener una producción defectuosa de IFN- $\gamma$  y una susceptibilidad a la infección por *Listeria monocytogenes* (Caragol I *et al*, 2003).

La citocina IL-23, no es esencial en la resistencia primaria a *M. tuberculosis*, pero se requiere para la generación de una respuesta de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17 específica de micobacterias (Khader SA *et al*, 2007). Sin embargo, en el caso de ratones que carecen del gen de IL-12p35 y por tanto la IL-12p70 está ausente, IL-23 es necesaria para la generación de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas productoras de IFN- $\gamma$ , la inducción de genes antimicobacterianos, y el control del crecimiento bacteriano (Khader SA *et al*, 2005). Aunque la señalización del receptor de la IL-17 (IL-17RA) no es requerida para el control primario de *M. tuberculosis*, la mejora en el reclutamiento de células Th1 efectoras en ratones vacunados con antígenos para *M. tuberculosis*, está mediada por IL-17A a través de la regulación de algunos ligandos de quimiocinas como MIG (*monokine*

induced by IFN- $\gamma$ ), IP-10 (IFN- $\gamma$ -induced protein 10) y CXCL11 (chemokine (C-X-C motif) ligand 11). Estas quimiocinas son críticas para la movilización de las células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  al granuloma y para restringir el crecimiento bacteriano. Las células Th17 protegen frente a bacterias extracelulares Gram-negativas y hongos. Se ha encontrado que durante la infección por *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides fragilis*, *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli*, *Borrelia burgdorferi* y algunas especies de hongos, existe un predominio de células T productoras de IL-17, mientras que esta citocina desempeña un papel más modesto en la protección frente a micobacterias intracelulares (Ouyang W *et al*, 2008; Annunziato F *et al*, 2008).

La IL-22, es producida principalmente por las células T y NK. Un linaje de células T denominado Th22 produce IL-22, y las células Th17 productoras de IL-17A pueden producir IL-22 en una forma IL-23 dependiente. Experimentos en ratón demostraron que la ausencia de IL-22 en ratones silvestres, no tuvo ningún efecto aparente sobre el control de la infección por *M. tuberculosis*. Los ratones IL-22<sup>-/-</sup> presentaron cargas bacterianas normales, y no se observaron diferencias de supervivencia a largo plazo tras la infección por *M. tuberculosis* cuando se comparó con los ratones del grupo control C57BL/6 (Behrends J *et al*, 2013; Mayer-Barber KD *et al*, 2015).

Otros estudios en modelos animales, incluyendo conejos, primates no humanos, o zebrafish, son esenciales para proporcionar información complementaria a la obtenida en los estudios humanos (Abel L *et al*, 2014; Flynn JL *et al*, 2006). Sin embargo, en los últimos años diversas evidencias han mostrado diferencias entre los modelos animales y la enfermedad en humanos *in natura*. Los modelos de ratón tienen una serie de limitaciones a la hora de comparar los resultados obtenidos con lo que sucede en humanos. La mayoría de las infecciones en pacientes con susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacteria (MSMD -*mendelian susceptibility to mycobacterial disease*-) ocurre de manera natural, mientras que en los ratones, estas infecciones son experimentales y se administran con frecuencia vía intravenosa, controlando la cepa y la dosis del patógeno que se inocula.

## 4.2. Estudios de asociación genética en humanos

Los patógenos infecciosos son una de las fuerzas selectivas más potentes que actúan sobre las poblaciones humanas. Sin embargo, la genética del huésped influye en la susceptibilidad de los individuos a enfermedades infecciosas (Karlsson EK *et al*, 2014). El desarrollo de tuberculosis u otras enfermedades micobacterianas, es el resultado de una

interacción compleja entre el huésped, el patógeno y la influencia de los factores ambientales. En humanos, se ha investigado el papel de algunos genes candidatos que podrían estar implicados en la susceptibilidad a tuberculosis. Se han utilizado varios métodos, entre ellos, los estudios de casos-controles, la identificación de genes candidatos, estudios en familias, y los estudios de asociación del genoma completo (GWAS -*genome-wide association study*-), que pueden servir como marcadores genéticos de predisposición o de predeterminación en el desarrollo de la enfermedad. Varios estudios sugirieron que la deficiencia de la lectina de unión a manosa (MBL -*mannose-binding lectin*-) ha podido mantenerse evolutivamente debido a la capacidad reducida de las micobacterias para invadir a los macrófagos en ausencia de MBL (Alcaïs A *et al*, 2009; Cheepsattayakorn A *et al*, 2009). Los genes implicados en la defensa frente a infecciones evolucionan más rápidamente que otros genes, y los numerosos polimorfismos existentes en el genoma humano, pueden ser consecuencia de la presión selectiva ejercida por las enfermedades infecciosas. Durante la evolución, todos estos polimorfismos pueden haber evolucionado debido a la interacción huésped-patógeno. Entre los genes candidatos que pueden estar asociados en la susceptibilidad a tuberculosis, se encuentran el gen del receptor de la vitamina D, genes receptores de TLR-1 y TLR-2, TNF, o moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA -*human leukocyte antigen*-), aunque no existe una consistencia entre los resultados obtenidos en estudios independientes. Sin embargo, varios estudios en el gen *NRAMP1*, proporcionan evidencias sobre su papel en el inicio temprano de la tuberculosis en humanos, aunque los resultados de estos estudios también presentan inconsistencias, incluso dentro de una misma población de estudio (Fortin A *et al*, 2007; Stein C, 2011). El efecto de los polimorfismos *NRAMP1* es heterogéneo entre las distintas poblaciones, condiciones epidemiológicas y fenotipo clínico. Se ha visto que los polimorfismos del gen *IL12RB1* también podrían influenciar el riesgo de desarrollar tuberculosis pulmonar en adultos (Cheepsattayakorn A *et al*, 2009). Otros estudios realizados en una cohorte de Indonesia, en el sudeste asiático, sugirieron una asociación entre la tuberculosis pulmonar y ciertos polimorfismos en genes involucrados en la actividad de IFN- $\gamma$  (Png E *et al*, 2012). Un trabajo reciente identifica ciertas variantes genéticas en el gen *ASAP1* que se asocian a la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis. El gen *ASAP1* codifica para una proteína implicada en la remodelación de la membrana, y en la adhesión y migración celular. El trabajo mostró que una reducción excesiva en la expresión de ASAP1 en las DCs infectadas con *M. tuberculosis* llevó a un daño en la migración de estas células, sugiriendo un mecanismo potencial de predisposición a

tuberculosis (Curtis J *et al*, 2015). Los mecanismos epigenéticos juegan un papel en el sistema inmunológico, y su investigación, a través de análisis GW (*genome-wide*) del metiloma, proporciona además, una nueva visión de la base genética de la infección y la tuberculosis clínica (Abel L *et al*, 2014).

### 4.3. Inmunodeficiencias primarias y enfermedad por micobacterias

Las enfermedades monogénicas son un modelo ideal de estudio para conocer el efecto de los diferentes componentes del sistema inmunológico en la enfermedad. El conocimiento de las inmunodeficiencias primarias (IDPs) y las infecciones asociadas a ellas, proporciona información valiosa sobre los mecanismos de defensa utilizados frente a estas infecciones, particularmente en la enfermedad por micobacterias en condiciones naturales, siendo de gran utilidad para el tratamiento de estos pacientes. Las IDPs constituyen un grupo heterogéneo de más de 200 enfermedades de origen genético, caracterizado por defectos en el sistema inmunológico (Alcaïs A *et al*, 2009). Los pacientes con formas clásicas de IDPs son generalmente susceptibles a la infección por virus, bacterias, hongos y protozoos, y pueden sufrir una gran variedad de manifestaciones clínicas, en su mayoría una mayor susceptibilidad a infecciones y una predisposición a enfermedades autoinmunes y enfermedades malignas (Al-Herz W *et al*, 2014). Aunque la prevalencia de las IDPs varía entre los diferentes grupos étnicos y países, se estima en 1 por 10.000 individuos, excluyendo el déficit de IgA (que es la inmunodeficiencia más común). Sin embargo, sólo unos pocos de estos defectos genéticos predisponen a la infección por micobacterias. Los niños con inmunodeficiencia combinada grave (SCID - *severe combined immunodeficiency*-) son vulnerables al BCG, aunque dos tercios de los niños vacunados (y por tanto infectados) con BCG no han desarrollado enfermedad diseminada (Marciano BE *et al*, 2014). Existen muy pocos casos descritos de pacientes con SCID que hayan padecido enfermedad causada por la infección por micobacterias ambientales, en parte debido al bajo nivel de exposición a estas bacterias en estos niños, que a menudo fallecen en el primer año de vida en ausencia de un trasplante de médula ósea. En pacientes con síndrome de hiper-IgE (HIES -*hyper-IgE syndrome*-) o con enfermedad granulomatosa crónica (CGD -*chronic granulomatous disease*-), sólo un pequeño porcentaje de los individuos afectados sufre infección por micobacterias. Por otra parte, un tercio de los pacientes afectados de displasia anhidrótica ectodérmica, con

inmunodeficiencia debida a mutaciones que afectan a la activación del factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$  -*nuclear factor  $\kappa B$* -), se asocian a enfermedad por micobacterias.

GATA-2 es un factor de transcripción que interviene en la hematopoyesis temprana y en el desarrollo vascular y linfático. Mutaciones en el gen *GATA2* confieren una predisposición a enfermedad diseminada por MNT asociada a desórdenes hematológicos, un fenómeno referido como síndrome MonoMAC (monocitopenia con *M. avium* complex). Este síndrome incluye una disminución en el número de DCs circulantes, monocitos, células B y células NK, y mielodisplasia. Las mutaciones en *GATA2* confieren un defecto autosómico dominante y los pacientes son susceptibles a infecciones virales, fúngicas y micobacterianas. La penetrancia clínica es completa, aunque de expresión variable, con un comienzo que abarca desde la primera infancia a la edad adulta tardía. Aunque la deficiencia de GATA-2 se relaciona con MSMD, no se engloba dentro de esta categoría (Hsu A *et al*, 2011; Dickinson R *et al*, 2014).

La deficiencia en el ligando de CD40 (CD40L) es un desorden genético raro de células T, que lleva a un síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X (X-HIGM -*X-linked hyper IgM syndrome*-) (Durandy A *et al*, 2006). La molécula CD40L se expresa normalmente en linfocitos T activados, y tras la unión a CD40, esta se expresa en macrófagos, DCs y linfocitos B. Estas señales, inducen la producción de IL-12, en parte a través de NEMO-NF- $\kappa B$ . Mutaciones en el gen que codifica para CD40L resultan en un daño en la interacción entre los linfocitos T y las APCs, que lleva a un fallo en la activación de los macrófagos y al cambio de isotipo de inmunoglobulina en los linfocitos B. Los pacientes presentan infecciones bacterianas recurrentes asociado con bajos niveles de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgE en suero, y niveles normales o elevados de IgM. Además de las infecciones bacterianas, estos pacientes pueden presentar con frecuencia, otras infecciones oportunistas por *Pneumocystis jirovecii* y *Cryptosporidium parvum*. También se han descrito casos de infección por BCG local y diseminada, enfermedad por MNT y *M. tuberculosis*. La infección por *M. tuberculosis* puede ser especialmente grave en pacientes que viven en áreas endémicas de tuberculosis debido al daño en la producción de IL-12 dependiente de CD40 durante la infección (Reichencach J *et al*, 2001; Wang L-L *et al*, 2014; Van Hoeyveld E *et al*, 2007; Boisson-Dupuis S *et al*, 2015).

Estos casos ponen de manifiesto el papel que desempeñan los linfocitos T en la inmunidad protectora frente a micobacterias poco virulentas, como BCG y algunas especies de MNT. Sin embargo, la mayoría de defectos de linfocitos T e incluso las deficiencias de HLA clase I y de HLA clase II no predisponen a la infección por

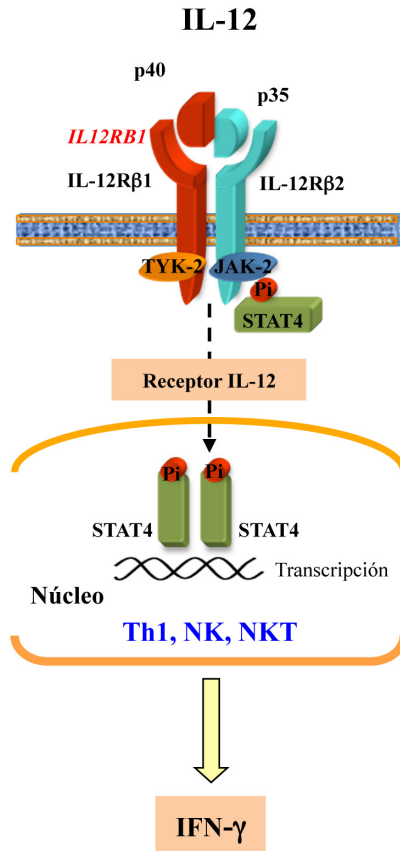


micobacterias ambientales, indicando que, aunque parezca paradójico, aparentemente la presentación antigénica por moléculas de HLA a los linfocitos T no es necesaria para una inmunidad protectora frente a micobacterias poco virulentas (Casanova J-L *et al*, 2002).

Al contrario que las IDPs nombradas anteriormente, MSMD (OMIM -*Online Mendelian Inheritance in Man*- 209950) es una inmunodeficiencia primaria rara, caracterizada por una predisposición selectiva a enfermedad clínica causada por micobacterias poco virulentas, como las vacunas BCG y micobacterias ambientales no tuberculosas (MNT), en pacientes sanos sin alteraciones evidentes en los test hematológicos e inmunológicos de rutina. Los individuos también son vulnerables a especies más virulentas como *M. tuberculosis*. Otras infecciones por virus u organismos intramacrofágicos son raras, a excepción de la salmonelosis no tifoidea extraintestinal, documentada en menos de la mitad de los pacientes. Las manifestaciones clínicas en estos pacientes son diversas y pueden presentarse como infección localizada, pero más frecuentemente diseminada. Estos defectos, han puesto de manifiesto el papel que tiene el sistema IL-12/IFN- $\gamma$  en la defensa frente a micobacterias en humanos (Casanova J-L *et al*, 2002; Alcaïs A *et al*, 2005; Rosenzweig SD *et al*, 2005; Filipe-Santos O *et al*, 2006; Prando C *et al*, 2013).

#### 4.4. Susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacterias (MSMD)

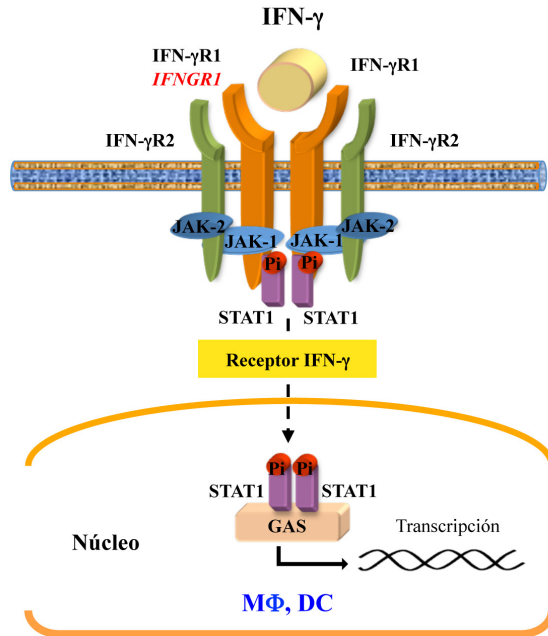
La inmunidad natural a micobacterias depende del circuito IL-12/IFN- $\gamma$  que conecta el sistema inmunológico innato mediante la interacción de células mieloides (monocitos, macrófagos y DCs) con células linfoides (células T y células NK) del sistema inmunológico adquirido (Wu UI *et al*, 2015). El principal mecanismo efector en la inmunidad frente una infección por micobacterias tiene lugar durante la activación de los macrófagos por citocinas del tipo I, fundamentalmente el IFN- $\gamma$ . Tras la fagocitosis, los macrófagos secretan IL-12p70, un heterodímero de IL-12p40 y IL-12p35 que se une a su receptor IL-12R en la superficie de las células Th1 y células NK. Este receptor consiste en dos cadenas, IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 que se asocian con Tirosina kinasa-2 (Tyk2) y Janus kinasa-2 (Jak2) respectivamente. La activación de este complejo por la IL-12 (IL-12p40 interacciona con la subunidad IL-12R $\beta$ 1 e IL-12p35 se une a la subunidad IL-12R $\beta$ 2), promueve la fosforilación, homodimerización y translocación al núcleo del transductor de señal y activador de la transcripción 4 (STAT-4 -*signal transducer and activator of transcription-4*-), induciendo la producción de IFN- $\gamma$  (**Figura 2**).



**Figura 2. Receptor de la IL-12.** La IL-12 coordina las respuestas inmunológicas innata y adquirida. El evento más importante de la señalización IL-12, es la activación la familia STAT, principalmente STAT4, que promueve la diferenciación de células T CD4+ vírgenes a células Th1, la citotoxicidad mediada por las células NK y la proliferación de las células. TYK-2: Tirosina quinasa; JAK-2: Janus quinasa-2; STAT4: transductor de señal y activador de la transcripción 4.

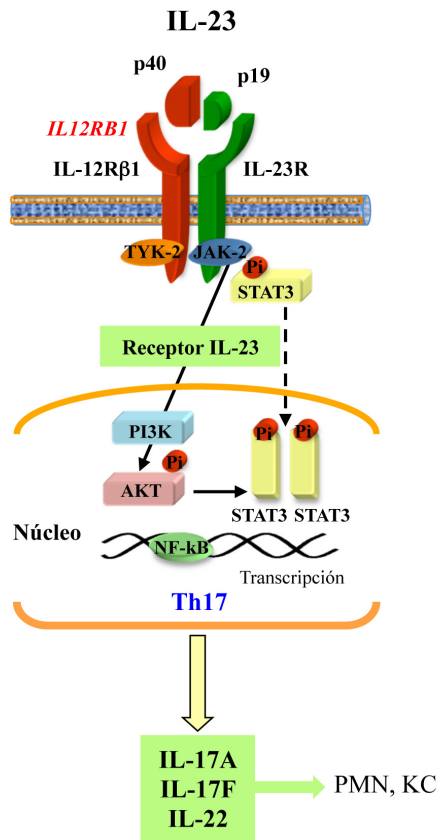
El IFN- $\gamma$  secretado por las células Th1 y las células NK actúa mediante la unión a su receptor IFN- $\gamma$ R (un heterodímero de IFN- $\gamma$ R1 y IFN- $\gamma$ R2) en la superficie de los macrófagos y otras células. La unión del IFN- $\gamma$  a su receptor lleva a la fosforilación de Jak1 y Jak2, lo que permite el reclutamiento del transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT-1 *-signal transducer and activator of transcription-1-*), que es también fosforilado. La fosforilación de STAT-1 promueve la formación de dímeros de STAT-1 y su translocación al núcleo, donde se une a secuencias promotoras GAS

(*interferon-gamma activated sequence*) induciendo la expresión de genes estimulados por interferón (ISG -*interferon stimulated genes*-) (**Figura 3**).



**Figura 3. Receptor del IFN-γ.** JAK-1: Janus quinasa-1; JAK-2: Janus quinasa-2; STAT1: transductor de señal y activador de la transcripción 1; GAS: secuencias activadas por IFN-γ.

Estos productos génicos dotan a los macrófagos de mecanismos para el confinamiento y eliminación de micobacterias e inducen la producción de IL-12 y TNF- $\alpha$ . A su vez, IL-12 induce la producción de IFN- $\gamma$ , esencial para la formación de granulomas (Rosenzweig SD *et al*, 2005; Wu UI *et al*, 2015). El gen *IL12B* codifica para una subunidad de la IL-12 y de la IL-23. La IL-23 es un heterodímero que comparte la misma subunidad IL-12p40 que la IL-12, y una subunidad p19 que se une a un receptor heterodimérico compuesto por IL-12R $\beta$ 1 (idéntico al receptor de la IL-12) e IL-23R (**Figura 4**). Aunque la IL-12 y la IL-23 ejercen funciones similares como la estimulación de la producción de IFN- $\gamma$ , la IL-23 induce en mayor medida el desarrollo de las células T productoras de IL-17 (Th17) (Casanova J-L *et al*, 2002; Ottenhof TH *et al*, 2002; Filipe-Santos O *et al*, 2006).



**Figura 4. Receptor de la IL-23.** La cadena IL-12Rβ1 del receptor de IL-23 se asocia con TYK-2 en una forma dependiente de ligando con STAT3. La cadena IL23R interactúa directamente con JAK-2. La activación de STAT3 inducida por IL-23 conduce a la unión directa de STAT3 fosforilado a los promotores de IL-17 e IL-17F. STAT3 aumenta la expresión de ROR-γ, un regulador transcripcional específico de Th17 que es crítico para la expresión de IL-17A e IL-17F. La activación de JAK2 inducido por IL-23 desencadena las vías PI3K/AKT y NF-κB vías que son requeridas para la producción de IL-17 e IL-22 que actúan sobre las células KC y PMN. TYK-2: Tirosina quinasa; JAK-2: Janus quinasa-2; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; PI3K/AKT: vía fosfatidilinositol-3-quinasa/AKT; NF-κB: Factor nuclear κB; KC: keratinocitos; PMN: células polimorfonucleares (neutrófilos).

Desde 1996, han sido descritos 9 genes causantes de MSMD, siete genes autosómicos (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IRF8*, *ISG15*) y dos genes ligados al cromosoma X (*IKBKG*, *CYBB*). La mayoría de los productos génicos están inmunológicamente relacionados e involucrados en la inmunidad mediada por IFN-γ. Tres genes controlan la respuesta a IFN-γ, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*; cuatro genes están

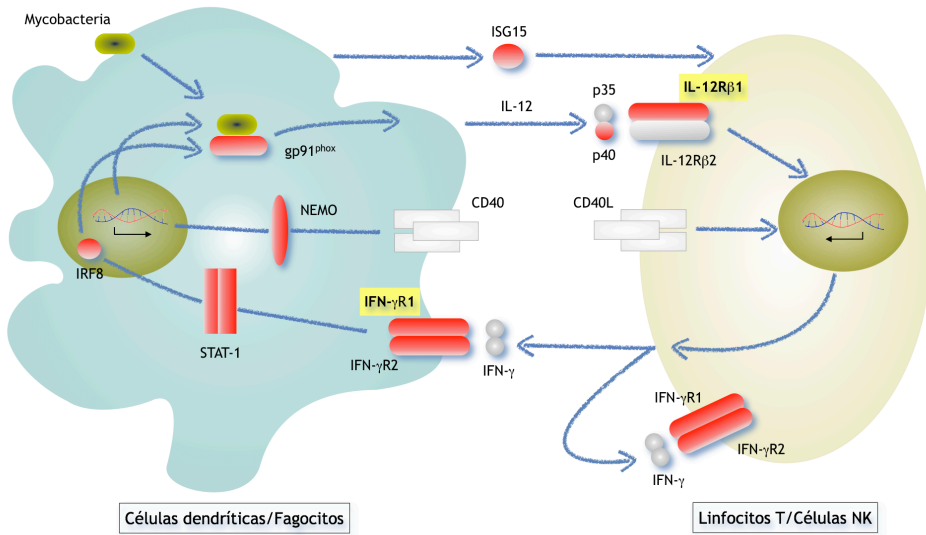
involucrados en la producción de IFN- $\gamma$ , *IL12B*, *IL12RB1*, *IKBKG*, *ISG15*; uno está involucrado en la secreción de IL-12 dependiente de IFN- $\gamma$ , *IRF8*; y otro gen que controla el estallido respiratorio en los macrófagos (*CYBB*), el cual puede estar desencadenado por el IFN- $\gamma$ . Los defectos genéticos en *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1* e *IRF8* dañan la respuesta celular a IFN- $\gamma$  y los defectos en *IL12B* e *IL12RB1*, además de ocasionar una deficiencia de producción de IFN- $\gamma$ , conllevan un defecto en el desarrollo de las Th17 y de la producción de IL-17. Mutaciones específicas en *IKBKG* y *CYBB* causan susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacterias ligada al cromosoma X.

El alto nivel de heterogeneidad alélica muestra hasta 18 etiologías genéticas diferentes basadas en el modo de heredabilidad (dominante o recesivo), el impacto de la mutación (nula o hipomórfica) y la expresión (expresión o no de los receptores en la superficie celular) y función del alelo mutante (fosforilación, unión al ADN o ambos) como responsables de MSMD (Al-Muhsen S *et al*, 2008; Bustamante J *et al*, 2014). En la **Tabla 2** se muestra la clasificación actualizada de las etiologías genéticas causantes de la MSMD.

| Gen            | Heredabilidad | Defecto | Proteína |
|----------------|---------------|---------|----------|
| <i>IL12B</i>   | AR            | C       | E-       |
| <i>IL12RB1</i> | AR            | C       | E+       |
| <i>IFNGR1</i>  | AR            | C       | E-       |
|                | AR            | C       | E+       |
|                | AR            | P       | E+       |
| <i>IFNGR2</i>  | AD            | P       | E+++     |
|                | AR            | C       | E+       |
|                | AR            | C       | E-       |
|                | AR            | P       | E+       |
| <i>STAT1</i>   | AD            | P       | E+P-     |
|                | AD            | P       | E+B-     |
|                | AD            | P       | E+P-B-   |
| <i>IRF8</i>    | AD            | P       | E+       |
| <i>NEMO</i>    | XR            | P       | E+       |
| <i>CYBB</i>    | XR            | C       | E+       |
| <i>ISG15</i>   | AR            | C       | E-       |

**Tabla 2. Etiología genética de las MSMD.** Modificado de Bustamante J *et al*, *Seminars in Immunology*, 2014. Modo de herencia AR: autosómico recesivo; AD: autosómico dominante; XR: recesivo ligado al cromosoma X. Defecto funcional C: defecto completo; P: defecto parcial. Proteína mutante E+: expresada; E-: no expresada; P-: no fosforilada; B-: incapaz de unirse al ADN bajo estimulación con IFNs.

A pesar de los avances realizados, estos defectos representan sólo la mitad de los pacientes con MSMD conocidos y aproximadamente en la mitad de todos los pacientes con enfermedad diseminada por MNT, el defecto en el eje IL-12/IFN- $\gamma$  no está identificado (Wu UI *et al*, 2015; Bustamante J *et al*, 2014). De las deficiencias conocidas causantes de MSMD, la deficiencia de IFN- $\gamma$ R1 y la deficiencia IL12-R $\beta$ 1 son las más frecuentes, y representan casi el 80% de todos los casos diagnosticados genéticamente (**Figura 5**).



**Figura 5. Defectos genéticos en la inmunidad mediada por el IFN- $\gamma$ .** Modificado de Bustamante J *et al*, Seminars in Immunology, 2014. Se han identificado 9 genes causantes de MSMD. Las proteínas afectadas se muestran en rojo.

#### 4.4.1. Deficiencia del receptor 1 de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ R1)

La primera etiología genética de MSMD fue identificada en 1996, con mutaciones nulas en el gen *IFNGR1*, bajo el término de deficiencia autosómica recesiva completa de IFN- $\gamma$ R1 (RC-IFN- $\gamma$ R1 -*autosomal recessive complete IFN- $\gamma$ R1-*) y es el resultado de mutaciones en las que no se observa expresión de este receptor (Jouanguy E *et al*, 1996). La mayoría de los pacientes portan mutaciones homocigotas, con sólo unos pocos heterocigotos identificados. Hasta la fecha hay identificados 33 pacientes procedentes de

27 familias y 25 mutaciones diferentes: deleciones (n=10), inserciones (n=4), sin sentido (n=2), missense (n=5) y en sitios de empalme (n=4) (Bustamante J *et al*, 2014; Olbrich P *et al*, 2015). Se han descrito dos formas de deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1, con o sin expresión en superficie del receptor (Dorman SE *et al*, 2004).

En la deficiencia de RC-IFN- $\gamma$ R1 el fenotipo celular se caracteriza por la pérdida total de respuesta a IFN- $\gamma$  *in vitro* de los leucocitos y fibroblastos en términos de producción de IL-12p70 o TNF- $\alpha$ . El plasma de estos pacientes contiene niveles muy elevados de IFN- $\gamma$  (Al-Muhsen S *et al*, 2008). Los pacientes presentan un fenotipo clínico grave que se caracteriza por infecciones por BCG o MNT (*M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. peregrinum*, *M. mageritense* y *M. scrofulaceum*) de comienzo temprano y diseminadas. En ausencia de trasplante de médula ósea (el único tratamiento curativo) la mortalidad es cercana al 50% antes de los 10 años de edad (Wu UI *et al*, 2015). La infección por *M. tuberculosis* sólo se ha identificado en dos pacientes incluyendo un paciente que murió por enfermedad diseminada a pesar del tratamiento antibiótico. La penetrancia clínica en la infancia es completa con un comienzo de infecciones antes de los tres años de edad. La salmonelosis ha sido descrita en menos del 5% de los niños con esta deficiencia (3 pacientes) (Jouanguy E *et al*, 1996; Newport MJ *et al*, 1996; Dorman SE *et al*, 2004). Otras infecciones causadas por patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Toxoplasma* spp., así como virus incluyendo citomegalovirus (CMV) o herpesvirus humano 8 (HHV8), virus respiratorio sincitial (VRS) y el virus de varicela-zóster (VZV), se han descrito en pacientes individuales. Sin embargo, no se puede descartar que otros factores, distintos a la señalización por IFN- $\gamma$ , puedan influenciar la susceptibilidad a otras infecciones en estos pacientes. (Al-Muhsen S *et al*, 2008; Bustamante J *et al*, 2014). El tratamiento con IFN- $\gamma$  no está indicado por la pérdida de receptores específicos. El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT -*hematopoietic stem cell transplantation*-) es el único tratamiento de curación conocido (Roesler J *et al*, 2004).

La forma más común de deficiencia de IFN- $\gamma$ R1 es la forma autosómica dominante parcial IFN- $\gamma$ R1 (DP-IFN- $\gamma$ R1 -*autosomal dominant partial IFN- $\gamma$ R1*-), identificada por primera vez en 1999 (Jouanguy E *et al*, 1999b), (68 pacientes procedentes de 43 familias), resultante de mutaciones en heterocigosis en el segmento citoplasmático de *IFNGR1*, dando lugar a un incremento de moléculas truncadas no funcionales que se acumulan en la superficie celular. Estas moléculas se unen a IFN- $\gamma$  pero no transducen la señal, ejerciendo un efecto dominante negativo. Todas las mutaciones confieren un fenotipo celular similar que se caracteriza por una respuesta residual a estimulación con IFN- $\gamma$  *in vitro*. El fenotipo

clínico es menos grave que en los niños con deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1, dado que sólo 1 paciente de los 68 descritos ha fallecido (Bustamante J *et al*, 2014) y varios pacientes han alcanzado o han sido diagnosticados en la edad adulta. Los pacientes suelen presentar infecciones recurrentes y moderadamente graves por MNT (*M. abscessus*, *M. avium complex*, *M. chelonae*, *M. kansasii*) y BCG. Sólo se han descrito casos de infección por *Salmonella* spp. en un 5% de los pacientes con DP-IFN- $\gamma$ R1. Más de un 70% de los pacientes presentaron osteomielitis. Además se han detectado otros patógenos asociados como *Histoplasma capsulatum* y VZV en pacientes individuales, mientras que dos pacientes sufrieron tuberculosis, uno debido a *M. tuberculosis* y el otro por *M. bovis*, como única infección. El pronóstico en estos pacientes es bueno y la infección por micobacterias puede ser controlada con tratamiento antibiótico con o sin IFN- $\gamma$  (Jouanguy E *et al*, 1999b; Dorman SE *et al*, 2004; Filipe-Santos O *et al*, 2006; Al-Muhsen S *et al* 2008; Bustamante J *et al*, 2014).

No todos los pacientes con deficiencia de IFN- $\gamma$ R1 presentan estas formas. En 1997 se publicaron dos pacientes homocigotos para la mutación p.I87T en *IFNGR1* que presentaban una respuesta parcial a IFN- $\gamma$  *in vitro* y una presentación clínica más leve. El fenotipo celular mostró que el IFN- $\gamma$ R1 podía ser detectado en la superficie celular aunque en expresión variable. Estos receptores sí son capaces de unir IFN- $\gamma$  y se observó una respuesta baja pero detectable a altas concentraciones de IFN- $\gamma$  *in vitro* (Jouanguy E *et al*, 1997).

#### **4.4.2. Deficiencia del receptor 2 de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ R2)**

La deficiencia de IFN- $\gamma$ R2 fue identificada en 1998 y es una de las etiologías MSMD más raras (Moncada-Vélez M *et al*, 2013). Tanto la deficiencia AR completa como la AR parcial del IFN- $\gamma$ R2 son responsables de causar MSMD.

Los pacientes con deficiencia AR completa muestran una respuesta celular a IFN- $\gamma$  suprimida en cuanto a fosforilación de STAT-1, activación del factor gamma activado (GAF) y la inducción de genes diana dependientes de GAF. Las manifestaciones comienzan en la infancia temprana con infecciones a menudo mortales. Los patógenos más comunes identificados incluyen a *M. bovis* BCG, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. simiae* y *M. porcium* (Toyoda H *et al*, 2010; Martínez-Barricarte R *et al*, 2014). El HSCT es el único tratamiento curativo en pacientes con mal pronóstico.



La deficiencia AR parcial de IFN- $\gamma$ R2 daña pero no suprime la respuesta a IFN- $\gamma$ . Las infecciones por micobacterias encontradas son causadas por BCG, *M. bovis*, *M. abscessus*, *M. elephantis*, *M. fortuitum* y *M. simiae*. En este caso los antibióticos suplementados IFN- $\gamma$  parecen ser efectivos (Moncada-Vélez M *et al*, 2013; Bustamante J *et al*, 2014).

Se ha identificado hasta la fecha un único paciente con deficiencia AD parcial de IFN- $\gamma$ R2 y MSMD (Kong XF *et al*, 2013). Las células del paciente mostraron una respuesta a IFN- $\gamma$  ligeramente dañada, de manera similar a la de aquellos pacientes con MSMD con deficiencia AR parcial IFN- $\gamma$ R2 o deficiencia de STAT1. Es probable que la mutación en heterocigosis que porta el paciente en el gen *IFNGR2* y que origina la deficiencia de tipo AD IFN- $\gamma$ R2, sea la causante de MSMD. La penetrancia clínica de esta forma de enfermedad es incompleta debido a la variabilidad en la respuesta celular a IFN- $\gamma$  en estos individuos, ya que otros individuos heterocigotos identificados han permanecido sanos, incluido un familiar del paciente (padre). De hecho es la penetrancia más baja encontrada entre las AD IDPs por haploinsuficiencia (Bustamante J *et al*, 2014).

#### 4.4.3. Deficiencia de la cadena $\beta$ 1 del receptor de la IL-12 (IL-12R $\beta$ 1)

La deficiencia AR completa de IL-12R $\beta$ 1 es probablemente la causa más frecuente de MSMD. Fue descrita por primera vez en 1998 (Jong R *et al*, 1998) y hasta la fecha se han diagnosticado 181 pacientes de 137 familias, habiéndose identificado 78 mutaciones: mutaciones sin sentido (n=18), missense (n=24), sitios de empalme (n=13), pequeñas deleciones (n=16), deleciones largas (n=3) inserciones (n=1), y duplicaciones (n=3) (Bustamante J *et al*, 2014; Senanayake MP *et al*, 2015). Las células T activadas y NK de los pacientes con deficiencia AR IL-12R $\beta$ 1 no expresan el receptor en la superficie. De hecho los pacientes analizados no responden a IL-12 e IL-23, y todos producen bajos niveles de IFN- $\gamma$  (Fieschi C *et al*, 2004). El fenotipo clínico es muy heterogéneo. Algunos pacientes fallecen a edades tempranas (32%) mientras que otros no han manifestado la enfermedad en edad adulta (la penetrancia clínica global es del 79% entre los 7 y los 20 años) (de Beaucoudrey L *et al*, 2010). Las infecciones más frecuentemente observadas son las debidas a infecciones por MNT (BCG, *M. avium*, MAC, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum-chelonae complex*, *M. genevense*, *M. gordonae*, *M. tilburgii*, *M. triplex* y *M. simiae*) (Bustamante J *et al*, 2014). Además, se han descrito varios pacientes no relacionados que sufrieron tuberculosis grave como único fenotipo infeccioso. La segunda causa más frecuente de infección es la salmonelosis no tifoidea extraintestinal, descrita en

casi la mitad de los pacientes afectados (Wu UI *et al*, 2015). Se han descrito otras infecciones en estos pacientes debidas a patógenos como *K. pneumoniae* e infecciones fúngicas por *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp. y *Cryptococcus neoformans*. Además, se han documentado casos raros de infecciones parasitarias como toxoplasmosis y leishmaniasis. La mortalidad es cercana al 30%, la mayoría debida a infecciones graves por MNT (de Beaucoudrey L *et al*, 2010; Prando C *et al*, 2013; Boisson-Dupuis S *et al*, 2015). El pronóstico en estos pacientes es variable. El tratamiento frente a micobacterias incluye antibióticos potentes y de uso prolongado así como IFN- $\gamma$  subcutáneo. El tratamiento profiláctico con antibióticos puede ser considerado en episodios recurrentes de salmonelosis (Al-Muhsen S *et al*, 2008; Bustamante J *et al*, 2014) y no se contempla el trasplante de médula ósea salvo en casos raros.

#### **4.4.4. Deficiencia de la subunidad p40 de la IL-12 (IL-12p40)**

La IL-12 se compone de las subunidades p35 y p40 codificadas por los genes *IL12A* e *IL12B* respectivamente. En 1999 se publicó la deficiencia en el gen codificante de la subunidad IL-12p40 (*IL12B*). La subunidad p40 también puede asociarse con p19 y formar la IL-23. La deficiencia de IL-12p40 fue la primera inmunodeficiencia descubierta que resulta en un defecto de citocina heredado. Se han identificado diversas mutaciones en numerosos pacientes en familias procedentes de varios países. Todas las mutaciones confieren un defecto AR completo. Prácticamente todos los pacientes vacunados con BCG sufrieron enfermedad por BCG. Se han descrito además infecciones causadas por *M. tuberculosis* y MNT. La salmonelosis se ha descrito en un 25% de los pacientes y a menudo se manifiesta de forma recurrente. Otras infecciones son causadas por varios patógenos, entre los que se incluyen hongos del género *Candida* y bacterias como *Klebsiella* spp. y *Nocardia* spp. La penetrancia clínica es de un 50% antes de los 12 años de edad. El tratamiento de estos pacientes se lleva a cabo mediante el uso prolongado de antibióticos e IFN- $\gamma$  recombinante, y no se recomienda HSCT en la mayoría de los casos (Filipe-Santos O *et al*, 2006; Bustamante J *et al*, 2014; Wu UI *et al*, 2015).

#### 4.4.5. Deficiencia de ISG15

La deficiencia ISG15 fue descrita por primera vez en 1979. El gen *ISG15* (*interferon-stimulated gene 15*), codifica para la proteína intracelular ISG15. Esta proteína ISG15 puede ser liberada en los humanos por los neutrófilos, monocitos, linfocitos y por los gránulos secretores de los granulocitos. La ISG15 secretada actúa sobre las células T y NK induciendo la producción de IFN- $\gamma$ . El defecto en ISG15 causa un daño en la producción de IFN- $\gamma$ , aunque ésta no está completamente suprimida. Los pacientes con deficiencia AR completa de ISG15 presentan enfermedad grave por micobacterias (Bogunovic D *et al*, 2013; Al-Muhsen S *et al*, 2008).

#### 4.4.6. Deficiencia de IRF8

El factor 8 regulador de interferón (IRF8 -*interferon regulatory factor 8*-), es un miembro de la familia de factores reguladores de IFN que se expresa a altos niveles en fagocitos mononucleares y regula la diferenciación de macrófagos y granulocitos y el desarrollo de DCs. IRF8 puede activar o suprimir la transcripción génica bajo la estimulación con IFN- $\gamma$ , lipopolisacárido (LPS) y otros estímulos microbianos. IRF8 juega un papel importante en la defensa frente a patógenos intracelulares, activando las defensas antimicrobianas, la producción de IL-12 en respuesta a IFN- $\gamma$  y la defensa frente a la infección por *M. tuberculosis* (Hambleton S *et al*, 2011; Marquis JF *et al*, 2011). En 2011 se describen los primeros 3 pacientes con deficiencia IRF8: un niño con deficiencia AR completa de IRF8 y dos pacientes, un varón adulto y una joven adolescente con deficiencia AD IRF8.

Los dos pacientes con deficiencia AD parcial IRF8 presentaron un recuento normal de linfocitos circulantes, monocitos y granulocitos, pero mostraron una pérdida selectiva de la principal subpoblación de DCs mieloides (DR+CD11c+CD1c+). Las manifestaciones clínicas en ambos pacientes fueron episodios recurrentes de enfermedad BCG diseminada sin otras enfermedades infecciosas. Un adecuado tratamiento con antibióticos micobacterianos ha permitido que en la actualidad los dos pacientes estén sanos y sin tratamiento (Hambleton S *et al*, 2011; Bustamante J *et al*, 2014).

El paciente con deficiencia AR de IRF8 presentó una ausencia de monocitos y DCs, y sufrió varias enfermedades infecciosas incluyendo enfermedad BCG diseminada, candidiasis oral e infecciones respiratorias graves, y recibió HSCT como tratamiento

curativo además de terapia antibiótica y antifúngica. Debido al amplio fenotipo infeccioso y defectos en los estudios hematológicos e inmunológicos de rutina, esta forma de la enfermedad no se considera una etiología MSMD (Salem S *et al*, 2014).

#### 4.4.7. Deficiencia de STAT1.

La deficiencia STAT1 ha sido descrita en varios pacientes e implica al factor de transcripción STAT-1, clave en la respuesta celular mediada por citocinas incluyendo IFNs de tipo I (INF- $\alpha/\beta$ ), tipo II (INF- $\gamma$ ) y tipo III (INF- $\lambda$ ) (Bustamante J *et al*, 2014). Además de en la señalización por parte del IFN- $\gamma$ R, STAT-1 se encarga de la respuesta intracelular mediada por los receptores de interferones tipo I (INF- $\alpha$ ,  $\beta$ ) y tipo III (INF- $\lambda$ ). La señalización por estos receptores induce la formación y fosforilación de los heterodímeros STAT1-STAT2, que interactúan con el factor 9 regulador de interferón (IRF9 - *interferon regulatory family-9*). Este heterodímero se transloca al núcleo y se une a una secuencia de ADN específica denominada elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE -*IFN-stimulated response elements*-), induciendo la transcripción de genes (Kristensen IA *et al*, 2011; Sampaio E *et al*, 2012).

Se han encontrado varias mutaciones en el gen *STAT1*. Estas mutaciones confieren defectos de deficiencia AR completa o parcial de STAT1 o AD STAT1 (Averbuch D *et al*, 2011; Boisson-Dupuis S *et al*, 2012).

La deficiencia AD de STAT1, descrita en 2001, predispone a los individuos a enfermedad por micobacterias, debido a un daño en la inmunidad mediada por IFN- $\gamma$ , pero dado que no afecta a la inmunidad mediada por IFN- $\alpha/\beta$ , los pacientes no son particularmente susceptibles a infecciones virales. Los pacientes desarrollan infecciones causadas por BCG y MNT, como *M. avium*. Sin embargo, se han descrito algunos pacientes con esta deficiencia pero permanecen asintomáticos, por lo que la penetrancia clínica es incompleta. El pronóstico en estos pacientes es bueno y no existen muertes causadas por MSMD en pacientes con deficiencia AD de STAT1. El tratamiento con antibióticos e IFN- $\gamma$  es efectivo para tratar las infecciones (Chapgier A *et al*, 2009; Bustamante J *et al*, 2014).

Dos desórdenes relacionados, como las formas recesiva completa y parcial de la deficiencia de STAT1 dañan la respuesta a IFN- $\alpha/\beta$  e IFN- $\lambda$  y confieren una vulnerabilidad más amplia a micobacterias y virus, por lo que no se incluyen en la clasificación de MSMD (Döffinger R *et al*, 2001; Dupuis S *et al*, 2003; Chapgier A *et al*, 2009; Bustamante J *et al*, 2014). La deficiencia AR completa de STAT1 se caracteriza por una ausencia en la

expresión de la proteína normal y una respuesta celular suprimida, tanto a IFN- $\gamma$  antimicobacteriano como a los INF- $\alpha$  y - $\beta$  e IFN- $\lambda$  antivirales. Los pacientes presentaron una susceptibilidad muy grave a infecciones por micobacterias y virus y por tanto una clínica diferente a la que presentan los pacientes con MSMD (Chapgier A *et al*, 2006). En la deficiencia AR parcial de STAT1, la respuesta a IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  está dañada pero no completamente suprimida, y los pacientes son susceptibles a infecciones por BCG, *M. avium*, *M. szulgai*, *Salmonella* spp. y virus (virus del herpes simple -VHS-, *molluscum contagiosum*, VRS y VZV). En este caso, el fenotipo infeccioso es más amplio que en pacientes con MSMD (Bustamante J *et al*, 2014). El resultado clínico depende de la medida en que el defecto disminuya la respuesta a estas citocinas (Boisson-Dupuis S *et al*, 2012; Shamriz O *et al*, 2013).

#### 4.4.8. Deficiencia de NEMO.

La deficiencia de NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*) (IKK $\gamma$ ) fue descrita inicialmente en 1986. Las mutaciones en este gen dañan la activación de NF- $\kappa$ B. Este factor de transcripción juega un papel clave en la respuesta inflamatoria e inmunológica, así como en el control de la apoptosis (Döffinger R *et al*, 2001; Bustamante J *et al*, 2014). NF- $\kappa$ B es activado por una gran variedad de estímulos y son diversos los genes y respuestas biológicas que controla. El gen *NEMO* (o *IKBKKG*), localizado en el cromosoma X, codifica para un modulador esencial de NF- $\kappa$ B (NEMO). NEMO es una subunidad reguladora del complejo IKK que activa la vía de señalización NF- $\kappa$ B canónica, regulando la expresión de varios genes diana. Mutaciones en este gen confieren diferentes fenotipos tanto a nivel clínico como celular. Defectos completos en NEMO causan incontinenencia pigmenti dominante ligada al cromosoma X en mujeres, pero es letal *in utero* en fetos masculinos. Defectos parciales que dañan pero no suprimen por completo la señalización de NF- $\kappa$ B, confieren fenotipos que van desde la displasia anhidrótica ectodérmica a la osteoporosis y el linfedema. Los pacientes son susceptibles a MNT, bacterias encapsuladas, virus y *Pneumocystis jirovecii* (Puel A *et al*, 2004; Uzel G, 2005; Picard C *et al*, 2011), aunque la mayoría sufren de enfermedad neumocócica invasiva. Se han identificado dos mutaciones específicas en *NEMO*, (E315A y R319Q) que causan MSMD (Filipe-Santos O *et al*, 2006b). Estos pacientes sufren de infecciones por BCG y MNT. No se han descrito otras infecciones graves, con la excepción de infección invasiva por *Haemophilus influenzae* de tipo b en un paciente. El pronóstico difiere entre pacientes, que pueden verse

beneficiados tanto del tratamiento antibiótico como con IFN- $\gamma$  (Al-Muhsen S *et al*, 2008; Wu UI *et al*, 2015).

#### **4.4.9. Deficiencia de gp91<sup>phox</sup>**

El gen *CYBB* codifica para la subunidad gp91<sup>phox</sup> del complejo NADPH oxidasa. Se expresa en las células fagocíticas (granulocitos, monocitos y macrófagos) y en menor medida en otras células como los linfocitos B o las DCs. La mayoría de las mutaciones *CYBB* causan CGD, y llevan a infecciones graves recurrentes bacterianas y fúngicas por gérmenes catalasa positivos, así como a la formación de granulomas debido a los defectos en la NADPH oxidasa del fagocito. Sin embargo, dos mutaciones (Q231P y T178P) confieren una susceptibilidad limitada a BCG en lugar de la amplia susceptibilidad a la infección de la CGD. La identificación de estas mutaciones proporciona una base molecular para los defectos XR-MSMD en ausencia de otras infecciones (Bustamante J *et al*, 2011; Un-In Wu *et al*, 2015).

El esclarecimiento de las bases genéticas y moleculares de estos trastornos mendelianos proporciona conocimiento acerca de los mecanismos inmunológicos, frente a la defensa a micobacterias *in natura* (Alcaïs A *et al*, 2009).

## 5. INMUNIDAD FRENTE A *CANDIDA* SPP.

### 5.1. Modelos experimentales

Tradicionalmente, se pensaba que la inmunidad mediada por el IFN- $\gamma$ , firma de las respuestas de tipo Th1, era la responsable de la protección mediada por la inmunidad adquirida frente a la candidiasis mucocutánea (MC) (Romani L, 2004; Pirofski LA *et al*, 2009; Conti HR *et al*, 2010). La identificación de nuevas subpoblaciones de células T cooperadoras que se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (células Th17 y Th22) (Acosta-Rodriguez EV *et al*, 2007; Duhon T *et al*, 2009; Korn T *et al*, 2009; Trifari S *et al*, 2009; Zhou L *et al*, 2009), y los estudios en ratón y humanos con IDPs, sugieren que la patogénesis de la MC crónica (CMC) implica afectación en la inmunidad mediada por IL-17 e IL-22 (Eyerich K *et al*, 2008; Conti HR *et al*, 2009; Glocker EO *et al*, 2009; Pirofski LA *et al*, 2009; Burbelo PD *et al*, 2010; Conti HR *et al*, 2010; Kisand K *et al*, 2010; Ng WF *et al*, 2010; Puel A *et al*, 2010). Sin embargo, existen datos discordantes respecto al papel del circuito IL-12/IFN- $\gamma$  e IL-23/IL-17-IL22 en la inmunidad frente a *C. albicans* en diferentes modelos de ratones IL-12 (Zelante T *et al*, 2007; Conti HR *et al*, 2009; Conti HR *et al*, 2010; Ashman RB *et al*, 2011). La contribución relativa del circuito IL-12/IFN- $\gamma$  e IL-17-IL-22 en la inmunidad frente a diferentes formas de infección por *Candida* spp. (en particular diseminada frente a MC) queda por determinar, particularmente en seres humanos.

En el huésped humano, la boca es la ruta natural de entrada de *Candida* spp. En un modelo de infección oral en ratón, Conti *et al* (2009) encontraron que las infecciones por hongos en la lengua fueron menos graves en ratones deficientes en IL-12 (IL-12p35<sup>-/-</sup>) que en ratones deficientes en IL-23 (IL-23p19<sup>-/-</sup>), aunque en los ratones deficientes en IL-12 también había una carga fúngica significativamente más alta que en los ratones control. Este modelo de infección oral (la vía de infección natural en humanos) mostró que la inmunidad mediada por IFN- $\gamma$  e IL-12 es menos importante que la inmunidad mediada por IL-17 para la defensa del huésped frente a la candidiasis orofaríngea en ratones (OPC - *oropharyngeal candidiasis*-) (Conti HR *et al*, 2009). Los ratones deficientes en el receptor del IFN- $\gamma$  mostraron mayor susceptibilidad a infección sistémica por *C. albicans*. Por lo tanto los defectos en la respuesta celular Th1 pueden llevar a un daño significativo en la respuesta del huésped frente a la infección por *Candida* spp. (Wei X *et al*, 2011). Así, el circuito IL-12/IFN- $\gamma$  parece ser más relevante que el eje IL-23/IL-17 para limitar la extensión de la infección por hongos más allá de la cavidad oral y el consecuente desarrollo

de la infección diseminada (Conti HR *et al*, 2009). Estos datos sugieren que existe una acción conjunta en el circuito IL-12/IFN- $\gamma$  e IL-23/IL-17-IL-22 con el fin de proteger frente a la infección por *Candida* spp. y en humanos podría observarse un escenario similar. Sin embargo, *C. albicans* es comensal únicamente de humanos, los cuales muestran en su mayoría memoria inmunológica frente al *C. albicans*, mientras que en ratón es una primoinfección inducida.

## 5.2. Inmunodeficiencias primarias y enfermedad por *Candida* spp.

Las infecciones por hongos son cada vez más frecuentes en la población humana y contribuyen a la morbilidad en individuos sanos y a la mortalidad en individuos inmunocomprometidos (Holland S *et al*, 2009; Richardson JP *et al*, 2015). Esto puede ser debido al aumento de pacientes inmunosuprimidos, al uso de fármacos que producen inmunosupresión, al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, o al uso de catéteres intravenosos y técnicas diagnósticas invasivas. Todo ello presenta el efecto colateral de la infección oportunista, considerando a los hongos patógenos de importancia. Algunas de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la infección por el género *Candida* son: candidiasis orofaríngea (OPC), candidiasis vulvovaginal (VVC), candidiasis cutánea y candidiasis esofágica, siendo especialmente grave la candidiasis sistémica.

El sistema inmunológico del huésped es clave en la transición de un organismo comensal como *C. albicans* a infeccioso. La respuesta inmunológica del huésped frente a los hongos influye en la forma clínica de la enfermedad. Los mecanismos de defensa van desde la inmunidad innata a la inmunidad adquirida (Romani L, 2004).

*C. albicans* es el patógeno fúngico más común y se encuentra con frecuencia en la superficie de las mucosas del cuerpo humano (Richardson JP *et al*, 2015). La pared celular de *Candida* se compone principalmente de fracciones de diferentes carbohidratos como  $\beta$ -glucano, manano y quitina. El reconocimiento de los componentes de la pared (PAMPs) por las DCs está mediado a través de los PRRs de la superficie de las DCs. Entre estos PRRs se incluyen los TLRs (TLR2 y TLR4), el receptor de manosa (MR -*mannose receptor*-) y Mincle. Los receptores de lectina tipo C (CLRs -*C-type lectin like receptors*-) son el principal grupo de PRRs involucrados en la respuesta antifúngica, en particular, los receptores de las familias "Dectina-1" y "Dectina-2", que interactúan con los componentes de la pared celular como los  $\beta$ -glucanos y la manosa respectivamente (Wei X *et al*, 2011; Richardson JP *et al*, 2015). Sin embargo, existe una superposición en cuanto al



reconocimiento del sustrato por parte de algunos de estos receptores. La respuesta mediada por estos receptores promueve tanto la inflamación como la inmunidad adquirida en el huésped mediante su unión al hongo, la fagocitosis y la producción de determinadas citocinas y quimiocinas (Rizzetto L *et al*, 2015). La señalización involucra a la vía de la tirosina kinasa del bazo (SYK *-spleen tyrosine kinase-*), el dominio de reclutamiento asociado a la caspasa 9 (CARD9 *-caspase recruitment domain family, member 9-*) y NF-κB en DCs, lo que dirige la polarización de Th1 y Th17, y por tanto la inmunidad adquirida frente a *C. albicans* (Richardson JP *et al*, 2015). Se han relacionado defectos en varios componentes de la vía Th17, con CMC, desde defectos en las moléculas de señalización (CARD9, STAT1, STAT3) hasta citocinas implicadas como IL-17 (Rizzetto L *et al*, 2015).

En los últimos años, se ha visto que los defectos en el sistema IL-23/IL17-IL-22 predisponen a infecciones por *Candida* spp. La CMC se caracteriza por la infección sintomática persistente o recurrente en la piel, uñas y mucosas oral y genital, causada por hongos del género *Candida*, en su mayoría por el comensal *C. albicans*, en pacientes sin otras infecciones o manifestaciones autoinmunes. La CMC es frecuente en los recién nacidos y niños. En pacientes con inmunodeficiencias de células T heredadas o adquiridas, la CMC se asocia con varias enfermedades infecciosas (Puel A *et al*, 2011; Romani L, 2004). En pacientes con VIH la candidiasis orofaríngea grave es común, siendo la infección fúngica oportunista más frecuente previo al comienzo de un tratamiento antirretroviral efectivo. Los pacientes con IDPs que afectan a las células T, como la SCID e inmunodeficiencias combinadas (CIDs *-combined immunodeficiencies-*), son propensos a sufrir CMC, aunque esta no es la única infección, ya que son susceptibles a otras muchas infecciones (Puel A *et al*, 2012). Varias IDPs caracterizadas por defectos inmunológicos establecidos, confieren susceptibilidad selectiva a CMC (Vinh DC, 2011).

Los pacientes con deficiencia AD-HIES, causado en su mayor parte por mutaciones en *STAT3*, presentan en más de la mitad de los casos CMC (43%-56%) (Schimke LF *et al*, 2010; Woellner C *et al*, 2010), debido a una deficiencia en el desarrollo de células Th17. Sin embargo, estos pacientes presentan otras manifestaciones clínicas, incluyendo la susceptibilidad a infecciones estafilocócicas pulmonar y cutánea graves (Mineguishi Y *et al*, 2009).

En la poliendocrinopatía autoinmune de tipo I (APS-I), debido a mutaciones en el gen regulador autoinmune (*AIRE -autoimmune regulator-*), los pacientes presentan CMC como única enfermedad infecciosa (todos los pacientes a la edad de 40 años y el 30% durante los primeros 2 años de vida) (Betterle C *et al*, 1998; Perheentupa J, 2006; Kisand K *et al*,

2010; Puel A *et al*, 2010b). La CMC en estos pacientes es debida a la presencia de altos niveles de autoanticuerpos neutralizantes frente a IL-17A, IL-17F, y/o IL-22, que también se detectan en algunos pacientes con timoma y CMC (Kisand K *et al*, 2010; Burbelo PD *et al*, 2010).

En pacientes que presentan CMC aislada (CMCD) se han detectado deficiencia AD de IL-17F, deficiencia AR de IL-17RA (Puel A *et al*, 2011), deficiencia AR de IL-17RC (Ling Y *et al*, 2015) o deficiencia del activador 1 NF- $\kappa$ B (ACT1 -NF- $\kappa$ B activator 1-) (Boisson B *et al*, 2013). Estos pacientes muestran una susceptibilidad selectiva a CMC, mostrando la importancia de la señalización por IL-17 en la inmunidad frente a especies de *Candida*. Algunos de estos pacientes son también susceptibles a enfermedad estafilocócica cutánea.

La deficiencia AD con ganancia de función (GOF, *gain of function*) de STAT1 se describió en 2011 en pacientes con CMC (Liu L *et al*, 2011). Los pacientes presentan una respuesta más potente a IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  e IL-27. Este defecto se asocia con autoinmunidad y puede ser causado por el aumento en la inmunidad mediada por IFN- $\alpha/\beta$ . Sin embargo, aunque algunos pacientes muestran únicamente CMC, el rango de manifestaciones clínicas es amplio e incluye infecciones recurrentes por virus (VHS, VZV, VRS), infecciones profundas por micobacterias, infecciones por hongos dimórficos (histoplasmosis, coccidioidomycosis) e infecciones por patógenos oportunistas como *Pneumocystis jirovecii* (Puel A *et al*, 2011; Sampaio E *et al*, 2013; Boisson-Dupuis S *et al*, 2012; van de Veerdonk F *et al*, 2011; Uzel G *et al*, 2013; Martinez-Martinez L *et al*, 2015).

Recientemente se ha descrito que mutaciones bialélicas con pérdida de función en el gen *RORC* (*ROR* $\gamma$  y *ROR* $\gamma$ T) causan micobacteriosis y candidiasis en los pacientes afectos. La ausencia de células productoras de IL-17A/F en estos individuos es probablemente la causa de la candidiasis crónica, pero tanto la inmunidad mucocutánea a *Candida* spp. como la inmunidad sistémica a *Mycobacterium* spp. en humanos, requieren de *ROR* $\gamma$ , *ROR* $\gamma$ T o ambos (Okada S *et al*, 2015).

Los pacientes con defectos en el gen *CARD9*, que controla la producción de IL-17 en respuesta a dectina-1 y dectina-2 tras estimulación con *Candida* spp., sufrieron de candidiasis diseminada. La deficiencia AR *CARD9* es junto con la deficiencia CGD las únicas IDPs que confieren una predisposición a candidiasis sistémica (Puel A *et al*, 2011). Algunos pacientes con mutaciones en *CARD9* desarrollaron dermatofitosis invasiva sin presentar candidiasis (Lanternier F *et al*, 2013).

Las mutaciones descritas impiden la expresión de IL-17RC en la superficie celular, y la respuesta celular a los homo- y heterodímeros IL-17A e IL-17F se encuentra suprimida. Esto indica que el IL-17RC es esencial para la inmunidad mucocutánea a *C. albicans* en humanos, aunque en gran medida puede ser redundante (Ling Y *et al*, 2015).

La candidiasis orofaríngea, las infecciones en la piel y/o la onicomicosis debido a *C. albicans* son las formas más comunes de MC en los pacientes con AD-HIES, APS-I o CMCD debido a mutaciones de *IL17F*, *IL17RA* o *ACT1* y mutaciones con ganancia de función de *STAT1*. El progreso sobre el conocimiento de inmunodeficiencias asociadas a CMC, pone de manifiesto el papel del sistema IL-23/IL-17-IL-22 en el desarrollo de estas infecciones.



# Hipótesis



## HIPÓTESIS

- Los defectos en los sistemas IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  confieren susceptibilidad a sufrir enfermedad causada por micobacterias y, en menor grado, por salmonela.
- Debido al defecto de respuesta a IL-23, los pacientes con deficiencia de IL-12RB1 son más susceptibles a la infección por *Candida* spp.
- La incidencia de las inmunodeficiencias primarias englobadas dentro de las MSMD puede ser elevada en pacientes con infecciones causadas por micobacterias, en particular en aquellos con infecciones diseminadas por micobacterias ambientales no tuberculosas.





# **Objetivos generales**



## OBJETIVOS GENERALES

Es necesario ampliar nuestro conocimiento acerca del papel que ejercen los sistemas IL-12/IFN- $\gamma$  e IL-23/IL-17-IL-22 en la defensa frente a infecciones causadas principalmente por micobacterias, salmonela y *Candida* spp. El estudio de pacientes con deficiencia en estos sistemas, puede aportar importantes datos acerca del papel de la inmunidad mediada por IFN- $\gamma$  e IL-17 en la defensa frente a estas infecciones. Además, estos estudios podrían ayudar al diagnóstico y manejo terapéutico de pacientes con inmunodeficiencias primarias, asociadas a la predisposición a infecciones por micobacterias, salmonela y/o *Candida* spp.

Para ello, los objetivos generales son:

1. Estudiar la base molecular del defecto en pacientes con sospecha de susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacterias.
2. Mejorar las técnicas para el diagnóstico de estas inmunodeficiencias primarias.
3. Analizar el fenotipo clínico/infeccioso y el pronóstico de los pacientes.
4. Evaluar la posible implicación de los defectos de IL-12R $\beta$ 1 en la susceptibilidad a enfermedad causada por *Candida* spp.



# **Objetivos concretos**



## CAPÍTULO I

### Objetivos

Los defectos genéticos en el eje IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  confieren una susceptibilidad mendeliana a micobacterias y salmonela. En aproximadamente la mitad de pacientes con MSMD con un defecto genético bien definido, la respuesta celular a IFN- $\gamma$  es normal, pero la producción de IFN- $\gamma$  dependiente de IL-12 e IL-23 está dañada. El circuito IL-12/IFN- $\gamma$  es esencial para la inmunidad antitumoral en ratones, pero la susceptibilidad a cáncer no ha sido reconocida en pacientes con este tipo de defectos.

Por ello se pretende diagnosticar y describir las características inmunológicas de tres pacientes procedentes de una misma familia de las Islas Canarias que presentaron, entre otras manifestaciones, infecciones recurrentes por salmonela, infecciones diseminadas por micobacterias no tuberculosas o candidiasis. Uno de los pacientes presentó además un carcinoma esofágico de células escamosas (SCEC -*squamous-cell carcinoma of the esophagus*-).

La presentación clínica hace sospechar que los pacientes sufren de susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacterias. Los objetivos son:

1. Realizar estudios inmunológicos clásicos de linfocitos T y B.
2. Analizar en células de los pacientes la respuesta a IFN- $\gamma$ .
3. Analizar la producción de IFN- $\gamma$  y otras citocinas (IL-2, IL-17) en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los pacientes, en respuesta a estimulación con diferentes activadores policlonales de linfocitos T, solos o en combinación con IL-12.
4. Analizar en las células de los pacientes, la expresión de la cadena IL-12R $\beta$ 1 mediante el establecimiento de líneas de linfocitos T activados con fitohemaglutinina (PHA) e IL-2.

5. Determinar la base genética del defecto en estos pacientes mediante secuenciación de ADN genómico.
6. Estudiar la presentación clínica de estos pacientes mediante revisión del historial clínico y correlacionar los datos clínicos, inmunológicos y genéticos de la familia.
7. Se hará una revisión bibliográfica de desarrollo de cáncer en pacientes con susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacterias.



# Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R $\beta$ 1 deficiency

María Cárdenes,<sup>1,2</sup> Alfonso Angel-Moreno,<sup>3,4</sup> Claire Fieschi,<sup>5,6</sup> Ithaisa Sologuren,<sup>1</sup> Elena Colino,<sup>7</sup> Antonio Molinés,<sup>8</sup> M Isabel García-Laorden,<sup>1</sup> M Isolina Campos-Herrero,<sup>9</sup> Miguel Andújar-Sánchez,<sup>10</sup> Jean-Laurent Casanova,<sup>5,11,12</sup> Carlos Rodríguez-Gallego<sup>1,2</sup>

For numbered affiliations see end of article.

## Correspondence to

Carlos Rodríguez-Gallego, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; jrdgal@gobiernodecanarias.org

Received 5 August 2009  
Revised 11 December 2009  
Accepted 21 December 2009

## ABSTRACT

Genetic defects in the IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  circuit confer Mendelian susceptibility to mycobacteria and salmonella. The IL-12/IFN- $\gamma$  axis is essential for anti-tumoral immunity in mice. Cancer susceptibility has not been recognised in these patients so far. We report three relatives with IL-12R $\beta$ 1 deficiency. At the age of 25 years old, one patient presented with oesophageal squamous cell carcinoma (OSCC). The patient had no previous risk factors for OSCC. He died at the age of 29 years. OSCC is exceedingly rare in individuals under 30 years and frequently relates to alcohol intake and smoking. Disorders of the IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  axis may predispose to cancer.

Genetic defects in the IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  axis confer Mendelian susceptibility to mycobacterial disease and salmonellosis. The *IL12B* gene encodes the p40 subunit of IL-12 and IL-23, and *IL12RB1* encodes the first chain of the IL-12 (IL-12R $\beta$ 1) and IL-23 receptors. IL-12 up-regulates IFN- $\gamma$  production by T, NK and NKT cells. IFN- $\gamma$  acts on macrophages inducing the elimination of pathogens, also displaying other actions. Conversely, IL-23 is important for the development of IL-17-producing T cells.<sup>1</sup> The IL-12/IFN- $\gamma$  axis' role in tumour immunity has been demonstrated in mice.<sup>2</sup> However, cancer susceptibility has not yet been recognised in patients with deficiencies in the IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  circuit.

## PATIENT 1

A boy born from second-degree related parents presented from the age of 6 years with recurrent salmonellosis (table 1). Chronic diarrhoea persisted for years because of irregular amoxicillin prophylaxis, along with chronic anaemia and failure to thrive. At the age of 16, prophylaxis was switched to ciprofloxacin, with a better control of salmonellosis. When he was 25 years old, he presented with dysphagia lasting for 6 months. Oro-oesophageal candidiasis and a fixed stenosis encompassing the middle third of the oesophagus were observed endoscopically. Histologically, oro-oesophageal candidiasis over a well-differentiated squamous cell carcinoma (SCC) of the oesophagus staged T3N0M0 was diagnosed in a biopsy obtained at the level of stenosis (figure 1). He denied having toxic habits, and there was no previous reflux or dysphagia. Preoperative radiotherapy and subtotal

oesophagectomy with transmediastinal gastroplastia were performed. The resected whole piece showed moderate dysplasia and a small tumorous area infiltrating the oesophagus wall, but none of the four examined lymph nodes. Two years later, oesophageal squamous cell carcinoma (OSCC) relapsed in mediastinum and pleura, and chemotherapy was administered (Taxotere, cis-platin and 5FU, six cycles). After a partial response, IL-12R $\beta$ 1 deficiency was diagnosed, and 3 months later an MRI showed a right-superior mediastinal mass infiltrating the brachial plexus and spinal chord. Radiotherapy was again started without clinical benefit and the patient was then admitted for palliative care. He finally died at the age of 29 years.

A fourth-degree relative girl (patient 2) and a brother (patient 3) from patient 1 suffered from *Mycobacterium avium* disease and/or extra-intestinal *Salmonella enteritidis* disease. Patient 2 also developed severe autoimmune haemolytic anaemia and thrombocytopenia, and patient 3 suffered from oropharyngeal candidiasis since birth (table 1).

Peripheral blood mononuclear cells from patients 1 and 2 did not produce IFN- $\gamma$  in response to stimulation with PHA alone or in combination with IL-12. PHA/IL-2-activated T cell blasts from the patients did not express the IL-12R $\beta$ 1 chain. Mutation analyses revealed that they were homozygous for a mutation affecting a consensus splice site (1791 +2 T  $\rightarrow$  G) in the intron 15 of the *IL12RB1* gene. The genotype of patient 1 was previously reported.<sup>3</sup> The clinical phenotype of patient 3 also suggests homozygous *IL12RB1* deficiency.

This is the first report of cancer in a patient with IL-12R $\beta$ 1 deficiency. At the age of 25 years, a well-differentiated OSCC was diagnosed in patient 1, in the absence of overt predisposing factors. OSCC is relatively uncommon in the developed world, where its mean age at diagnosis is 67 years, and it is frequently related to alcohol intake and smoking.<sup>4</sup> The occurrence of oesophageal cancer in individuals younger than 30 years is exceedingly rare: the risk of a white male of being diagnosed with oesophageal carcinoma of any type at ages younger than 30 years is estimated to be below 0.005%. However, this rate increases steadily to 0.74% for a 60-year-old white male in the next 30 years.<sup>5</sup>

The association between chronic mucocutaneous candidiasis (CMC) with the development of oral and oesophageal carcinomas has been suggested.<sup>6</sup> Although candidiasis cannot be formally excluded as an OSCC-predisposing factor in our patient, he

## Letter to JMG

**Table 1** Infectious episodes, autoimmune disorders and cancer observed in the three IL-12R $\beta$ 1-deficient patients

| Patient 1 |   | Patient 2        |   | Patient 3 |   |
|-----------|---|------------------|---|-----------|---|
| Age       | Episode   | Age              | Episode   | Age       | Episode   |
| 4–6 y     | Uneventful measles, varicella and mumps   | 11 m             | Acute gastroenteritis and bacteraemia. <i>Salmonella enteritidis</i>        | 3 days    | OPC*  |
| 6 y 5 m   | Diarrhoea and laterocervical abscess. <i>S. enteritidis</i>   | 31 m             | Laterocervical abscess and bacteraemia. <i>S. enteritidis</i>               | 15 m      | Enterocolitis and aphthous stomatitis†  |
| 6 y 7 m   | Cervical lymphadenitis and sternal osteomyelitis. <i>S. enteritidis</i>                                     | 34 m             | Right thigh adenophlegmon. <i>S. enteritidis</i>                            | 38 m      | Chronic diarrhoea‡. OPC*. Purpuric vasculitis   |
| 6 y 9 m   | Prolonged diarrhoea. <i>S. enteritidis</i>  | 40 m             | Disseminated <i>Mycobacterium avium</i> and <i>S. enteritidis</i> infection | 40 m      | Laterocervical and inguinal lymphadenopathies†. OPC*                                      |
| 7 y       | Right femoral osteomyelitis. <i>S. enteritidis</i>  | 5 y 3 m–5 y 10 m | Several episodes of AIHA‡ (4x) and/or AITP§, ** (3x). OPC*                  | 5 y 9 m   | Laterocervical, inguinal and axillary lymphadenopathies†. Purpuric vasculitis             |
| 9 y 10 m  | Enterocolitis and prolonged diarrhoea. <i>Salmonella</i> sp.  | 6 y              | Disseminated <i>M avium</i> infection (same strain)                         | 5 y 11 m  | OPC*. Stomatitis. Thoracic, laterocervical and inguinal granulomas. <i>S. enteritidis</i> |
| 13 y      | Enterocolitis and left femoral osteomyelitis. <i>S. enteritidis</i>   | 7 y 3 m          | AIHA‡. <i>M avium</i> persists in cultures from stool                       |           | Uneventful varicella. Diagnoses of Henoch–Schölein purpura¶                               |
| 14 y–19 y | Chronic diarrhoea by <i>S enteritidis</i> (2) and enterocolitis by <i>Salmonella. portland</i> . Pneumonia† | 7 y 5 m          | Death††   | 6 y 8 m   | OPC*. Bloody vomiting and diarrhoea. <i>S. enteritidis</i>                                |
| 25 y      | OSCC‡‡. OPC*, OC§§, mild diarrhoea  |                  |   | 6 y 11 m  | Bloody vomiting and diarrhoea. Death  |
| 29 y      | OSCC‡‡ relapsed. Death  |                  |   |           |   |

\*OPC, Oropharyngeal candidiasis.

†Unidentified micro-organism.

‡AIHA, autoimmune haemolytic anaemia.

§AITP, autoimmune thrombocytopenia.

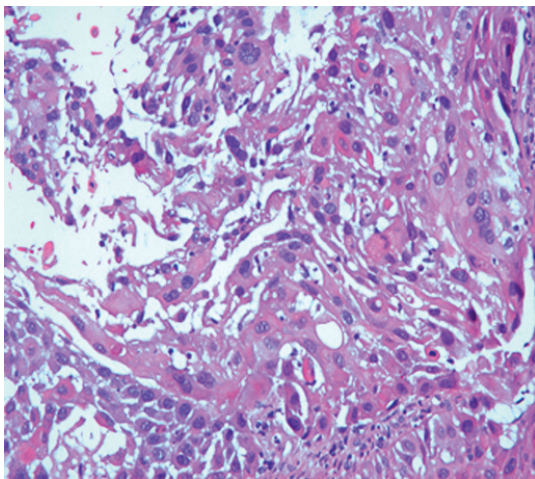
¶Data from histology not available; other causes of vasculitis cannot be excluded.

\*\*She was sequentially treated with IV gammaglobulin, high-dose corticosteroids and Cyclosporine A, but AITP and AIHA were recurrent in spite of antibiotic and IFN- $\gamma$  withdrawal, responding only to Rituximab<sup>®</sup>.††She finally died at the age of 7 years of immunosuppressor therapy-related relapsing disease by the same strain of *M avium* after long-term remission.

‡‡OSCC, Squamous-cell oesophageal carcinoma.

§§SOC, Oesophageal candidiasis.

was simultaneously diagnosed with both candidiasis and OSCC when seen for dysphagia lasting for 6 months, and he did not report previous candidiasis. In addition, our patient was diagnosed with OSCC at a younger age than the reported patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, in whom OSCC typically follows CMC. Candidiasis in our patient could thus be a cause or a consequence of OSCC, or may be unrelated to it.<sup>7</sup>



**Figure 1** Section showing a squamous cell carcinoma in an oesophageal biopsy from patient 1 (haematoxylin and eosin staining,  $\times 200$ ).

A relationship between IL-12R $\beta$ 1 deficiency with OSCC in our patient is plausible. Cancer incidence increases with age, and most of the known IL-12/23 axis-deficient patients are children and young adults.<sup>1,3</sup> Our patient is reminiscent of two IFN- $\gamma$ R1-deficient patients with HHV-8 associated KS and Hodgkin's disease (HD, frequently associated to EBV infection), diagnosed at ages 11 and 19 years, respectively,<sup>8,9</sup> and the young IFN- $\gamma$ R2-deficient patient with cutaneous SCC in the accompanying paper from Toyoda *et al.* Highly divergent detection rates of HPV in oesophageal carcinomas from high risk (high rates) and low risk (low rates) areas were reported. Although Spain is not a high-risk area for OSCC, taken together, these results raise the possibility that deficiencies in the IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  circuit may particularly predispose to viral-induced tumours such as KS, HD, OSCC, and SCC. However, no HPV DNA was amplified from our patient's biopsy with the Linear Array HPV (Roche<sup>®</sup>).

Experimental tumour models have shown that IL-12 has a dramatic anti-tumour effect, and IFN- $\gamma$  is critical for the progression of the anti-tumour response. Tumour cells, particularly oesophageal carcinomas, are a target of IFN- $\gamma$  in the tumour-elimination process.<sup>2</sup> In fact, the development of IFN- $\gamma$  insensitivity is one of the mechanisms that allow tumours to escape from elimination by the immune response.<sup>2</sup> IL-12 was also shown to cause a remarkable reduction in ultraviolet-induced DNA lesions, and IL-12 deficient mice are more sensitive to ultraviolet-induced skin tumours than their wild-type counterparts.<sup>10</sup> Therefore, deficiencies of the IL-12–IL-23/IFN- $\gamma$  axis may also predispose to non-viral-induced cancers, as has been demonstrated in mice.<sup>2,10</sup> As indicated by the previous papers and the accompanying paper, the pathogenesis of tumours mostly involved impaired IFN- $\gamma$  immunity.

Recently, several clinical trials were reported that aimed to assess the efficacy and safety of anti-IL-12/IL-23 monoclonal antibodies in several inflammatory disorders, such as psoriasis,

multiple sclerosis and Crohn's disease. Our data suggest that therapies aimed to prolong IL-12/IL-23 blockade might have long-term complications: not only severe mycobacterial and salmonella infections, but also potentially tumour development or progression, viral-induced tumours in particular. This effect could be enhanced in patients receiving immunosuppressive agents and in psoriasis patients under ultraviolet B or photodynamic therapy. These potential side-effects should be considered when assessing the risk/benefit ratio while making therapeutic decisions for selected patients.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Department of Immunology, Gran Canaria Dr. Negrín University Hospital, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>2</sup>Canarian Institute for Cancer Research (ISCiii-RTICCC-C03/10), La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Puerta de Hierro Hospital, Madrid, Spain (current address)

<sup>5</sup>Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, University of Paris Descartes INSERM U980, Necker Medical School, Paris, France

<sup>6</sup>Department of Immunopathology and EA3963, Paris University 7 and APHP, Saint Louis Hospital, Paris, France (current address)

<sup>7</sup>Department of Paediatrics, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>8</sup>Department of Haematology, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>9</sup>Department of Microbiology, Gran Canaria Dr. Negrín University Hospital, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>10</sup>Department of Pathology, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>11</sup>Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, New York, USA

<sup>12</sup>Paediatric Immunology-Haematology Unit, Necker Hospital, Paris, France

**Acknowledgements** We are grateful to the patients and their families for their trust. We are also grateful to Esther Santiago Quintana and Ana Domínguez Acosta for their helpful technical support.

**Funding** This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad [grant number RedRespira-ISCiii-RTIC-03/11], Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS, Gobierno de Canarias) [grant number INREDCAN 5/06], and by Premio de Investigación Fundación Caja Rural de Canarias-Chil y Naranjo 2004 to [CR-G]. María Cárdenas was supported by a grant from the Canarian Institute for Cancer Research (ISCiii-RTICCC-C03/10). MIG-L was supported by the RedRespira-ISCiii-RTIC-03/11. JLC is an International Scholar of the Howard Hughes

Medical Institute. The sponsors of the study had no role in designing the study, collecting, analysing and interpreting the data or writing the paper.

**Competing interests** None.

**Patient consent** Informed consent was obtained from the patients, or their parents, and their relatives. The protocol was approved by the local ethics committee of the Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil (Las Palmas de Gran Canaria).

**Ethics approval** This study was conducted with the approval of the Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, Las Palmas de Gran Canaria.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

#### REFERENCES

- Filipe-Santos O**, Bustamante J, Chappier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, Jouangy E, Boisson-Dupuis S, Fieschi C, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of IL-12/23- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity: molecular, cellular and clinical features. *Semin Immunol* 2006;**18**:347–61.
- Dunn GP**, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting. *Nat Rev Immunol* 2006;**6**:836–48.
- Fieschi C**, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breiman A, Altare F, Baretto R, Le Deist F, Kayal S, Koch H, Richter D, Brezina M, Aksu G, Wood P, Al-Jumaah S, Raspall M, Da Silva Duarte AJ, Tuerlinckx D, Virelizier JL, Fischer A, Enright A, Bernhöft J, Cleary AM, Vermynen C, Rodriguez-Gallego C, Davies G, Blütters-Sawatzki R, Siegnist CA, Ehlayel MS, Novelli V, Haas WH, Levy J, Freiherst J, Al-Hajjar S, Nadal D, De Moraes Vasconcelos D, Jeppsson O, Kutukculer N, Frececrova K, Caragol I, Lammas D, Kumararatne DS, Abel L, Casanova JL. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of Interleukin 12 receptor  $\beta$ 1 deficiency. Medical and immunological implications. *J Exp Med* 2003;**197**:527–35.
- Enzinger PC**, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003;**349**:2241–52.
- Ries LAG**, Melbert D, Krapcho M. *SEER cancer statistics review, 1975–2005*. Bethesda, MD: National Cancer Institute. [www.seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/results\\_merged/sect\\_08\\_oesophagus.pdf](http://www.seer.cancer.gov/csr/1975_2005/results_merged/sect_08_oesophagus.pdf) [accessed 3 Jan 2009].
- Rautemaa R**, Hietanen J, Niisalo S, Pirinen S, Perheentupa J. Oral and oesophageal squamous cell carcinoma—a complication or component of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED, APS-I). *Oral Oncol* 2007;**43**:607–13.
- Bonavina L**, Incarbonè R, Reitano M, Tortorano A, Viviani M, Peracchia A. Candida colonization in patients with esophageal disease. *Dis Esophagus* 2003;**16**:70–2.
- Camcioglu Y**, Picard C, Lacoste V, Dupuis S, Akçakaya N, Cokura H, Kaner G, Demirkesen C, Plancoulaine S, Emile JF, Gessain A, Casanova JL. HHV-8 associated Kaposi sarcoma in a child with IFN $\gamma$ R1 deficiency. *J Pediatr* 2004;**144**:519–23.
- Han J-Y**, Rosenzweig SD, Church JA, Holland SM, Ross LA. Variable presentation of disseminated nontuberculous mycobacterial infections in a family with an interferon- $\gamma$  receptor mutation. *Clin Infect Dis* 2004;**39**:868–70.
- Meeran SM**, Mantena SK, Meleth S, Elmetts CA, Katiyar SK. Interleukin-12 deficient mice are at greater risk of UV radiation-induced skin tumors and malignant transformation of papillomas to carcinomas. *Mol Cancer Ther* 2006;**5**:825–32.



## Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R $\beta$ 1 deficiency

María Cárdenes, Alfonso Angel-Moreno, Claire Fieschi, et al.

*J Med Genet* 2010 47: 635-637  
doi: [10.1136/jmg.2009.071910](https://doi.org/10.1136/jmg.2009.071910)

---

Updated information and services can be found at:  
<http://jmg.bmj.com/content/47/9/635.full.html>

---

### References

*These include:*

This article cites 9 articles, 3 of which can be accessed free at:  
<http://jmg.bmj.com/content/47/9/635.full.html#ref-list-1>

Article cited in:  
<http://jmg.bmj.com/content/47/9/635.full.html#related-urls>

### Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

---

### Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections  
Oesophageal cancer (4 articles)

---

### Notes

---

To request permissions go to:  
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:  
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:  
<http://group.bmj.com/subscribe/>

## Conclusiones

1. Entre los estudios inmunológicos realizados, destaca que las PBMCs de los dos pacientes estudiados, no producían IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación de linfocitos T con diferentes mitógenos solos o en combinación con IL-12.
2. Las líneas T linfoblastoideas activadas con PHA/IL-2 de ambos pacientes mostraron un profundo defecto de producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a concentraciones crecientes de IL-12.
3. Los pacientes 1 y 2 no produjeron IL-17 en respuesta a la estimulación con CD2+CD28.
4. Las células T activadas con PHA/IL-2 de los pacientes 1 y 2 no expresaron la cadena IL-12R $\beta$ 1.
5. Los análisis genéticos revelaron que los pacientes 1 y 2 eran homocigotos para una mutación que implica un cambio de timidina por guanina en el nucleótido 1791 del gen, del segundo nucleótido (1791 +2 T>G) en el intrón 15, justo tras la región que codifica el dominio transmembrana del gen *IL12RB1*. El fenotipo clínico de un tercer paciente de esta familia sugiere también una deficiencia en homocigosis de IL-12R $\beta$ 1.
6. Uno de los pacientes presentó a los 25 años candidiasis oral y esofágica sobre un carcinoma de células escamosas (SCC *-squamous cell carcinoma-*) bien diferenciado en ausencia de factores de predisposición, aparte de su inmunodeficiencia, a este tipo de cáncer. Los pacientes con deficiencias del sistema IL-12/IFN- $\gamma$  pudieran presentar una mayor susceptibilidad a cáncer.



## CAPÍTULO II

### Objetivos

Los células de los pacientes con defectos genéticos en el receptor 1 del IFN- $\gamma$  se caracterizan por presentar un daño en la señalización mediada por IFN- $\gamma$ . Dependiendo de la gravedad con la que esta señalización esté afectada, dará lugar a las diferentes formas de enfermedad, que pueden asociarse a presentaciones clínicas y pronósticos diferentes.

La deficiencia autosómica recesiva completa de IFN- $\gamma$ R1 (RC-IFN- $\gamma$ R1) es el resultado de mutaciones que suprimen la respuesta a IFN- $\gamma$ . Las células de estos pacientes producen moléculas de IFN- $\gamma$ R1 que son incapaces de unir IFN- $\gamma$ , resultando en una pérdida completa de respuesta a IFN- $\gamma$ . La deficiencia de tipo autosómica dominante parcial de IFN- $\gamma$ R1 (DP-IFN- $\gamma$ R1), resulta de mutaciones en heterocigosis en el segmento citoplasmático de *IFNGR1*, que da lugar a un incremento de moléculas truncadas que se acumulan en la superficie celular. Estas moléculas se unen a IFN- $\gamma$  pero no transducen las señales, ejerciendo un efecto dominante negativo. En el momento de realizar los estudios a nuestros pacientes sólo se había descrito la deficiencia autosómica recesiva parcial (RP) de IFN- $\gamma$ R1 en dos pacientes de una familia homocigotos para la mutación p.I87T, los cuales parecían presentar un fenotipo clínico menos grave que el de las formas RC-IFN- $\gamma$ R1.

Se pretende diagnosticar y describir las características inmunológicas de una serie de 14 pacientes, 5 de ellos de la isla de Gran Canaria, procedentes de 11 familias no relacionadas y diferentes países, que sufrieron de enfermedad causada por BCG, enfermedad causada por micobacterias ambientales no tuberculosas, tuberculosis, salmonelosis y/o toxoplasmosis. Los datos iniciales de expresión de IFN- $\gamma$ R1 en estos pacientes sugerían que se pudiera tratar de un defecto de expresión de IFN- $\gamma$ R1. Los objetivos son:

1. Analizar la producción de IFN- $\gamma$ , así como la respuesta a IL-12 y a IFN- $\gamma$  en células procedentes de los pacientes.
2. Analizar el fenotipo funcional en las células de estos pacientes mediante técnicas que combinan cultivos celulares y estudios funcionales mediante citometría de flujo (FCM -*flow cytometry*):
  - Analizar la expresión del IFN- $\gamma$ R1 con diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) en monocitos de sangre periférica y los linfocitos B transformados con el

virus de Epstein-Barr (EBV-B) de pacientes con sospecha de deficiencia de IFN- $\gamma$ R1.

- Evaluar la funcionalidad de las mutaciones encontradas, mediante el desarrollo de diversas técnicas:
  - Un nuevo ensayo fluorescente de unión a IFN- $\gamma$  en monocitos de sangre periférica de los pacientes con sospecha de deficiencia de IFN- $\gamma$ R1.
  - Analizar los eventos celulares tempranos en respuesta a IFN- $\gamma$ , como la fosforilación de STAT-1, en los monocitos de los pacientes.
  - Analizar los eventos celulares tardíos en respuesta a IFN- $\gamma$ , como la producción de citocinas y quimiocinas en cultivos *in vitro* y la inducción de CD64, en monocitos de los pacientes.
- 3. Determinar la base genética de la deficiencia en estos pacientes mediante secuenciación del ADN genómico.
- 4. Analizar la translocación de STAT-1 al núcleo y su unión al ADN en células EBV-B de los pacientes mediante ensayo ELISA y compararla con las de células de pacientes con defecto recesivo completo o dominante parcial de IFN- $\gamma$ R1.
- 5. Analizar un posible efecto fundador responsable de esta inmunodeficiencia en los pacientes canarios.
- 6. Estudiar la presentación clínica de estos pacientes mediante revisión del historial clínico.
- 7. Estudiar la incidencia de inmunodeficiencias primarias englobadas dentro de las MSMD en pacientes pediátricos con infección diseminada por micobacterias no tuberculosas sin factores de riesgo conocidos de la isla de Gran Canaria (838.397 habitantes en 2009) entre los años 1997-2009.



# Partial recessive IFN- $\gamma$ R1 deficiency: genetic, immunological and clinical features of 14 patients from 11 kindreds

Ithaisa Sologuren<sup>1,†</sup>, Stéphanie Boisson-Dupuis<sup>4,5,†</sup>, Jose Pestano<sup>6,‡</sup>, Quentin Benoit Vincent<sup>4,‡</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>7,‡</sup>, Ariane Chappier<sup>4</sup>, María Cárdenes<sup>1,9</sup>, Jacqueline Feinberg<sup>4</sup>, M. Isabel García-Laorden<sup>1</sup>, Capucine Picard<sup>4,10</sup>, Esther Santiago<sup>1</sup>, Xiaofei Kong<sup>5</sup>, Lucile Jannière<sup>4</sup>, Elena Colino<sup>12</sup>, Estefanía Herrera-Ramos<sup>1</sup>, Adela Francés<sup>13</sup>, Carmen Navarrete<sup>16</sup>, Stéphane Blanche<sup>11</sup>, Emilia Faria<sup>17</sup>, Paweł Remiszewski<sup>19</sup>, Ana Cordeiro<sup>18</sup>, Alexandra Freeman<sup>20</sup>, Steven Holland<sup>20</sup>, Katia Abarca<sup>21</sup>, Mónica Valerón-Lemaur<sup>14</sup>, José Gonçalo-Marques<sup>22</sup>, Luisa Silveira<sup>23</sup>, José Manuel García-Castellano<sup>2,15</sup>, José Caminero<sup>3</sup>, José Luis Pérez-Arellano<sup>8,13</sup>, Jacinta Bustamante<sup>4</sup>, Laurent Abel<sup>4</sup>, Jean-Laurent Casanova<sup>4,5,11,¶</sup> and Carlos Rodríguez-Gallego<sup>1,8,9,\*,¶</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Oncology, Research Unit and <sup>3</sup>Department of Respiratory Diseases, Gran Canaria Dr Negrín University Hospital, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, <sup>4</sup>Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Faculty, INSERM U980, Necker Medical School, University Paris Descartes, Paris, France, <sup>5</sup>St Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, NY, USA, <sup>6</sup>Department of Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, Genetics and Immunology, <sup>7</sup>Department of Clinical Sciences-Pharmacology Unit, Molecular and Translational Endocrinology Group and <sup>8</sup>Department of Medical and Surgical Sciences, School of Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, <sup>9</sup>Canarian Institute for Cancer Research, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain, <sup>10</sup>Study Center of Primary Immunodeficiencies and <sup>11</sup>Pediatric Immunology and Hematology Unit, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Necker Hospital, Paris, France, <sup>12</sup>Department of Pediatrics, Unit of Infectious Diseases, <sup>13</sup>Department of Infectious Diseases, <sup>14</sup>Pediatric Intensive Care Unit and <sup>15</sup>Department of Orthopedic Surgery, Insular-Materno Infantil Hospital, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, <sup>16</sup>Department of Immunology, Hospital de Niños Roberto del Río, Santiago de Chile, Chile, <sup>17</sup>Primary Immunodeficiency Consultation and <sup>18</sup>Department of Medicine, Coimbra Pediatric Hospital, Coimbra, Portugal, <sup>19</sup>Department of Lung Diseases, National Tuberculosis and Chest Diseases Research Institute, Warsaw, Poland, <sup>20</sup>Laboratory of Clinical Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA, <sup>21</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, Chile, <sup>22</sup>Department of Pediatric Infectious Diseases, Santa Maria-Centro Hospitalar Lisboa Norte Hospital, Lisbon, Portugal and <sup>23</sup>Department of Pediatrics, Santo Espírito de Angra do Heroísmo EPE Hospital, Angra do Heroísmo, Portugal

Received November 9, 2010; Revised and Accepted January 19, 2011

**We report a series of 14 patients from 11 kindreds with recessive partial (RP)-interferon (IFN)- $\gamma$ R1 deficiency. The I87T mutation was found in nine homozygous patients from Chile, Portugal and Poland, and the V63G mutation**

\*To whom correspondence should be addressed at: Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain. Tel: +34 928449511; Fax: +34 928449293; Email: jrodgal@gobiernodecanarias.org

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

‡The authors wish it to be known that, in their opinion, these authors should be regarded as joint Second Authors.

¶These two authors should be regarded as Senior Authors.

was found in five homozygous patients from the Canary Islands. Founder effects accounted for the recurrence of both mutations. The most recent common ancestors of the patients with the I87T and V63G mutations probably lived 1600 (875–2950) and 500 (200–1275) years ago, respectively. The two alleles confer phenotypes that are similar but differ in terms of IFN- $\gamma$ R1 levels and residual response to IFN- $\gamma$ . The patients suffered from bacillus Calmette-Guérin-osis ( $n = 6$ ), environmental mycobacteriosis ( $n = 6$ ) or tuberculosis ( $n = 1$ ). One patient did not suffer from mycobacterial infections but had disseminated salmonellosis, which was also present in two other patients. Age at onset of the first environmental mycobacterial disease differed widely between patients, with a mean value of  $11.25 \pm 9.13$  years. Thirteen patients survived until the age of  $14.82 \pm 11.2$  years, and one patient died at the age of 7 years, 9 days after the diagnosis of long-term *Mycobacterium avium* infection and the initiation of antimycobacterial treatment. Up to 10 patients are currently free of infection with no prophylaxis. The clinical heterogeneity of the 14 patients was not clearly related to either *IFNGR1* genotype or the resulting cellular phenotype. RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency is, thus, more common than initially thought and should be considered in both children and adults with mild or severe mycobacterial diseases.

## INTRODUCTION

Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD) is a rare primary immunodeficiency (1,2). Patients with MSMD present an apparently selective and inherited predisposition to mycobacterial diseases, suffering from severe clinical disease caused by weakly virulent mycobacterial species, such as bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines and nontuberculous, environmental mycobacteria (EM) (2–4). The patients are also susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* (4,5). Other infections are rare, with the exception of extraintestinal salmonellosis, which has been documented in less than half the patients (2–4,6). In the last 13 years, MSMD-causing germline mutations in five autosomal (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12B*, *IL12RB1*) and one X-linked gene (*NEMO*) have been reported (2–4). Most of the affected gene products are immunologically related, as they are involved in IL-12-dependent and interferon (IFN)- $\gamma$ -mediated immunity. Disorders of *IL12B*, *IL12RB1* and *NEMO* result in impairment of the secretion of IL-12-dependent IFN- $\gamma$  and IL-23-dependent IL-17 (2–4,7). Disorders of *IFNGR1*, *IFNGR2* and *STAT1* impair cellular responses to IFN- $\gamma$  (2–4). The high level of allelic heterogeneity accounts for the definition of up to 13 different genetic disorders causing MSMD (2–4). Two related disorders, complete and partial recessive forms of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) deficiency, also impair IFN- $\alpha/\beta$  and IFN- $\lambda$  responses, thus conferring a broader susceptibility to mycobacteria and viruses (8–10). Other mutations in *NEMO* are also associated with a broader infectious phenotype (11).

The first genetic etiology of MSMD was described in 1996, with null mutations in *IFNGR1* (12,13). Three other molecular forms of IFN- $\gamma$ R1 deficiency have since been described (2–4). Autosomal recessive complete IFN- $\gamma$ R1 (RC-IFN- $\gamma$ R1) deficiency is the result of mutations abolishing the response to IFN- $\gamma$  (4,14). Most patients present null mutations, due to the presence of stop codons upstream from the exon encoding the transmembrane domain, preventing the production of IFN- $\gamma$ R1 (12,15–18). In-frame deletions and missense mutations in the segment encoding the extracellular domain of IFN- $\gamma$ R1 have been reported in four patients with

RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency. The cells of these patients produced IFN- $\gamma$ R1 molecules that were unable to bind IFN- $\gamma$ , resulting in a complete loss of responsiveness to IFN- $\gamma$  (18). One patient with a mutation in the initiation codon of the *IFNGR1* gene and residual IFN- $\gamma$  signaling due to weak IFN- $\gamma$ R1 expression presented an immunological and clinical form of the disease almost as severe as that of patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (19). The most common form of IFN- $\gamma$ R1 deficiency, the dominant partial (DP) type (54 patients from 35 kindreds), results from heterozygous mutations in the cytoplasmic segment of *IFNGR1*, giving rise to truncated molecules that accumulate at the cell surface (4). These molecules bind IFN- $\gamma$  but cannot transduce signals; they therefore have a dominant-negative effect (4,14). RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency confers a predisposition to severe and often fatal mycobacterial infection, mostly at an early age, whereas autosomal dominant partial IFN- $\gamma$ R1 (DP-IFN- $\gamma$ R1) deficiency is less severe, several patients with this deficiency having reached or having been diagnosed in adulthood (14).

Not all patients with IFN- $\gamma$ R1 deficiency present with these forms. In particular, the I87T mutation was shown 10 years ago to lead to an autosomal recessive form of partial (RP)-IFN- $\gamma$ R1 deficiency in two patients from a Portuguese kindred (20). The cells of these patients expressed the receptor at the cell surface, and displayed weak, but not completely abolished IFN- $\gamma$ -mediated signaling. The mechanism by which the I87T mutation exerts its deleterious effect remained unclear. This disorder was thought to be restricted to this single family, until recently, when a patient from Poland was reported to be homozygous for the same mutation (21). We report here six new patients homozygous for the I87T mutation, from five unrelated families of Portuguese and Chilean descent. We also report four unrelated Spanish kindreds with five patients homozygous for the V63G mutation. We demonstrate that homozygosity for the V63G allele, previously identified as potentially responsible for the RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency in another kindred (22), actually confers a RP form of defect. We show that both the V63G and I87T mutations result from a founder effect and provide age estimates for the most recent common ancestor (MRCA) of each mutation. Finally, we compare the immunological data and clinical features of the 14 patients with

RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency with those from patients with RC and DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiencies.

## RESULTS

### *IFNGR1* genotype and familial segregation

We investigated 14 patients with mycobacterial disease from 11 unrelated families (Table 1; Fig. 1). The sequencing of two different polymerase chain reaction (PCR) products generated from the coding regions of the *IFNGR1* mRNA revealed that patients I.1, I.2, II.1, III.1 and IV.1 were homozygous for a T  $\rightarrow$  G nucleotide substitution at position 188 (exon 2), leading to the conservative replacement of a valine residue by a glycine residue at position 63 (V63G) in the extracellular domain of the IFN- $\gamma$ R1 molecule. Homozygosity for the mutation was confirmed by genome analysis. The parents of the five patients, one brother of patients I.1 and I.2, one brother of patient III.1 and one brother of patient IV.1 were heterozygous for the V63G allele and the wild-type allele and are all healthy. The V63G mutation was not found in 128 unrelated healthy individuals from the population of Gran Canaria. The V63G mutation is, therefore, not an irrelevant polymorphism. It segregates with the clinical phenotype as an autosomal recessive trait.

Direct sequencing of *IFNGR1* exons and flanking intron regions showed that patients V.1, VI.1, VII.1, VIII.1, IX.1 and IX.2 were homozygous for a nucleotide substitution at position 260 (T  $\rightarrow$  C, exon 3), leading to the non-conservative replacement of an isoleucine residue by a threonine residue at position 87 (I87T). The I87T mutation causes a recessive hypomorphic lesion in *IFNGR1* previously identified in only three known patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (patients X.1, X.2 and XI.1 in this study) (20,21). Residues 63 and 87 are highly conserved in mammals, being identical in 14 of the 18 species considered. Any changes observed are always conservative, with these residues being replaced by another branched-chain amino acid (V, L or I) in all but one case (Fig. 1).

### Founder effect analysis

An analysis of the SNP Array 6.0 data showed that patients carrying the I87T mutation had a common homozygous haplotype around *IFNGR1*, encompassing 2.8 Mb (corresponding to 968 SNPs) for patients VI.1 and X.1 (Fig. 2). A similar pattern was observed for the V63G mutant, with a longest shared haplotype of 4.7 Mb (corresponding to 1540 SNPs) for the three patients analyzed (Fig. 2). The ESTIAGE method estimated the age of the MRCA at 20 generations [95% CI (8–51)] for the V63G mutation and 64 generations [95% CI (35–118)] for the I87T mutation. Assuming a generation time of 25 years, the MRCA of the patients with the V63G and I87T mutations lived 500 (200–1275) and 1600 (875–2950) years ago, respectively. Unlike the patients with the V63G mutation, all of whom came from Gran Canaria and had homozygous haplotypes of similar lengths around *IFNGR1*, the patients with the I87T mutation came from different countries and had shared haplotypes of different lengths. An analysis of these haplotypes by subgroup for the patients with the I87T

mutation showed that the most closely related patients were the two Portuguese patients, with a MRCA estimated to have lived 475 (150–1725) years ago. The next most closely related patients were the two Chileans, who were estimated to have a MRCA with the two mainland Portuguese patients 1000 (475–2175) years ago, followed by the patient from the Azores, with a MRCA 1300 (675–2600) years ago, and finally the Polish patient, who was the most distantly related (age of MRCA estimated at 1600 years when considering all the patients as mentioned above).

Studies based on autosomal markers in the current population of Gran Canaria highlight a major European influence, mostly from the Iberian peninsula (23). However, due to a strong sexually asymmetric bias favoring mating between European men and indigenous women of north-west African Berber origin, there is an autochthonous contribution, mostly from maternal lineages (24,25). We tried to determine the most probable origin of the families carrying the V63G mutation, by analyzing haplotype variation for the uniparentally inherited Y chromosome and mitochondrial DNA (mtDNA) (Supplementary Material, Tables S1 and S2). MtDNAs from the patients and their parents belonged to haplogroups of probable pre-Hispanic origin, although haplogroups H (patients I.1, I.2 and their mother) and J (patients II.1 and III.1 and their mothers, and the father of patient IV.1—no samples from patient IV.1 were available) are also observed in Europeans. Similarly, we cannot rule out the possibility of a sub-Saharan origin, through the slave trade, for haplogroups L1b (mother and brother of patient IV.1) and L3e4 (father of patients I.1 and I.2). The Y chromosomes of the male patients and their fathers were mostly of European origin. In contrast, haplogroup E1b1b, of possible pre-Hispanic origin, was found in the father of patient IV.1 (haplogroup J for mtDNA). However, as haplogroup E1b1b is present at low frequency on the Iberian Peninsula, we cannot rule out the possibility of inheritance from Iberian colonizers.

### IFN- $\gamma$ R1 expression and IFN- $\gamma$ binding

Monocytes from patients bearing the I87T allele have been shown to express IFN- $\gamma$ R1 molecules on their surface (20). We found that monocytes from patients bearing the V63G allele showed only weak specific fluorescence with four anti-IFN- $\gamma$ R1 mouse monoclonal antibodies (mAbs) (GIR94, GIR208, BB1E2 and 92101), whereas fluorescence was normal or nearly normal with the fifth mAb (MMHGR-1) (Fig. 3). We then compared IFN- $\gamma$ R1 levels on Epstein Barr virus-transformed B (EBV-B) cells from patients homozygous for the V63G and I87T mutations (Fig. 4). EBV-B cells from V63G homozygous patients were stained slightly less strongly with the five mAbs than most I87T homozygous EBV-B cells, but these differences were not statistically significant. However, staining was variable in cells from patients with the same mutation and in healthy controls, particularly for the MMHGR1 mAb (Supplementary Material, Table S3). No IFN- $\gamma$ R1 expression was observed with any of the five mAbs in EBV-B cells from a patient with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency, suggesting that IFN- $\gamma$ R1 labeling was specific.

**Table 1.** Infections and organisms isolated from the IFN- $\gamma$  R1 deficient patients

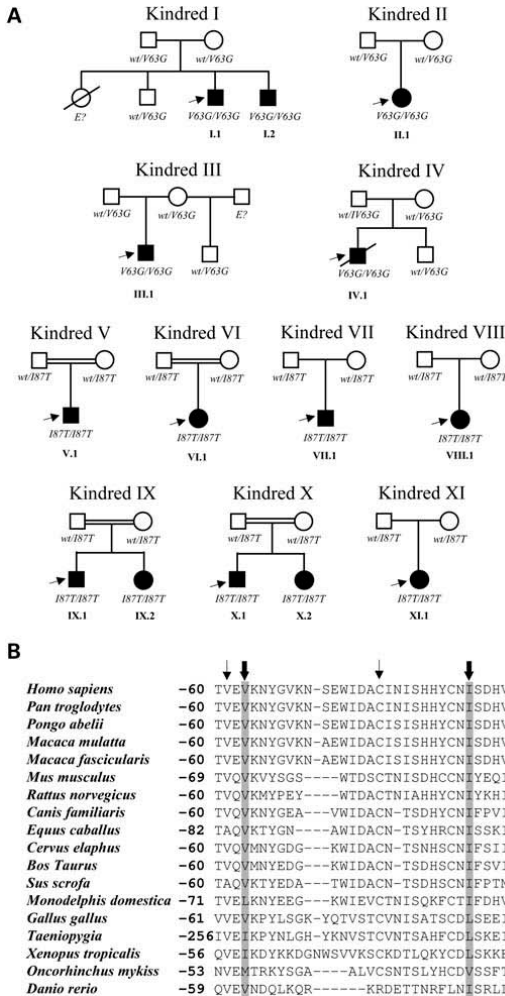
| Patient I.1 (Spain)<br>Age            | Episode  | Patient I.2 (Spain)<br>Age            | Episode   | Patient II.1 (Spain)<br>Age   | Episode  |
|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---|-------------------------------|--|
| 5 days                                | Urinary infection and omphalitis   | 2 years                               | Varicella   | 1 month                       | Bronchiolitis; respiratory syncytial virus   |
| 5 years 6 months                      | <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | 3 years                               | Gastroenteritis, <i>Shigella sonnei</i>   | 4 months–37 months            | Acute respiratory failure (8 $\times$ )<br>Gastroenteritis, <i>Cryptosporidium</i> spp. <sup>a</sup> |
| 5 years 9 months                      | Varicella; unremarkable course   | 4 years                               | Pneumonia, controlled with amoxicillin <sup>b</sup>   | 47 months                     | <i>Haemophilus influenzae</i> (1 $\times$ )  |
| 16 years                              | Aseptic meningitis <sup>b</sup>  | 6 years                               | Lateral cervical lymphadenopathies <sup>b</sup>   | 4 years 1 month               | <i>Erythema nodosum</i> (6 $\times$ ), Anti-A60,<br>lymphadenopathies. Mantoux-positive              |
| 16 years 6 months                     | Mediastinal conglomerate; pericardectomy   | 21 years                              | Lasted 1–2 years. Surgical excision   | 5 years                       | <i>Mycobacterium abscessus</i>   |
|                                       | Osteomyelitis, retroperitoneal lymphadenopathies. Acid-fast bacilli <sup>c</sup> | 22 years                              | Propylactic isoniazid for 6 months  | 10 years 2 months             | <i>Erythema nodosum</i> (4 $\times$ ), Anti-A60,<br>lymphadenopathies, diarrhea <sup>b</sup>         |
| 27 years                              | Healthy. No prophylaxis  | 31 years                              | Osteomyelitis. Acid-fast bacilli <sup>c</sup>   | 12 years 6 months             | Septic shock, <i>Salmonella enteritidis</i>  |
|                                       | Healthy. No prophylaxis  |                                       | Healthy. No prophylaxis   | 14 years                      | Healthy. No prophylaxis  |
| Patient III.1 (Spain)<br>Age          | Episode  | Patient IV.1 (Spain)<br>Age           | Episode   | Patient V.1 (Chile)<br>Age    | Episode  |
| 22 months                             | Pain in the left ankle   | 23 months                             | Diagnosed with juvenile chronic arthritis   | 1 day                         | BCG vaccination  |
| 33 months                             | Multifocal osteomyelitis, <i>Mycobacterium avium</i>                             | 41 months                             | Lumbar pain   | 4 months                      | Axillary adenopathy  |
|                                       |  | 6 years 11 months, 7 years 1 month    | Lumbar pain. Arthrodosis. Suspicion of Langerhans cell histiocytosis                              | 11 months                     | Hepatosplenomegaly, BCGosis  |
| 6 years 3 months                      | Healthy. No prophylaxis  | 7 years 2 months                      | Osteomyelitis, <i>Mycobacterium avium</i>   | 7 $\frac{1}{2}$ years         | Molluscum contagiosum  |
|                                       |  |                                       | Septic shock, multorgan dysfunction syndrome. Exitus  | 8 years 6 months              | Healthy. No prophylaxis  |
| Patient VI.1 (Portugal)<br>Age        | Episode  | Patient VII.1 (Chile)<br>Age          | Episode   | Patient VIII.1 (Chile)<br>Age | Episode  |
| 2 days                                | BCG vaccination  | 2 days                                | BCG vaccination   | 2 days                        | BCG vaccination  |
| 14 weeks                              | Adenopathy, Hepatomegaly, BCGosis  | 7 months                              | Axillary lymphadenitis. Osteomyelitis, Cerebral infection. BCGosis                                | 5 months                      | BCGitis, multifocal osteomyelitis  |
| 5 years                               | On anti-mycobacterial therapy  | 5 years 6 months                      | On anti-mycobacterial therapy plus IFN- $\gamma$  | 26 months                     | On anti-mycobacterial therapy plus IFN- $\gamma$   |
| Patient IX.1 (Portugal-Azores)<br>Age | Episode  | Patient IX.2 (Portugal-Azores)<br>Age | Episode   | Patient X.1 (Portugal)<br>Age | Episode  |
| 2 days                                | BCG vaccination  | 2 months                              | Disseminated <i>Salmonella</i> spp.   | 1 month                       | BCG vaccination, BCGosis   |
| 2 months                              | BCGitis  | 3 years 8 months                      | Healthy. No prophylaxis   | 6 years                       | Disseminated <i>Salmonella enteritidis</i>   |
| 7 years                               | Pneumonia, controlled with ampicillin <sup>b</sup>                               |                                       |   | 12 years                      | Pneumonitis (2 $\times$ ): <i>Legionella</i> spp. and<br><i>Mycoplasma pneumoniae</i>                |
| 8 years 3 months                      | Encephalitis, <i>Toxoplasma gondii</i>   |                                       |   | 28 years                      | Healthy. No prophylaxis  |
| 8 years 11 months                     | On anti-toxoplasma therapy   |                                       |   |                               |  |
| Patient X.2 (Portugal)<br>Age         | Episode  | Patient XI.1 (Poland)<br>Age          | Episode   |                               |  |
| 3 years                               | Clinical tuberculosis <sup>b</sup>   | 1 month                               | BCG vaccination. No complications   |                               |  |
| 6 years                               | Pneumonitis, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>  | 20 years                              | Osteomyelitis. Suspicion of Langerhans cell histiocytosis (steroids and cyclosporine A). Diabetes |                               |  |
|                                       |  | 21 years                              | Osteomyelitis. Brain and lung infiltration. <i>Mycobacterium avium</i>                            |                               |  |
| 22 years                              | Healthy. No prophylaxis  | 29 years                              | No infections without prophylaxis   |                               |  |

Anti-A60, IgG antibodies against mycobacterial antigen 60; BCG, Bacillus Calmette-Guérin.

<sup>a</sup>Unlike patients with other primary immunodeficiencies and IFN- $\gamma$ -deficient mice (52–55), the patient spontaneously recovered from the disease without specific drug treatment and no recurrences were observed.

<sup>b</sup>Unidentified microorganism.

<sup>c</sup>Histological examination (Ziehl-Neelsen staining).



**Figure 1.** Missense mutations in the gene encoding the IFN- $\gamma$ R1 chain identified in the patients and their relatives. (A) Pedigrees of the 11 unrelated families of the IFN- $\gamma$ R1-deficient patients. The patients are indicated by a black square or circle. The *IFNGR1* genotypes (V63G and I87T: the V63G and I87T mutants, respectively; wt, wild-type; E?, unknown) of all family members are indicated. Roman numerals indicate the kindred and Arabic numerals indicate the patients in each kindred. The index patients are indicated by an arrow. (B) Alignment of the extracellular portion of the human IFN- $\gamma$ R1 molecule containing residues 63 and 87 and the corresponding regions in 17 other species. The mutated residues are indicated in gray and by a thick arrow. Residues 61 and 77, found to be mutated (C77Y, C77F, V61Q) in patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency, are indicated by a thin arrow. The alignment was edited manually with Bioedit software (51).

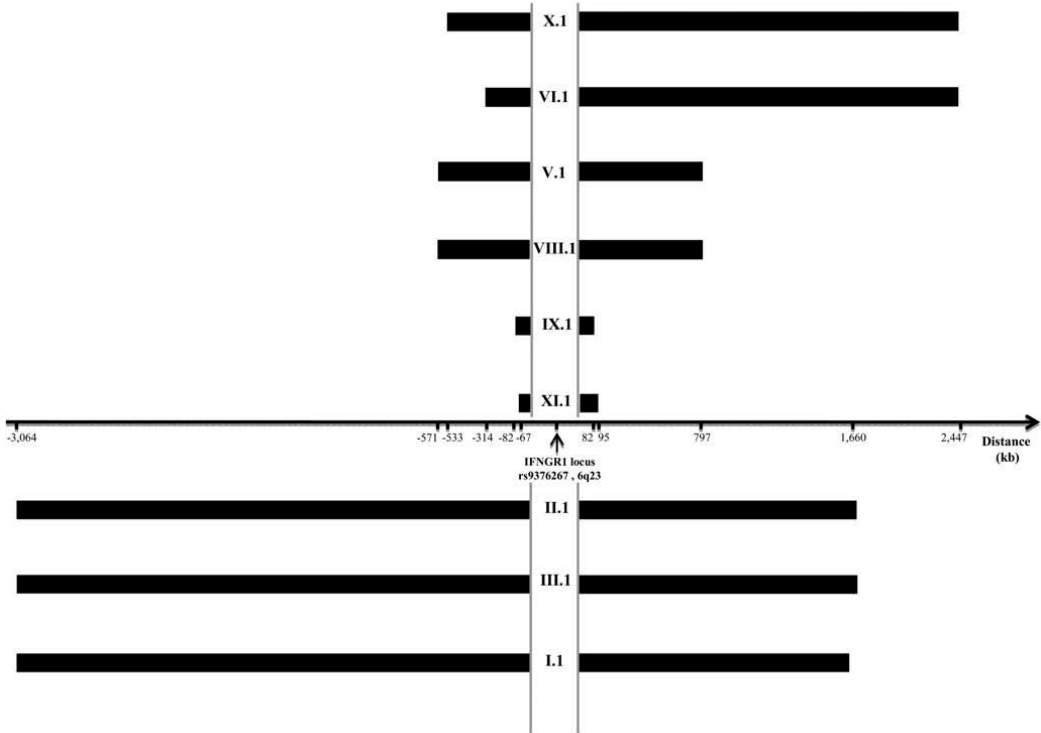
We investigated the functional relevance of the V63G mutation, by first analyzing the binding of IFN- $\gamma$  to the surface-expressed V63G IFN- $\gamma$ R1 molecules in a novel fluorescent IFN- $\gamma$ -binding assay (Fig. 5). Monocytes from patients

I.1, I.2 and III.1 displayed lower levels of specific binding of IFN- $\gamma$  at low concentrations of the cytokine (1 IU IFN- $\gamma$ /ml) than control cells: mean fluorescence intensity (MFI) was  $12.3 \pm 9.7$  in cells from the patients versus  $114.9 \pm 45.7$  in cells from the controls ( $P = 0.019$ ; the values given are MFI after incubation with rhIFN- $\gamma$  minus MFI after incubation with medium alone  $\pm$  standard deviation). However, these differences were less marked at medium ( $10^3$  IU IFN- $\gamma$ /ml; MFI  $55.1 \pm 24.7$  for the patients' cells versus  $144.5 \pm 60.2$  for the control cells;  $P = 0.076$ ) and high IFN- $\gamma$  concentrations ( $10^5$  IU IFN- $\gamma$ /ml; MFI  $110.7 \pm 47.1$  for the patients' cells versus  $190.5 \pm 135.9$  for the control cells;  $P = 0.39$ ). EBV-B cell lines homozygous for I87T have been shown to be capable of signal transduction at medium and high IFN- $\gamma$  concentrations, consistent with an ability to bind IFN- $\gamma$  (20). Thus, these results suggest that patients homozygous for either the I87T or the V63G *IFNGR1* allele displayed IFN- $\gamma$ R1 deficiency with the detectable expression of IFN- $\gamma$ R1 molecules on the surface of their cells. The deficiency observed thus resulted from the presence of too few receptors on the surface of the cell, low levels of IFN- $\gamma$  binding to the receptors present or both.

Consistent with the expression of abnormal IFN- $\gamma$ R1 molecules, plasma IFN- $\gamma$  concentrations were high in our patients (51 pg/ml in I.1, 70 pg/ml in I.2, 51 pg/ml in II.1, 129 pg/ml in III.1, 40 pg/ml in V.1, 915 pg/ml in VI.1, 222 pg/ml in VII.1, 89 pg/ml in IX.1, 55 pg/ml in IX.2 and 48 pg/ml in XI.1), whereas no IFN- $\gamma$  was detected in the plasma of healthy individuals. Analysis of a plasma sample from patient III.1 7 months after diagnosis showed plasma IFN- $\gamma$  concentration to be 76 pg/ml. However, plasma IFN- $\gamma$  concentration was excessively high in patient IV.1, in the 3 days preceding his death (post-mortem analysis): 15253, 25972 and 17360 pg/ml 1, 2 and 3 days before death, respectively. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  and IL-2 were undetectable or present at very low concentrations in the plasma of this patient, but high levels of IL-6 (846 pg/ml), IL-8 (927 pg/ml) and IL-10 (108.4 pg/ml) were also detected. The very high concentrations of IFN- $\gamma$  observed in two patients (VI.1 and VII.1) probably reflect the fact that the plasma samples from these patients were obtained during the course of mycobacterial disease. Patient IV.1 was the only other patient from whom plasma samples were collected during mycobacterial disease. The IFN- $\gamma$  levels observed in patient IV.1 may reflect a high mycobacterial burden due to late diagnosis of the infection. No differences in serum IFN- $\gamma$  concentrations were observed between patients bearing the V63G and the I87T alleles, when patient IV.1 was excluded from the comparison.

These results contrast with the very high plasma IFN- $\gamma$  concentrations observed in patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency ( $249 \pm 101$  pg/ml). This cytokine was undetectable in the plasma of patients with the DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency and in healthy individuals (26). We previously showed that these high IFN- $\gamma$  concentrations result from high levels of IFN- $\gamma$  production and/or impaired clearance of this cytokine in the mouse model (27). Our results reflect the impairment, but not the abolition, of IFN- $\gamma$  binding and clearance from the blood in patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency. Plasma IFN- $\gamma$  concentration appears to be a good indicator of the

**I87T**



**V63G**

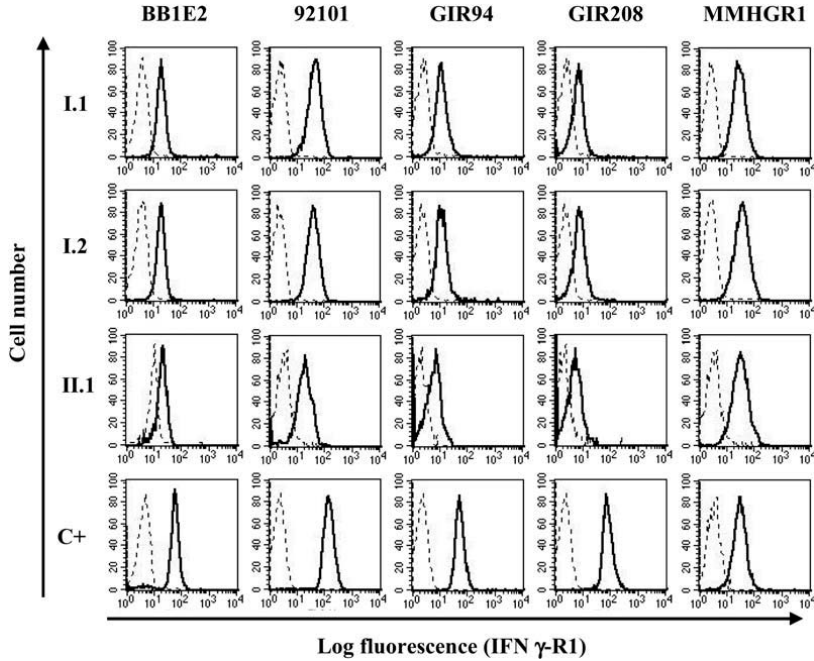
**Figure 2.** Haplotype sharing in the *IFNGR1* region, in patients with the I87T and V63G mutations. Long continuous stretches of homozygosity were observed around the gene, consistent with its recessive mode of inheritance. Haplotypes were thus unambiguously derived from genotypes. Perfect haplotype matches are shown after the exclusion of no-call SNPs.

activity of severe infections, and of mycobacterial diseases in particular, in patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency, as in patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (unpublished data).

**STAT-1 phosphorylation and DNA binding in cells from the patients**

Like the I87T allele (20), the V63G allele may be a hypomorphic mutation. We analyzed the phosphorylation of STAT-1 (pY-701), and found that monocytes from patients bearing the V63G allele showed no detectable STAT-1 phosphorylation following incubation with 10 IU IFN- $\gamma$ /ml, whereas a significant increase in pY-701 was observed in control cells (Fig. 6). At higher IFN- $\gamma$  concentrations ( $10^2$  and  $10^3$  IU/ml), an increase in STAT-1 phosphorylation was observed in V63G cells and, at the highest concentrations of IFN- $\gamma$ , phosphorylation levels were similar to those achieved after stimulation with IFN- $\alpha$ . Nevertheless, STAT-1 phosphorylation levels remained slightly lower than those in cells from healthy individuals or healthy carriers of the V63G allele (Fig. 6).

STAT-1 translocation to the nucleus in response to low concentrations of IFN- $\gamma$  (10 IU IFN- $\gamma$ /ml) has been shown to be abolished in EBV-B cells from patients with the I87T mutation. However, a response to intermediate ( $10^3$  IU/ml) and high ( $10^5$  IU/ml) concentrations of IFN- $\gamma$  was observed, with no detectable plateau (20,28). We compared the IFN- $\gamma$ R1-mediated signaling of the V63G and I87T molecules, by quantifying the nuclear translocation and DNA-binding activity of STAT-1 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fig. 7). EBV-B cells from three V63G homozygotes were less likely to have STAT-1 present in the nucleus ( $9.33 \pm 10.8\%$  of control samples, range 2.9–21.8%), than cells from five I87T homozygotes ( $31.16 \pm 27.8\%$  of control samples, range 12.18–80%) after stimulation with  $10^3$  IU IFN- $\gamma$ /ml, although these differences were not significant. At higher concentrations of IFN- $\gamma$  ( $10^5$  IU/ml) similar, but slightly stronger responses were observed ( $50.9 \pm 15.1\%$ , range 33.49–60.47% that observed with the control cell line for V63G cells versus  $46.2 \pm 21.47\%$ , range 23.3–79.36%, for I87T cells). EBV-B cells from a patient with DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency responded less strongly than V63G



**Figure 3.** Detectable IFN- $\gamma$ R1 molecules on the surface of monocytes of the *IFNGR1*-V63G-homozygous patients. Whole blood from three V63G-homozygous patients and from one healthy control (C+) was stained with five IFN- $\gamma$ R1-specific mAbs (solid lines) and isotypic control antibodies (dashed line). The specific binding observed in C+ is representative of that observed in monocytes from four healthy controls.

and I87T cells, particularly at high IFN- $\gamma$  concentrations. No response was observed in cells from a patient with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency. All cell lines showed a similar response to IFN- $\alpha$  (data not shown).

#### Distal events of IFN- $\gamma$ -mediated signaling

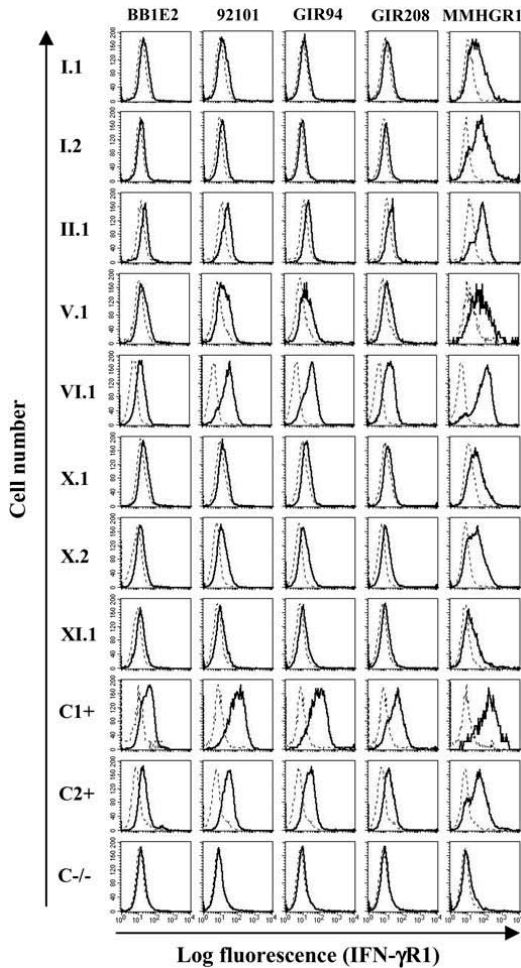
The ratio of IL-12p40 production in response to BCG plus IFN- $\gamma$  to that in response to BCG alone was much lower in cultures of cells from our patients than in cells from healthy controls (Fig. 8). Monocytes from patients homozygous for the I87T allele have been shown to display an upregulation of CD64 in response to high concentrations of IFN- $\gamma$  ( $10^4$  IU/ml) (20). CD64 upregulation was detectable, but weaker in V63G homozygous monocytes than in monocytes from healthy controls stimulated with high ( $10^4$  IU/ml) concentrations of IFN- $\gamma$ , in which the response to low (10 IU/mL) concentrations was poor or entirely absent (Fig. 8). Like peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals, PBMCs from I87T patients were found to respond to high, but not to low concentrations of IFN- $\gamma$  in terms of TNF- $\alpha$  production in response to lipopolysaccharide (LPS) plus IFN- $\gamma$  (data not shown) (20).

We then determined, in whole-blood cultures, the ratio of IL-12p70 production in response to LPS plus various concentrations of IFN- $\gamma$  to IL-12p70 production in response to LPS

alone. Like cells from I87T homozygous patients, cells from V63G homozygous patients responded to high, but not to low concentrations of IFN- $\gamma$  (Fig. 8), and similar results were also obtained for the ratio of TNF- $\alpha$  production (data not shown). However, unlike I87T cells (20), V63G cells responded significantly less strongly to high IFN- $\gamma$  concentrations than cells from healthy controls. No IFN-inducible protein 10 (IP-10) production was observed in whole-blood cultures from patients with the V63G mutation stimulated with low to medium IFN- $\gamma$  concentrations ( $10$ – $10^3$  IU/ml), by contrast to the results obtained for cultured cells from healthy individuals (Fig. 8). However, at very high IFN- $\gamma$  concentrations ( $5 \times 10^5$  IU/ml), the increase in IP-10 production by cells from the patients was similar to that observed in cells from healthy controls. Similar results were obtained for monokine induced by gamma-interferon (MIG) production (data not shown). Thus, the four V63G homozygous patients described here, such as I87T homozygous patients, clearly suffer from RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency.

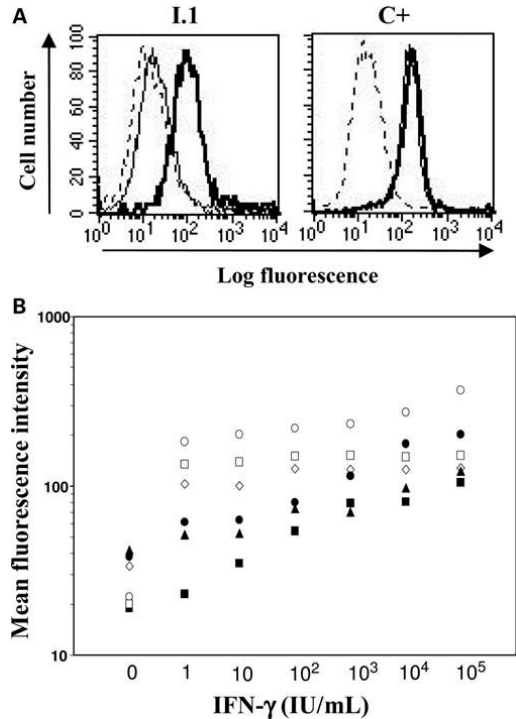
#### Mycobacterial infections

An analysis of the 14 patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency showed that the onset of the first EM disease occurred at ages of 15.75 years (I.1), 22.25 years (I.2), 4.17 years (II.1), 1.83 years (III.1) and 20 years (X.1), with the first onset of



**Figure 4.** IFN- $\gamma$ R1 expression on EBV-B cells from patients homozygous for the V63G and I87T mutations. EBV-B cells from three V63G-homozygous patients (I.1, I.2 and II.1), five I87T-homozygous patients (V.1, VI.1, X.1, X.2 and XI.1), two healthy controls (positive control, C1+ and C2+) and a patient with complete IFN- $\gamma$ R1 deficiency and no expression of IFN- $\gamma$ R1 described in a previous study (negative control, C-/-) were stained with five IFN- $\gamma$ R1-specific mAbs (solid lines) and isotypic control primary antibodies (dashed lines).

tuberculosis at the age of 3 years (X.2). Clinical data suggested a possible age at onset of EM disease of 2 to 3 1/2 years in patient IV.1. BCG vaccination was the cause of disseminated BCG disease in six patients, although one patient had been vaccinated in infancy without complications (patient XI.1). *Mycobacterium abscessus*, a rapidly growing species, caused disseminated infection in patient II.I; infection with this rapidly growing species has been reported before in patients

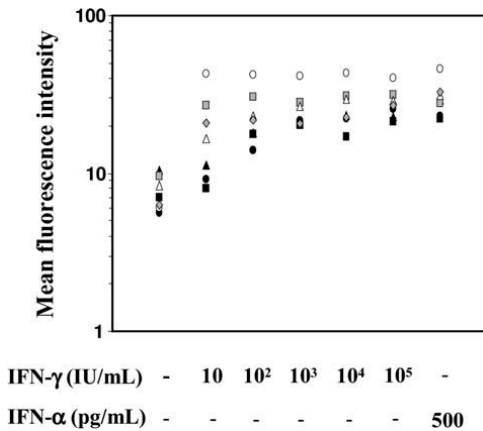


**Figure 5.** Cells from *IFNGR1*-V63G-homozygous patients show impaired but detectable IFN- $\gamma$  binding. (A) Representative experiment showing the binding of anti-IFN- $\gamma$  antibody to monocytes from patient I.1 and a healthy control (C+) when cells were incubated with medium alone (dashed line), 1 IU IFN- $\gamma$ /ml (thin line) and 10<sup>3</sup> IU IFN- $\gamma$ /ml (thick line). (B) Data are the MFI of anti-IFN- $\gamma$  antibody binding to monocytes from patients I.1, I.2 and III.1 (closed symbols) and three healthy controls (open symbols). Each symbol represents the value for an individual patient or healthy control.

with IFN- $\gamma$ R2 deficiency (29,30). We cannot exclude the possibility of a causal effect of immunosuppression with IV methylprednisolone and IV hydrocortisone in the infection of patient II.1, and immunosuppressive treatment (corticosteroids and cyclosporin A, see the Supplementary patients section) may also have contributed to the dissemination of *M. avium* infection in patient XI.1.

The mean number of organs infected in patients with EM disease was  $1.83 \pm 1.33$  ( $n = 6$ ), or  $1.71 \pm 1.25$  if the patient with clinical tuberculosis (X.2) was taken into account ( $n = 7$ ). Five of these six patients suffered from osteomyelitis, and four (patients I.2, III.1, IV.1 and XI.1) had no other apparent site of mycobacterial disease at the onset of disease. After 9 months of osteomyelitis, patient XI.1 also developed brain and lung infiltration immediately after the introduction of immunosuppressive treatment. The mean number of organs infected in patients with BCG disease was  $2.66 \pm 1.51$  ( $n = 6$ ); only two of these six patients developed osteomyelitis.





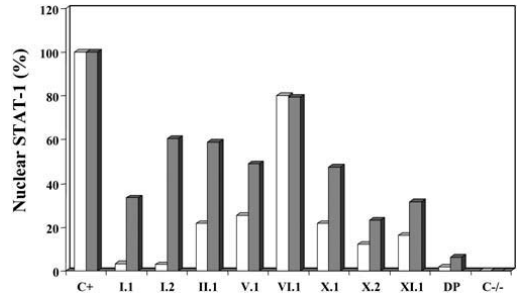
**Figure 6.** High concentrations of IFN- $\gamma$  induce STAT-1 phosphorylation in monocytes from IFNGR1-V63G-homozygous patients. Data are the MFI of anti-STAT-1-Y701 antibody binding to monocytes from patients I.1, I.2 and II.1 (black closed symbols), two healthy carriers (gray closed symbols) and two healthy controls (open symbols). Each symbol represents the value from an individual patient or healthy control.

### Non-mycobacterial infections

Non-typhoidal systemic salmonellosis was observed in three patients. Other serious infections, caused by *Shigella sonnei*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae* and *Klebsiella* spp., or pneumonia of suspected bacterial etiology were recorded in six patients (Table 1). The V63G homozygous patient reported in a previous study (22) also had pneumonia due to *K. pneumoniae*. Patient IX.1 suffered from *Toxoplasma* encephalitis (Gonçalo-Marques *et al.*, manuscript in preparation). Viral infections (aseptic meningitis, molluscum contagiosum and bronchiolitis due to respiratory syncytial virus) were also observed in three patients (Table 1). Severe viral infections with clinical signs have been reported in a few IFN- $\gamma$ R1-deficient patients (14,31,32). In contrast, patients I.1 and I.2, and at least seven previously reported patients (14,31), suffered an uneventful courses of chicken-pox. Some patients presented several different bacterial and viral infections, making it difficult to establish a causal relationship.

### Outcome

Thirteen of our 14 patients survived until last follow-up at  $14.82 \pm 11.2$  years. Ten patients were healthy, without prophylaxis, at the ages of 3, 6, 8 years and 2 months, 8 years and 6 months, 14, 22, 27, 28, 29 and 31 years (Table 1); one patient subsequently developed *Toxoplasma* encephalitis at the age of 8 years and 3 months. Three patients are healthy (VI.1) or recovering (VII.1 and VIII.1) on antimycobacterial therapy at the ages of 5 years, 5  $\frac{1}{2}$  years and 26 months, respectively. In patient VII.1, lung and cerebral lesions caused by multiresistant BCG still developed while the patient was on antimycobacterial therapy, although his clinical status improved while on a multiple-drug



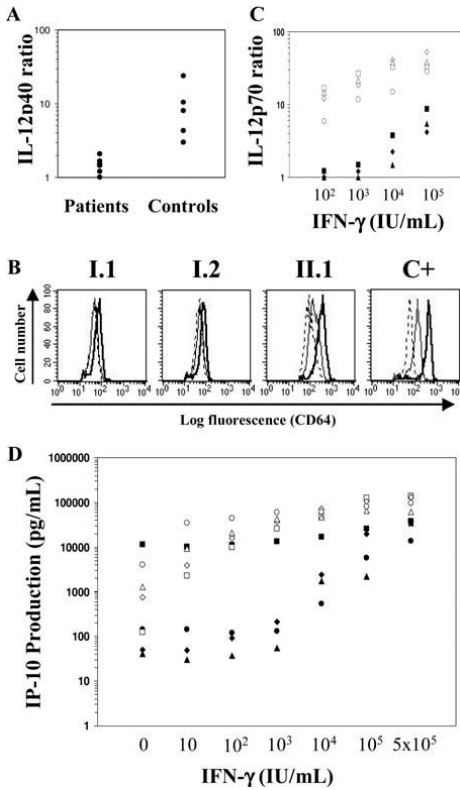
**Figure 7.** Translocation of STAT-1 to the nucleus upon stimulation with IFN- $\gamma$ , in terms of the effect of the I87T and V63G mutations. EBV-B cells from patients homozygous for the V63G (I.1, I.2, II.1) or the I87T (V.1, VI.1, X.1, X.2, XI.1) mutation, a healthy control (positive control, C+), and two patients with DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency and complete IFN- $\gamma$ R1 deficiency (negative control, C-/-), respectively, reported elsewhere were incubated without and with  $10^3$  (white) or  $10^5$  (gray) IU IFN- $\gamma$ /ml for 30 min. The translocation of STAT-1 into the nucleus was detected by ELISA. Values indicate the percentage binding to DNA in nuclear extracts from patients' EBV-B cells stimulated with various doses of IFN- $\gamma$  relative to binding to DNA in EBV-B cells from a healthy control.

mycobacterial treatment regimen supplemented with IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$ . Patient IV.1 died at the age of 7 years, 9 days after the diagnosis of a previously undetected long-term *M. avium* infection and the initiation of antimycobacterial treatment.

### DISCUSSION

We report here a series of 14 patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency resulting from mutations in the region encoding the extracellular domain of IFN- $\gamma$ R1. The I87T mutation was found in six kindreds from Portugal, Poland and Chile, and the V63G mutation was found in four unrelated kindreds from Gran Canaria (Spain).

A founder effect was found for both the I87T and V63G mutations. Simulation studies have shown that the ESTIAGE method provides excellent age estimates for the MRCA from small number of individuals, and the precision of this method has been greatly improved by the advent of high-resolution genotyping (33). The MRCA of the I87T and V63G patients probably lived  $\sim 1600$  (95% CI 875–2950) and 500 (200–1275) years ago, respectively. These confidence intervals could be narrowed if data for more patients were available. It is difficult to identify a single most probable hypothesis concerning the migrations underlying the founder effect of I87T. However, the Azores were populated during the early 15th century, before the wave of migration to South America, consistent with our estimation that the Azorean patient was more distantly related to the mainland Portuguese patients than the Chileans. Our data for the V63G mutation are consistent with the settlement history of the Canary Islands. The MRCA for V63G patients dates back to the colonization of the Canary Islands by Europeans, mostly from Spain (late 15th and 16th centuries). This, together with the known major genetic contribution of Spain



**Figure 8.** Late events in IFN- $\gamma$ -induced activation are detectable in cells from patients homozygous for the V63G mutation. (A) Low levels of IL-12p40 production in response to BCG plus IFN- $\gamma$ . Symbols represent the ratio of IL-12p40 produced in response to BCG plus IFN- $\gamma$  to IL-12p40 produced in response to BCG alone, in whole-blood cultures from three V63G-homozygous patients, three I87T-homozygous patients and six healthy controls. (B) Induction of CD64 expression on monocytes following stimulation with IFN- $\gamma$ . Histograms show the binding of anti-CD64 antibody to whole-blood monocytes from patients I.1, I.2, and II.1 and a healthy control (C+) left unstimulated (dashed line) or stimulated with 10 IU/ml (thin line) or 10<sup>4</sup> IU/ml (thick line) IFN- $\gamma$ . The results are representative of two independent experiments for each patient and healthy control. (C) IL-12p70 production *in vitro* in response to various concentrations of IFN- $\gamma$ . The data shown are the ratio of IL-12p70 produced in response to LPS plus various concentrations of IFN- $\gamma$  to IL-12p70 produced in response to LPS alone. Each symbol represents the value from an individual V63G-homozygous patient (closed symbols) or healthy control (open symbols). (D) *In vitro* IP-10 production in response to various concentrations of IFN- $\gamma$ . Each symbol represents the value from an individual V63G-homozygous patient (closed symbols, four patients) or healthy control (open symbols, four healthy controls).

to the population of the islands (24,25), strongly suggests that this mutation arrived with a settler from the Iberian Peninsula, probably from Spain. However, the Canary Islands archipelago was probably first populated by settlers of north-west African Berber origin, in the first millennium BC, and an aboriginal substrate is also observed in the current population of the Canary Islands (24,25). Indeed, analyses of

uniparentally inherited markers reveal a strong sexually asymmetric event, with mating between European men and indigenous women favored (24,25). The likely European origin of the Y chromosome in our male patients is consistent with our hypothesis of a mutation brought by a Spanish male settler in the 15th or 16th century.

With the exception of the recently reported mutation in the first initiation codon of the *IFNGR1* gene, which leads to almost complete IFN- $\gamma$ R1 deficiency that is difficult to distinguish from complete deficiency at the cellular and clinical levels (10), I87T is the mutation that first defined and best illustrates RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (20). Homozygosity for the V63G allele was previously reported in another patient, who was thought to suffer from RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (2-4,22). Our analysis of early and late events in IFN- $\gamma$ -induced activation shows that the V63G allele is actually hypomorphic, conferring RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency. The V63G allele was also recently reported to be a hypomorphic variant in experiments comparing the IFN- $\gamma$  responses of an IFN- $\gamma$ R1-deficient lung adenocarcinoma cell line transduced with several *IFNGR1* alleles obtained by site-directed mutagenesis (34). However, this previous study suggested that the V63G mutation, such as the I87T mutation, results in much more severe impairment of IFN- $\gamma$ R1 expression and IFN- $\gamma$ R1-mediated activation than observed in the analysis of PBMC and EBV-B cell lines from our patients. These differences were particularly evident in experiments with intermediate and high concentrations of IFN- $\gamma$ .

Assessments of STAT-1 translocation to the nucleus in IFN- $\gamma$ -stimulated EBV-B cells showed that cells from our patients displayed a mild response to intermediate IFN- $\gamma$  concentrations and a normal response to high concentrations, with no detectable plateau. Lower levels of STAT-1 translocation to the nucleus were observed in V63G EBV-B cells than in I87T EBV-B cells when both cell lines were stimulated with intermediate IFN- $\gamma$  concentrations, although this difference was not significant, but no differences were observed at high concentrations of IFN- $\gamma$ . However, consistent with the previous result (28), EBV-B cells from a patient with DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency were shown to respond poorly to intermediate and high concentrations of IFN- $\gamma$ , with a plateau at intermediate concentrations. Our results show that the V63G and I87T mutations lead to a less severe cellular phenotype, as demonstrated by the level of STAT-1 translocation to the nucleus, than mutations leading to DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency.

The IFN- $\gamma$ R1 is a type II cytokine receptor with extracellular regions consisting of two immunoglobulin-like domains. Each of these domains forms a  $\beta$  sandwich consisting of a three- $\beta$ -strand and a four- $\beta$ -strand antiparallel  $\beta$ -sheet (35-37). The net result of the V63G and I87T mutations contrasts with that of the other five in-frame mutations affecting the extracellular domain (C77Y, C77F, V61Q, 295del12 and 652del3), which result in cell surface-expressed dysfunctional molecules that are unable to bind IFN- $\gamma$ , and RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (4,18). The non-polar, aliphatic amino acids valine and isoleucine are overrepresented in  $\beta$ -sheets. However, the factors stabilizing  $\beta$ -strands and the rules governing  $\beta$ -sheet formation are poorly understood (38). Further studies are required to elucidate the observed differences

conferred by these mutations in terms of ligand-binding and signal transduction.

Clinically, the patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency reported had a much less severe clinical phenotype than patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (3,4,14). The first EM disease occurred later in patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (mean age at onset:  $11.25 \pm 9.13$  years) than in patients with RC deficiency ( $3.1 \pm 2.5$  years), but age at onset was similar in patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency and in those with DP deficiency ( $13.4 \pm 14.3$  years). The mean number of organs affected in patients with RC and DP deficiencies with *M. avium* disease was  $4.1 \pm 0.8$  and  $2.0 \pm 1.1$ , respectively. If we take into account non-BCG mycobacterioses, a mean of  $1.71 \pm 1.25$  organs were affected in the seven RP-IFN- $\gamma$ R1 patients concerned. Five of these seven patients presented osteomyelitis, which was the only presentation in four of the patients, at least at the time of diagnosis. The patients with the V63G mutation described in a previous study also had osteomyelitis due to *M. avium* and *M. szulgay* as the only presentation (20). *Mycobacterium avium* osteomyelitis, with no other apparent site of mycobacterial disease, was observed in about a third of all patients with DP deficiency, but not in patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (14). BCG vaccination was the cause of curable, disseminated BCG disease in five RP-IFN- $\gamma$ R1-deficient patients, although one patient had been vaccinated in infancy without complications. Similarly, the penetrance of vaccine-associated BCG disease in patients with DP deficiency is high, but not complete, whereas all BCG-vaccinated patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency developed BCG disease. Patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency have chronic mycobacterial disease that does not resolve with treatment with relapses following the discontinuation of antibiotics. Bone marrow transplantation is the only effective curative treatment (3,4,39,40). Like patients with DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency, patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency had mycobacterial disease that resolved rapidly with adequate treatment. Even in the absence of prophylaxis, recurrent or multiple mycobacterial infection was observed in only one patient with multidrug-resistant *M. abscessus* (II.1), who received a short course of antimycobacterial treatment because of its toxicity. This suggests that infection with mycobacteria, including the BCG vaccine strain, prevented the subsequent development of EM infections. However, a high rate of mycobacterial relapses was observed in patients with DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (3,4), and late-onset infection with EM is common in patients with DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency presenting curable BCG infection (14). This suggests that the clinical phenotype of RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency may be even milder than that of DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency. However, additional patients with V63G and I87T mutations must be diagnosed and studied for firm conclusions to be drawn. Our findings highlight the close correlation between *IFNGR1* genotype, the cellular phenotype of IFN- $\gamma$  responsiveness and clinical phenotype.

Only 4 of the 22 patients with RC-IFN- $\gamma$ R1 deficiency described in previous studies reached the age of 12 years, whereas only two deaths have occurred among the 38 reported patients with DP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (4,14). Thirteen of our 14 patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency are alive. Ten of our patients were healthy, without prophylaxis, at the ages of 3, 6, 8 years and 2 months, 8 years and 6 months, 14, 22, 27, 28, 29 and 31 years, after a follow-up of  $11.15 \pm 7.49$  years since the

onset of the disease. One of these patients developed encephalitis due to *Toxoplasma gondii* at the age of 8 years and 3 months (Gonçalo-Marques *et al.*, manuscript in preparation). This patient is now 8 years and 11 months old and is recovering on anti-*Toxoplasma* treatment. Three patients are healthy (VI.1) or recovering (VII.1 and VIII.1) on anti-mycobacterial therapy with (VII.1 and VIII.1) or without (VI.1) IFN- $\gamma$  at the ages of 5 years,  $5\frac{1}{2}$  years and 26 months. The clinical phenotype of 1 patient (VII.1) was much more severe than those of the other 10 living patients, although his clinical status improved on multidrug anti-mycobacterial treatment supplemented with IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$ . One patient with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency (IV.1) died from multiorgan dysfunction syndrome at the age of 7 years, 4 days after the diagnosis of *M. avium* infection. However *M. avium* disease probably began when the patient was between 2 and  $3\frac{1}{2}$  years old. The V63G homozygous patient described in a previous study is healthy at the age of 17 years, with no prophylaxis. However, a brother of this patient died at the age of 10 years from virulent *M. bovis* meningitis (caused by a strain other than BCG) (22). This patient's history, and that of patient X.2, suggests that, like patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency (41), patients with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency may present with *bona fide* tuberculosis.

In conclusion, this first series of patients shows that RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency is not limited to the single kindred published in 1997 (20). After excluding patients with mycobacterial cervical lymphadenitis, mycobacterial infection secondary to cystic fibrosis and catheter-related infections, four of the five children from Gran Canaria (838 397 inhabitants in 2009) diagnosed with disseminated EM infections in the 1997–2009 period suffered from RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency, and one child had IL-12R $\beta$ 1 deficiency (22,41,42) (this report). In addition, two adult patients with disseminated mycobacterial infection (probably caused by EM, patients I.1 and I.2) were also diagnosed with RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency in the same period. Taken together, our results indicate that RP-IFN- $\gamma$ R1 is more common than initially thought. Moreover, although the I87T and V63G mutations result from two founder events at the *IFNGR1* locus, conferring similar, but not identical, cellular phenotypes of IFN- $\gamma$  responsiveness, the clinical phenotype of the patients varies considerably, even among individuals homozygous for the same mutation. Several factors may be involved in this clinical heterogeneity, including differences in environmental exposure, type of microorganism, the virulence and antibiotic resistance of different strains, and even delays in diagnosis and the adequacy of antibiotic treatment. In addition, host variability for other genes may also influence the immune response. RP-IFN- $\gamma$ R1 deficiency should therefore be considered in both children and adults with mild or severe mycobacterial diseases.

## PATIENTS AND METHODS

We investigated 14 patients from 11 unrelated kindreds. The clinical features of the patients are shown in Table 1 and the Supplementary patients section. Patients X.1, X.2 and XI.1 have been described elsewhere (20,21). Informed consent was obtained from each patient or the patient's family. The protocol was approved by the local ethics committees of the various institutions involved.

### Sequencing of the *IFNGR1* gene

RNA was isolated from phytohemagglutinin-activated T-cell blasts grown in suspension, with the RNaseasy Mini Kit (Qiagen), used according to the manufacturer's instructions. Reverse transcriptase (RT)-PCR was performed with the First Strand complementary DNA (cDNA) Synthesis Kit for RT-PCR (Roche). The resulting cDNA was amplified with specific oligonucleotides, as previously reported (22). The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, excised from the gel and purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). The purified amplification products were sequenced by dideoxynucleotide termination with BigDye terminator kit v3.0 and the PCR primers (Applied Biosystems), in an ABI Prism 3100 apparatus (Applied Biosystems). Primers and conditions are available upon request. Genomic DNA was isolated from whole blood, according to a standard phenol-chloroform procedure, and the *IFNGR1* exons and flanking introns were amplified and sequenced, as reported elsewhere (18,20). Screening for the V63G mutation in the population of Gran Canaria was carried out by PCR amplification for refractory mutations. Primers and conditions are available upon request.

### Founder effect analysis

Founder effect analyses were carried out in a subset of 6 [two Chilean, two Portuguese from mainland Portugal and one Azorean (Portuguese nationality), one Polish] apparently unrelated patients with the I87T mutation and three apparently unrelated patients from Gran Canaria with the V63G mutation. Genotypes were obtained for >900 000 SNPs from the Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0. SNPs with 100% call rates were scanned for continuous stretches of homozygosity up- and downstream from the *IFNGR1* locus on chromosome 6. Pairwise comparisons within each mutation group revealed the limits of the longest shared haplotype and the positions of subsequent recombination breakpoints. The likelihood-based ESTIAGE method (33) was used to estimate the age of the MRCA for each mutation, from the observed shared haplotypes and the recombination rates and haplotype frequencies obtained in the HapMap Project (43).

### Analyses of Y chromosome and mtDNA haplotypes

Hypervariable sequences I and II of mtDNA were sequenced with the primer pairs and PCR conditions used in a previous study (24,44). Sequences were sorted into haplogroups according to the most recent classification (45).

For the analysis of Y chromosome haplotypes, we amplified 16 Y-chromosomal short tandem repeat (STR) loci with the Applied Biosystems Y-filer™ PCR Amplification kit (www.appliedbiosystems.com). STR alleles were named according to current recommendations (46–48).

### IFN- $\gamma$ R1 detection with antibodies

Non-specific binding to monocytes was minimized by the prior incubation of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated whole blood samples with purified mouse IgG1, IgG2a and IgG2b isotype controls (BD Biosciences). After

15 min of incubation, the samples were washed twice and stained with phycoerythrin (PE)-labeled mAbs specific for human IFN- $\gamma$ R1 92101 (R&D Systems), GIR-94 (BD Biosciences), GIR-208 (BD Biosciences) and MMHGR-1 (Caltag Laboratories), the human IFN- $\gamma$ R1-specific fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled mAb BB1E2 (Cytognos) or isotype-matched negative controls (BD Biosciences). Erythrocytes were lysed with Lysing Solution (BD Biosciences), and washed twice. White blood cells were then resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and analyzed by flow cytometry. Monocytes were gated on the basis of forward/side light scattering and positive staining with an allophycocyanin (APC)-labeled mAb directed against human CD14 (BD Biosciences). EBV-B cells were stained by incubation with purified mouse IgG1, IgG2a and IgG2b isotype controls, followed by washing and incubation with PE-labeled 92101, GIR-94 and GIR-208 mAbs, FITC-labeled BB1E2 mAb or isotype-matched negative controls. Purified MMHGR-1 (Biomedical Laboratories) or an isotype-matched negative control was also used for the staining of EBV-B cells. After incubation with these antibodies, cells were washed twice and incubated with biotinylated goat anti-mouse antibody (Caltag Laboratories) and streptavidin-PE (Caltag Laboratories). EBV-B cells and gated monocytes were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer, with CellQuest Pro software (BD Biosciences).

### IFN- $\gamma$ binding assay

PBMCs were obtained from EDTA-treated whole blood by the standard density gradient centrifugation procedure, in Ficoll Hypaque. PBMCs were prepared at a density of  $5 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 (Bio-Whittaker) and 200  $\mu$ l of cell suspension was cultured with medium alone or with variable concentrations of recombinant human IFN- $\gamma$  (rhIFN- $\gamma$ , R&D Systems) for 20 min at 4°C. The samples were washed once with 0.1% sodium azide in PBS, and 0.5 mg/ml purified mouse anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (clone 4S.B3; BD Biosciences) or an isotypic control (purified mouse IgG1, BD Biosciences) was added and incubated with the samples for 30 min at 4°C. Samples were washed twice in calcium- and magnesium-free PBS (Euroclone), and incubated with goat anti-mouse IgG1 biotin conjugate (Caltag Laboratories) for 30 min at 4°C. Finally, samples were washed twice with calcium- and magnesium-free PBS and incubated for 30 min with APC-conjugated anti-human CD14-antibody and PE-conjugated streptavidin. The samples were analyzed with a FACSCalibur cytometer and CellQuest Pro software.

### Phosphorylation of STAT-1 in monocytes in response to IFN- $\gamma$

PBMCs were obtained from EDTA-treated whole blood by density gradient centrifugation. STAT-1 phosphorylation was assessed as previously described (49). As a positive control, cells were incubated with high concentrations of IFN- $\alpha$ . Intracellular labeling was carried out with an Alexa Fluor 488-labeled anti-human STAT-1-pY701 (BD Biosciences) mAb or with the relevant isotypic control. STAT-1 phosphorylation at STAT-1-pY701 was assessed on monocytes

gated on the basis of forward/side light scattering and positive staining with an APC-conjugated antibody against CD14 in a FACSCalibur flow cytometer, with CellQuest Pro software. Antibody binding to monocytes is expressed as MFI.

### Nuclear translocation of STAT-1

EBV-B cells were stimulated for 30 min with  $10^3$  and  $10^5$  IU rhIFN- $\gamma$ /ml or with  $10^5$  IU IFN- $\alpha$ /ml. We quantified the translocation of STAT-1 homodimers to the nucleus and their binding to DNA with the TransAM STAT family kit (Active Motif Europe), used according to the manufacturer's protocol. Briefly, nuclear extracts from rhIFN- $\gamma$ -stimulated EBV-B cell lines were incubated in the wells of ELISA plates coated with oligonucleotides containing a STAT consensus binding site. The wells were then washed and incubated with anti-STAT-1 $\alpha$  antibodies specific for an epitope present only on DNA-bound-activated STAT-1, washed again and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The plates were washed again, a developing solution was added and absorbance was measured at 450 nm.

### Late responses to IFN- $\gamma$ in blood cells

Late events in IFN- $\gamma$ -mediated stimulation were studied in heparin-treated whole-blood cultures. We analyzed the production of IL-12p40 in response to IFN- $\gamma$ , by incubating whole blood with BCG, with or without rhIFN- $\gamma$ , as previously described (50).

For analysis of the induction of CD64 expression in response to IFN- $\gamma$ , whole blood was diluted 1:4 in RPMI 1640 and incubated with medium alone or with various concentrations of rhIFN- $\gamma$  for 24 h at 37°C and under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The erythrocytes were lysed and the cell surface expression of CD64 on blood monocytes was assessed with an FITC-labeled anti-human CD64 mAb (BD Biosciences), by flow cytometry with CellQuest Pro software. Monocytes were gated on the basis of forward/side light scattering and positive staining for CD14 with an APC-CD14 mAb.

The production of IL-12p70 and TNF- $\alpha$  in response to rhIFN- $\gamma$  was assessed in whole blood cultures diluted 1:2 in RPMI 1640 and left unstimulated or stimulated with 100 ng/ml LPS from *S. enteritidis* (Sigma), alone or in combination with various concentrations ( $10^2$ – $10^5$  IU/ml) of rhIFN- $\gamma$ . Supernatants were collected after 24 h of incubation at 37°C under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The production of (IP-10, CXCL10) and (MIG, CXCL9) was assessed in whole blood diluted 1:2 with RPMI 1640 and incubated with medium alone or with various concentrations ( $1$ – $5 \times 10^5$  IU/ml) of rhIFN- $\gamma$  at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants were collected after 24 h.

### Determination of cytokine levels

Levels of IL-12p40 in cultures and of IFN- $\gamma$  in plasma were determined by ELISA, as previously reported (26,50). The levels of TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IP-10 and MIG in cultures were determined with a flow cytometry-based bead array system (BD Biosciences), according to the manufacturer's protocols.

### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

I.S., S.B.-D., J.P., A.C., L.F.-P., Q.B.V., M.C., J.F., M.I.G.-L., J.B., C.P., E.S., X.K., L.J., E.H.-R., L.A. and C.R.-G. performed research and analyzed and interpreted data. E.C., A.F., C.N., S.B., E.F., P.R., A.C., A.F., S.H., K.A., M.V.-L., J.G.-M., L.S., J.M.G.-C., J.C. and J.L.P.-A. were responsible for the clinical evaluation of the patients and also collected data. J.-L.C. and C.R.-G. designed the research, analyzed and interpreted data and wrote the manuscript.

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the patients and their families for their trust. We are highly indebted to Lluís Quintana-Murci for help with founder effect analysis, and to Yanira Florido and Ayoze García-Saavedra for technical assistance.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

### FUNDING

This work was supported by grants from the Institute of Health Carlos III, Ministry of Health (RedRespira-ISCiii-RTIC-03/11, FIS 06/1031, with the funding of European Regional Development Fund-European Social Fund—FEDER-FSE); *Fundación Canaria de Investigación y Salud* (Canarian Government, INREDCAN 05/06); Research Prize of Foundation Caja Rural de Canarias-Chil y Naranjo 2004; Canarian Institute for Cancer Research (ISCiii-RTICCC-C03/10 to M.C.); *Proyecto Biorregion 2006* to M.I.G.-L.; and Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (fellowship to E.H.-R.). J.-L.C. was an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. The sponsors of the study had no role in designing the study, collecting, analyzing and interpreting the data, or writing the paper.

### REFERENCES

1. Casanova, J.L. and Abel, L. (2007) Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science*, **317**, 617–619.
2. Casanova, J.L. and Abel, L. (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 581–620.
3. Rosenzweig, S.D. and Holland, S.M. (2005) Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol. Rev.*, **203**, 38–47.
4. Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Chappier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Feinberg, J., Jouanguy, E., Boisson-Dupuis, S., Fieschi, C., Picard, C. *et al.* (2006) Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin. Immunol.*, **18**, 347–361.
5. Alcais, A., Fieschi, C., Abel, L. and Casanova, J.L. (2005) Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J. Exp. Med.*, **202**, 1617–1621.
6. Vogt, G., Bustamante, J., Chappier, A., Feinberg, J., Boisson Dupuis, S., Picard, C., Mahlaoui, N., Gineau, L., Alcais, A. and Lamaze, C. (2008) Complementation of a pathogenic IFNGR2 misfolding mutation with modifiers of N-glycosylation. *J. Exp. Med.*, **205**, 1729–1737.

7. de Beaucoudrey, L., Puel, A., Filipe-Santos, O., Cobat, A., Ghandil, P., Chrabieh, M., Feinberg, J., von Bernuth, H., Samarina, A., Janniére, L. *et al.* (2008) Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. *J. Exp. Med.*, **205**, 1543–1550.
8. Chapgier, A., Kong, X.F., Boisson-Dupuis, S., Jouanguy, E., Averbuch, D., Feinberg, J., Zhang, S.Y., Bustamante, J., Vogt, G., Lejeune, J. *et al.* (2009) A partial form of recessive STAT1 deficiency in humans. *J. Clin. Invest.*, **119**, 1502–1514.
9. Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaa, S., Yang, K., Chappier, A., Eidenschen, C., Eid, P. *et al.* (2003) Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat. Genet.*, **33**, 388–391.
10. Kong, X.F., Ciancanelli, M., Al-Hajjar, S., Alsina, L., Zumwalt, T., Bustamante, J., Feinberg, J., Audry, M., Prando, C., Bryant, V. *et al.* (2010) A novel form of human STAT1 deficiency impairing early but not late responses to interferons. *Blood*, **116**, 5895–5906.
11. Döffinger, R., Smahi, A., Bessia, C., Geissmann, F., Feinberg, J., Durandy, A., Bodemer, C., Kenwick, S., Dupuis-Girod, S., Blanche, S. *et al.* (2001) X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat. Genet.*, **27**, 277–285.
12. Newport, M.J., Huxley, C.M., Huston, S., Hawrylowicz, C.M., Oostra, B.A., Williamson, R. and Levin, M. (1996) A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl. J. Med.*, **335**, 1941–1949.
13. Jouanguy, E., Altare, F., Lamhamedi, S., Revy, P., Emile, J.F., Newport, M., Levin, M., Blanche, S., Seboun, E., Fischer, A. *et al.* (1996) Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N. Engl. J. Med.*, **335**, 1956–1961.
14. Dorman, S.E., Picard, C., Lammass, D., Heyne, K., van Dissel, J.T., Baretto, R., Rosenzweig, S.D., Newport, M., Levin, M., Roesler, J. *et al.* (2004) Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet*, **364**, 2113–2121.
15. Holland, S.M., Dorman, S.E., Kwon, A., Pitha-Rowe, I.F., Frucht, D.M., Gerstberger, S.M., Noel, G.J., Vesterhus, P., Brown, M.R. and Fleisher, T.A. (1998) Abnormal regulation of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor-alpha in human interferon-gamma receptor 1 deficiency. *J. Infect. Dis.*, **178**, 1095–1104.
16. Roesler, J., Kofink, B., Wendisch, J., Heyden, S., Paul, D., Friedrich, W., Casanova, J.L., Leupold, W., Gahr, M. and Rosen-Wolff, A. (1999) *Listeria monocytogenes* and recurrent mycobacterial infections in a child with complete interferon-gamma-receptor (IFNgammaR1) deficiency: mutational analysis and evaluation of therapeutic options. *Exp. Hematol.*, **27**, 1368–1374.
17. Altare, F., Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Fondaneche, M.C., Fizace, C., Ribierre, F., Merlin, G., Dembic, Z., Schreiber, R., Lisowska-Grosppierre, B. *et al.* (1998) A causative relationship between mutant IFNgR1 alleles and impaired cellular response to IFNgamma in a compound heterozygous child. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 723–726.
18. Jouanguy, E., Dupuis, S., Pallier, A., Doffinger, R., Fondaneche, M.C., Fieschi, C., Lamhamedi-Cherradi, S., Altare, F., Emile, J.F., Lutz, P. *et al.* (2000) In a novel form of IFN-gamma receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN-gamma. *J. Clin. Invest.*, **105**, 1429–1436.
19. Kong, X.F., Vogt, G., Chappier, A., Lamaze, C., Bustamante, J., Prando, C., Fortin, A., Puel, A., Feinberg, J., Zhang, X.X. *et al.* (2010) A novel form of cell type-specific partial IFN-gammaR1 deficiency caused by a germ line mutation of the IFNGR1 initiation codon. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 434–444.
20. Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Altare, F., Fondaneche, M.C., Tuerlinckx, D., Blanche, S., Emile, J.F., Gaillard, J.L., Schreiber, R., Levin, M. *et al.* (1997) Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoïd bacillus Calmette-Guérin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2658–2664.
21. Remiszewski, P., Roszkowska-Sliz, B., Winek, J., Chappier, A., Feinberg, J., Langfort, R., Bestry, I., Augustynowicz-Kopec, E., Ptak, J., Casanova, J.L. *et al.* (2006) Disseminated *Mycobacterium avium* infection in a 20-year-old female with partial recessive IFNgammaR1 deficiency. *Respiration*, **73**, 375–378.
22. Allende, L.M., Lopez-Goyanes, A., Paz-Artal, E., Corell, A., Garcia-Perez, M.A., Varela, P., Scarpellini, A., Negreira, S., Palenque, E. and Arnaiz-Villena, A. (2001) A point mutation in a domain of gamma interferon receptor 1 provokes severe immunodeficiency. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 133–137.
23. Fregel, R., Betancor, E., Suárez, N.M., Cabrera, V.M., Pestano, J., Larruga, J.M. and González, A.M. (2009) Temporal evolution of the ABO allele frequencies in the Canary Islands: the impact of the European colonization. *Immunogenetics*, **61**, 603–610.
24. Maca-Meyer, N., Armay, M., Rando, J.C., Flores, C., Gonzalez, A.M., Cabrera, V.M. and Larruga, J.M. (2004) Ancient mtDNA analysis and the origin of the Guanches. *Eur. J. Hum. Genet.*, **12**, 155–162.
25. Fregel, R., Gomes, V., Gusmao, L., Gonzalez, A.M., Cabrera, V.M., Amorim, A. and Larruga, J.M. (2009) Demographic history of Canary Islands male gene-pool: replacement of native lineages by European. *BMC Evol. Biol.*, **9**, 181.
26. Fieschi, C., Dupuis, S., Picard, C., Smith, C.I., Holland, S.M. and Casanova, J.L. (2001) High levels of interferon gamma in the plasma of children with complete interferon gamma receptor deficiency. *Pediatrics*, **107**, E48.
27. Rottman, M., Soudais, C., Vogt, G., Renia, L., Emile, J.F., Decaluwe, H., Gaillard, J.L. and Casanova, J.L. (2008) IFN-gamma mediates the rejection of haematopoietic stem cells in IFN-gammaR1-deficient hosts. *PLoS Med.*, **5**, e26.
28. Dupuis, S., Doffinger, R., Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., Jouanguy, E., Abel, L. and Casanova, J.L. (2000) Human interferon-gamma-mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion. *Immunol. Rev.*, **178**, 129–137.
29. Doffinger, R., Jouanguy, E., Dupuis, S., Fondaneche, M.C., Stephan, J.L., Emile, J.F., Lamhamedi-Cherradi, S., Altare, F., Pallier, A., Barcenas-Morales, G. *et al.* (2000) Partial interferon-gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with bacille Calmette-Guérin and *Mycobacterium abscessus* infection. *J. Infect. Dis.*, **181**, 379–384.
30. Rosenzweig, S.D., Dorman, S.E., Uzel, G., Shaw, S., Scurlock, A., Brown, M.R., Buckley, R.H. and Holland, S.M. (2004) A novel mutation in IFN-gamma receptor 2 with dominant negative activity: biological consequences of homozygous and heterozygous states. *J. Immunol.*, **173**, 4000–4008.
31. Dorman, S.E., Uzel, G., Roesler, J., Bradley, J.S., Bastian, J., Billman, G., King, S., Filie, A., Schermerhorn, J. and Holland, S.M. (1999) Viral infections in interferon-gamma receptor deficiency. *J. Pediatr.*, **135**, 640–643.
32. Roesler, J., Hedrich, C., Laass, M.W., Heyne, K. and Rosen-Wolff, A. (2010) Meningoencephalitis caused by varicella-zoster virus reactivation in a child with dominant partial interferon-gamma receptor-1 deficiency. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, in press.
33. Genin, E., Tullio-Pelet, A., Begeot, F., Lyonnet, S. and Abel, L. (2004) Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J. Med. Genet.*, **41**, 445–449.
34. van de Wetering, D., de Paus, R.A., van Dissel, J.T. and van de Vosse, E. (2010) Functional analysis of naturally occurring amino acid substitutions in human IFN-gammaR1. *Mol. Immunol.*, **47**, 1023–1030.
35. Walter, M.R., Windsor, W.T., Nagabhushan, T.L., Lundell, D.J., Lunn, C.A., Zaudny, P.J. and Narula, S.K. (1995) Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature*, **376**, 230–235.
36. Thiel, D.J., le Du, M.H., Walter, R.L., D'Arcy, A., Chene, C., Fountoulakis, M., Garotta, G., Winkler, F.K. and Ealick, S.E. (2000) Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex. *Structure*, **8**, 927–936.
37. Randal, M. and Kossiakoff, A.A. (2001) The structure and activity of a monomeric interferon-gamma:alpha-chain receptor signaling complex. *Structure*, **9**, 155–163.
38. Rose, G.D., Fleming, P.J., Banavar, J.R. and Maritan, A. (2006) A backbone-based theory of protein folding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 16623–16633.
39. Roesler, J., Horwitz, M.E., Picard, C., Bordigoni, P., Davies, G., Koscielniak, E., Levin, M., Veys, P., Reuter, U., Schulz, A. *et al.* (2004) Hematopoietic stem cell transplantation for complete IFN-gamma receptor 1 deficiency: a multi-institutional survey. *J. Pediatr.*, **145**, 806–812.
40. Chantrain, C.F., Bruwier, A., Brichard, B., Largent, V., Chapgier, A., Feinberg, J., Casanova, J.L., Stalens, J.P. and Vermynen, C. (2006) Successful hematopoietic stem cell transplantation in a child with active disseminated *Mycobacterium fortuitum* infection and interferon-gamma receptor 1 deficiency. *Bone Marrow Transplant.*, **38**, 75–76.

41. de Beaucoudrey, L., Samarina, A., Bustamante, J., Cobat, A., Boisson-Dupuis, S., Feinberg, J., Al-Muhsen, S., Janni re, L., Rose, Y., de Suremain, M. *et al.* (2010) Revisiting human IL-12R $\beta$ 1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine*, **89**, 381–402.
42. C ardenes, M., Angel-Moreno, A., Fieschi, C., Sologuren, I., Colino, E., Molines, A., Garcia-Laorden, M.I., Campos-Herrero, M.I., Andujar-Sanchez, M., Casanova, J.L. *et al.* (2010) Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R beta 1 deficiency. *J. Med. Genet.*, **47**, 635–637.
43. Frazer, K.A., Ballinger, D.G., Cox, D.R., Hinds, D.A., Stuve, L.L., Gibbs, R.A., Belmont, J.W., Boudreau, A., Hardenbol, P., Leal, S.M. *et al.* (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, **449**, 851–861.
44. Casas, M.J., Hagelberg, E., Fregel, R., Larruga, J.M. and Gonzalez, A.M. (2006) Human mitochondrial DNA diversity in an archaeological site in al-Andalus: genetic impact of migrations from North Africa in medieval Spain. *Am. J. Phys., Anthropol.*, **131**, 539–551.
45. van Oven, M. and Kayser, M. (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.*, **30**, E386–E394.
46. Gusmao, L., Butler, J.M., Carracedo, A., Gill, P., Kayser, M., Mayr, W.R., Morling, N., Prinz, M., Roewer, L., Tyler-Smith, C. *et al.* (2006) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.*, **157**, 187–197.
47. Roewer, L., Croucher, P.J., Willuweit, S., Lu, T.T., Kayser, M., Lessig, R., de Knijff, P., Jobling, M.A., Tyler-Smith, C. and Krawczak, M. (2005) Signature of recent historical events in the European Y-chromosomal STR haplotype distribution. *Hum. Genet.*, **116**, 279–291.
48. Willuweit, S. and Roewer, L. (2007) Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **1**, 83–87.
49. Fleisher, T.A., Dorman, S.E., Anderson, J.A., Vail, M., Brown, M.R. and Holland, S.M. (1999) Detection of intracellular phosphorylated STAT-1 by flow cytometry. *Clin. Immunol.*, **90**, 425–430.
50. Feinberg, J., Fieschi, C., Doffinger, R., Feinberg, M., Leclerc, T., Boisson-Dupuis, S., Picard, C., Bustamante, J., Chapgier, A., Filipe-Santos, O. *et al.* (2004) Bacillus Calmette Guerin triggers the IL-12/IFN-gamma axis by an IRAK-4- and NEMO-dependent, non-cognate interaction between monocytes, NK, and T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 3276–3284.
51. Hall, T. (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**, 95–98.
52. Hunter, P.R. and Nichols, G. (2002) Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 145–154.
53. Ochs, H.D., Smith, C.I.E. and Puck, J.M. (2006) *Primary Immunodeficiency Diseases. A Molecular and Genetic Approach*. Second edn. Oxford University Press, New York, NY.
54. Theodos, C.M., Sullivan, K.L., Griffiths, J.K. and Tzipori, S. (1997) Profiles of healing and nonhealing *Cryptosporidium parvum* infection in C57BL/6 mice with functional B and T lymphocytes: the extent of gamma interferon modulation determines the outcome of infection. *Infect. Immun.*, **65**, 4761–4769.
55. Hayward, A.R., Chmura, K. and Cosyns, M. (2000) Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J. Infect. Dis.*, **182**, 1001–1004.

## Patients

Patients I.1, I.2, II.1, III.1 and IV.1 were born in Gran Canaria (Spain), to four unrelated families of non consanguineous parents.

Patient I.1 presented urinary infection and omphalitis caused by *Klebsiella pneumoniae* at the age of five days. At the age of five years and six months, he presented chicken pox, which followed an unremarkable course. Three months later, he suffered from aseptic meningitis, which resolved without treatment. At the age of 16 years, a CT scan showed a large mediastinal mass, leading to surgical resection of mid-pulmonary lobe and partial pericardiectomy. Six months later the patient presented vertebral osteomyelitis, followed four months later by retroperitoneal lymphadenopathies and a new mediastinal mass requiring surgical intervention. Lymph nodes contained well delimited paucibacillary epithelioid granulomas containing giant cells. No mycobacteria were cultured. The patient responded well to antimycobacterial treatment with rifampicin (six months), isoniazid (six months) and pyrazinamide (four months).

A brother of patient I.1 (patient I.2) had uneventful chicken pox at the age of two years and gastroenteritis caused by *Shigella sonnei* at the age of three years. At the age of four years, he developed pneumonia of unknown etiology that was controlled with amoxicillin. At the age of six years he was admitted to hospital with laterocervical lymphadenopathies, which had persisted for one to two years and were excised surgically. A Mantoux test was negative. At the age of 21 years, the patient was treated prophylactically with isoniazid for six months, following the diagnosis of mycobacterioses in his brother (patient I.1). Seven months after the end of isoniazid treatment, he was admitted to hospital with right hip and lumbar pain of five months' duration. Multifocal osteomyelitis was diagnosed on the basis of CT scan and gammagraphy. Histological examination of bone marrow aspirates revealed multiple histiocytes and visible acid-fast bacilli (Ziehl-Neelsen staining). Cultures of bone marrow biopsy specimens and biological fluids (sputum, blood, urine) were negative for mycobacteria. The infection resolved after antimycobacterial treatment with isoniazid, pyrazinamide, rifampicin, clarithromycin, and amikacin for 18 months. Patients I.1 and I.2 are now doing well at the ages of 27 years and 31 years, respectively, without prophylactic treatment.

Tests of IFN- $\gamma$  production in response to *M. tuberculosis* peptides (Quantiferon®-TB Gold, Cellestis) were negative for patients I.1 and I.2, despite normal levels of IFN- $\gamma$  production in response to phytohemmagglutinin and IL-12, suggesting probable infection with non tuberculous EM.



Patient II.1 suffered from bronchiolitis due to respiratory syncytial virus at the age of one month, and an episode of gastroenteritis caused by *Cryptosporidium spp.* at the age of 37 months, with an unremarkable course. Between the ages of four months and 47 months, she suffered from eight episodes of acute respiratory failure, at least six of which were associated with airway infections. In one episode (at the age of four months) *Haemophilus influenzae* was cultured from bronchial aspirates. In the last two episodes, she was treated with intravenous (IV) methylprednisolone and IV hydrocortisone, followed by two months of montelukast sodium. Between the ages of four years and one month and four years and eight months, she presented six episodes of erythema nodosum. At this age, large laterocervical lymphadenopathies were observed and, three months later, the patient presented with retroperitoneal and mesenteric lymphadenopathies and a positive Mantoux test (>25 mm, necrotic). No serum IgG antibodies against mycobacterial antigen 60 (A60) were detected. Multiple cultures of lymph node biopsy specimens and biological fluids (sputum, blood, urine, gastric juice) were negative for mycobacteria. No acid-fast bacilli were observed on Ziehl-Neelsen staining of a laterocervical lymph node with a reactive, nonspecific infiltrate. Tuberculosis was suspected and the patient was treated with rifampicin, isoniazid and pyrazinamide. After one year on antimycobacterial treatment with no clinical improvement, high levels of serum IgG against A60 were observed (1200 IU/ml). The patient underwent immunological analysis, and IFN- $\gamma$ R1 deficiency was diagnosed. A multiresistant strain of *M. abscessus* was subsequently cultured from a lymph node. The patient was treated with amikacin, clarithromycin, linezolid and subcutaneous IFN- $\gamma$  (50  $\mu$ g/m<sup>2</sup> three times weekly) for two months, with a rapid clinical and echographic response, but the treatment was stopped due to toxicity problems. The patient was doing well without prophylaxis when, at the age of 10 years and 2 months, she presented lymphadenopathies and diarrhea, several episodes of erythema nodosum and high serum concentrations of IgG against A60 (up to 1768 IU/ml). Cultures of blood, sputum and urine were negative. The patient responded well to clarithromycin and linezolid treatment, which again had to be stopped after two months due to anemia, headaches and photosensitivity. This episode may have been a recurrence due to the short course of antimycobacterial treatment. The patient was doing well at the age of 12 years when she suffered from septic shock due to *S. enteritidis*. She is now healthy, at the age of 14 years, without prophylactic treatment.

Patient III.1 was admitted to hospital at the age of 22 months for swelling and pain in the left ankle of two months' duration. Magnetic resonance imaging and gammagraphy results were normal. At

the age of 33 months, the patient presented swelling of the left forearm. Multifocal osteomyelitis was diagnosed, and cultures of sputum, bone and gastric juice were positive for *M. avium*. The patient was treated with ethambutol, rifabutin, ciprofloxacin and clarithromycin for 24 months. He is now healthy at the age of six years and three months, with no prophylaxis. Serological analyses at the age of 33 months detected IgG antibodies against Epstein-Barr virus and human herpes virus 8, together with IgM, but not IgG, antibodies against cytomegalovirus.

Patient IV.1 was admitted to hospital at the age of six years and 11 months, for abdominal and lumbar pain of six days' duration. He had no fever or other clinical signs of inflammation, and no abnormalities were observed on lumbar MRI scans. The patient was discharged because he responded well to anti-inflammatory drugs (ibuprofen). Two months later, he presented dorsolumbar and abdominal pain, an erythrocyte sedimentation rate (ESR) of 73 mm during the first hour, mild neutrophilia (8400 polymorphonuclear neutrophils-PMN-/mm<sup>3</sup>, 66.5% leukocytes), a C-reactive protein (CRP) concentration of 30.7 mg/l and no fever. The Mantoux test was positive (7 mm). Vertebral flattening at D12, surrounded by a moderate mass of soft tissue suggestive of Langerhans cell histiocytosis, was documented on CT-scans and MRI. The patient underwent arthrodesis, and *M. avium* was cultured from the biopsy specimen. Cultures of sputum, gastric juice, blood and urine were negative. The patient was treated with ethambutol, rifabutin, ciprofloxacin and clarithromycin. Immunological analysis was requested, but the patient died four days later, at the age of seven years and two months, due to septic shock complicated by an acute respiratory distress syndrome and multiorgan dysfunction syndrome. Temperature and inflammatory markers, such as CRP concentration (up to 220.7 mg/l), leukocytosis (up to 25,900 leukocytes/mm<sup>3</sup>, 64% PMN) and fibrinogen (maximum 715.77 mg/dl) increased during the patient's stay in hospital.

Previously, at the age of 12 months, he had suffered from long-term (19 days) acute gastroenteritis with chronic diarrhea of unknown etiology. At the age of 23 months, he consulted for fever (40° C) with diarrhea and pain in the right hip, right knee and right hand. He had an ESR of 83 mm/h, leukocytosis (21,100 leukocytes/mm<sup>3</sup>, 58% PMN) and a serum CRP level of 110 mg/l. No abnormalities were observed on X ray or ultrasound scans and he was diagnosed with juvenile chronic arthritis. At the age of 34 months, he suffered pain in the left hip and at the age of 41 months, he presented lumbar pain. Microbiological cultures of blood, stools and urine were negative, but no cultures for mycobacteria were carried out.

Patient V.1 was born to second-degree cousins in Chile. He was vaccinated with BCG on the first day of life. At the age of four months, an axillary adenopathy was noticed. At the age of 11 months, the patient suffered a febrile syndrome lasting one month and hepatosplenomegaly. A spleen biopsy showed a granulomatous reaction with positive Ziehl-Neelsen and Kinyoun staining. Cultures from the spleen and liver were negative. The Mantoux test was positive. PCR from a liver biopsy with primers to detect IS6110 insertion elements was positive, indicating infection with a bacterium of the *M. tuberculosis* complex, probably BCG. Antimycobacterial treatment was administered for 18 months, with isoniazid, rifampin and pyrazinamide, with a good clinical outcome. The patient suffered from molluscum contagiosum at the age of seven years. He is now doing well at the age of eight years and six months, in the absence of prophylaxis.

Patient VI.1 was born to first-cousin Portuguese parents. She was vaccinated with BCG in the first days of life, and at the age of 14 weeks she was admitted to Coimbra Pediatric Hospital for disseminated BCG disease. She presented with a left axillary adenopathy, and abdominal ultrasound indicated homogeneous hepatomegaly without nodules or peritoneal effusion. A liver biopsy specimen revealed granulomatous inflammation with massive mycobacterial infiltration, and cultures were positive for *Mycobacterium bovis*. No coagulation or liver enzyme abnormalities were observed. Tritherapy with rifampicin, isoniazid and pyrazinamide was initiated, with little improvement in clinical status. Nine days later, streptomycin was added and a decrease in the size of the left axillary adenopathy and inflammatory signs was observed. After 11 months on treatment, cultures from axillary lymph nodes no longer tested positive. The patient was also treated with IFN- $\gamma$  until the age of two years. At the age of five years, she is doing well on rifampicin, ethambutol and clarithromycin. She has two healthy brothers.

Patient VII.1 was born to non consanguineous parents in Chile. He was vaccinated with BCG on the second day of life. At the age of seven months, he developed axillary lymphadenitis leading to the culture of BCG. He was treated with isoniazid, which was later withdrawn because it was not well tolerated by this patient. Clinical status worsened and X-ray analysis revealed osteolytic lesions in the ribs and femur, whilst cerebral CT-scans showed nodular lesions. Biopsy specimens from the femur and rib were negative for mycobacteria (Ziehl-Neelsen staining). A brain biopsy showed poorly defined granulomas and positive Kinyoun staining. The patient was treated with streptomycin, isoniazid, ethambutol and rifampicin, but new cerebral granulomas developed during the second week of treatment. IFN- $\gamma$  treatment was initiated, but with no clinical response. At the age of two years and eight months,

cultures from an open scalp wound and a lung lesion were positive for multidrug-resistant BCG. He was treated with isoniazid, ethambutol, azithromycin, linezolid, levofloxacin and clofazamine. IFN-g was also introduced, with little improvement until the addition of IFN- $\alpha$  to the regimen. The patient, now aged five years and six months, is doing well on azithromycin, levofloxacin and IFN- $\gamma$ .

Patient VIII.1 was born to non consanguineous parents in Chile. She was vaccinated with BCG at the second day of life. At the age of five months, imaging studies showed multiple osteolytic lesions (right tibia, both femurs, sacroiliac region and skull). The patient also had axillary and cervical adenitis. MRI of the entire spinal column showed involvement of the lumbar spine, back and neck, and the patient later presented left arm monoparesis with functional impotence of the neck, which progressed favorably. Brain MRI showed a mass in the occipital region of the cranium in contact with the cerebral cortex. A biopsy of the right tibia and left femur showed positive Ziehl-Neelsen staining. Cultures were negative but PCR was positive for *M. bovis*. At the age of 26 months, the patient is currently treated with isoniazid, ciprofloxacin, rifampicin, ethambutol and rhIFN- $\gamma$ , and her clinical status is gradually improving.

Patient IX.1 was born to first degree cousins from the Azores (Portugal). He was vaccinated with BCG at the age of two days. At the age of two months, he developed axillary lymphadenitis with an extensive area of ulceration and necrosis. Treatment with isoniazid, ethambutol and rifampicin was initiated at the age of six months. A granuloma emerged on the anterior left side of the thorax while on maintenance treatment with isoniazid and rifampicin, and Streptomycin and ethambutol were added, with a good clinical outcome. At the age of seven years, the patient developed pneumonia with effusion of unknown etiology that was controlled with ampicillin. An extensive nasal and sinusal polyposis emerged, which was responsive to steroids. At the age of eight years and three months, the patient suffered *Toxoplasma* encephalitis, which responded to treatment. He is now doing well, at the age of eight years and eleven months, on pyrimethamine and clindamycin.

A sister of patient IX.1 (patient IX.2) was not vaccinated with BCG. At the age of two months she was admitted to hospital for severe gastroenteritis. Cultures of stools and blood were positive for *Salmonella spp.*, and she was treated with ampicillin for five days. Two days later she was admitted again with gastroenteritis due to *Salmonella spp.*, which was controlled with ceftriaxone. She is doing well at the age of three years and eight months in the absence of prophylaxis.

Patients X.1 and X.2 have been reported elsewhere (20). They were born to consanguineous Portuguese parents. Patient X.1 was vaccinated with BCG at one month of age and rapidly developed disseminated BCG infection. Skin and lymph node granulomas were tuberculoid. He responded well to appropriate antimycobacterial therapy. At the age of six years, he was diagnosed with disseminated *Salmonella enteritidis* infection, which responded to treatment with amoxicillin. He had two episodes of pneumonitis thought to be due to a *Legionella* species and *Mycoplasma pneumoniae* (at the age of 12 years), based on positive specific serology tests.

His sister (patient X.2) was not vaccinated with BCG. At the age of three years, she developed a persistent cough with fatigue, anorexia and erythema nodosum. A chest X ray showed a lung infiltrate. Cultures were negative and she was diagnosed with clinical tuberculosis, which responded well to antituberculous drugs (rifampicin, isoniazid and ethambutol) but poorly to common antibiotics. A few weeks after her brother, at the age of six years, she also suffered from pneumonitis typical of *M. pneumoniae* infection, which was confirmed by specific antibody responses.

Both patients are doing well at the ages of 28 years and 22 years, respectively, with no antibiotic prophylaxis.

Patient XI.1 has been described elsewhere (21). She was born to healthy, unrelated parents, in Poland. She was vaccinated with BCG in infancy, without complications. She was healthy until the age of 20 years, when she presented fever, diffuse bone pain and general fatigue. A massive infiltration of the left iliac bone was observed and histological examination led to the diagnosis of Langerhans cell histiocytosis, which was treated with steroids, etoposide and cyclosporine A. Eight months later, multifocal osteomyelitis with brain and lung infiltration by acid-fast bacilli was found. The patient was treated in accordance with the results of susceptibility tests, with rifampicin, isoniazid and streptomycin, with the maintenance of corticosteroids, but her condition continued to worsen. After one month, *M. avium* was cultured from sputum and cutaneous pus. Two months later, the antimycobacterial drugs administered were changed to amikacin, rifabutin, cycloserine and clofazimine. One year later, following spondylodiosis, brain lesions progressed and treatment with rifabutin, clarithromycin, clofazimine and cotrimoxazole was initiated, with the addition of IFN- $\gamma$  (50  $\mu$ g/m<sup>2</sup> three times weekly). This patient is now 29 years old and no new infectious episodes have occurred in the absence of prophylaxis.





The sequences of the control region (HVI and HVII) of the samples were compared with the reference sequence (Anderson, NC 001807.2 GenBank). Only the variant alleles for each haplotype are shown.

<sup>a</sup>Haplogroup H is very common in Europe (56-61), but it is also found at high frequency in North Africa (62), and it has been observed in the indigenous population of the Canary Islands (63,64). The H haplotype, containing the 16260T SNP, has been identified as a founder haplotype in the modern population of the Canary Islands (2.2%), based on its distribution in these islands (65). Moreover, haplotype 16260T has been found in natives of the Canary Islands (3.3 - 16%), confirming its pre-Hispanic origin (63,64). By contrast, this haplotype has been detected only once in the Iberian peninsula, in an screening of more than 1000 samples (66).

<sup>b</sup>The subhaplogroup L3e is very common in Bantu-speaking Sub-Saharan populations (67). The presence of L3e in the Canary Islands may be related to the slave trade that took place after the conquest of the islands by the Spanish and the Portuguese (65,66). However, a pre-Hispanic origin cannot be excluded, despite the lack of detection of this subhaplogroup to date in present-day North Africans (62) and natives of the Canary Islands (63,64).



<sup>4</sup>Haplogroup J is common in both Europe and North Africa (6%) (56-61). Haplogroup J containing the 16069 T and 16126 C variants, is common in the Canary Islands (65), the Iberian peninsula (56-61) and North Africa (62) and in natives of the Canary Islands (63,64). However, haplogroup J containing the variants 16069 T, 16126 C and 16145 A has been found only in present-day Canarians (65), but not in the Iberian peninsula.<sup>69</sup> It may therefore be of pre-Hispanic origin, although it has not been found in indigenous populations from the Canary Islands (63,64).

<sup>4</sup>Haplogroup K is common in West Eurasia and North Africa, with a mean frequency of 6%. The most frequent subhaplotype, containing 16224 C and 16311 C, has been found in the Iberian peninsula (56-61), North Africa (62) and in individuals indigenous to the Canary Islands (63). However, the 16168 T 16224 C 16311 C subhaplotype has not been observed in present-day Canarians, North Africa, the indigenous population or the Iberian Peninsula.

<sup>4</sup>Haplogroup L1 is common in Sub-Saharan Africans (67). The subhaplogroup L1b subhaplogroup is common in West Africa, Mauritania, Argyl and Egypt, and in Gran Canaria and El Hierro in the Canary Islands (65). Like haplogroup L3e, the presence of L1b in Canarias may be related to the slave trade (66). However, L1b has also been found in the indigenous population of the Canary Islands, probably due to Sub-Saharan influence on North African populations. Its presence in present-day Canarians may, therefore, also reflect a pre-Hispanic origin (63,64).

**Supplementary Table 2.** Y chromosome haplotypes for male patients homozygous for the *IFNGRI* V63G mutation and their relatives.

| SUBJECT            | POLYMORPHIC VARIANTS |           |          |            |          |         |          |          |          |          |          |          |             |          | HAPLOGROUP |          |                              |
|--------------------|----------------------|-----------|----------|------------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|----------|------------|----------|------------------------------|
|                    | B_DYS456             | B_DYS389I | B_DYS390 | B_DYS389II | B_DYS458 | B_DYS19 | B_DYS385 | B_DYS393 | B_DYS391 | B_DYS439 | B_DYS635 | B_DYS392 | R_Y_GATA_H4 | R_DYS437 |            | R_DYS438 | R_DYS448                     |
| <b>Kindred I</b>   |                      |           |          |            |          |         |          |          |          |          |          |          |             |          |            |          |                              |
| Patient I.1        | 15                   | 14        | 22       | 31         | 16       | 14      | 13/14    | 12       | 10       | 11       | 24       | 12       | 27          | 15       | 9          | 20       | J2a1b (99.1%) <sup>a,b</sup> |
| Patient I.2        | 15                   | 14        | 22       | 31         | 16       | 14      | 13/14    | 12       | 10       | 11       | 24       | 12       | 27          | 15       | 9          | 20       | J2a1b (99.1%)                |
| Father             | 15                   | 14        | 22       | 31         | 16       | 14      | 13/14    | 12       | 10       | 11       | 24       | 12       | 27          | 15       | 9          | 20       | J2a1b (99.1%)                |
| <b>Kindred II</b>  |                      |           |          |            |          |         |          |          |          |          |          |          |             |          |            |          |                              |
| Father             | 15                   | 13        | 24       | 29         | 16       | 14      | 11/14    | 13       | 11       | 12       | 23       | 13       | 27          | 15       | 12         | 19       | R1b (100%) <sup>c</sup>      |
| <b>Kindred III</b> |                      |           |          |            |          |         |          |          |          |          |          |          |             |          |            |          |                              |
| Father             | 14                   | 12        | 25       | 29         | 16       | 15      | 13/17,1  | 12       | 10       | 11       | 23       | 11       | 27          | 16       | 9          | 19       | J2b (100%) <sup>a</sup>      |
| <b>Kindred IV</b>  |                      |           |          |            |          |         |          |          |          |          |          |          |             |          |            |          |                              |
| Father             | 17                   | 13        | 24       | 30         | 15       | 13      | 16/17    | 13       | 10       | 11       | 22       | 11       | 27          | 14       | 10         | 19       | E1b1b (100%) <sup>d</sup>    |
| Brother            | 17                   | 13        | 24       | 30         | 15       | 13      | 16/17    | 13       | 10       | 11       | 22       | 11       | 27          | 14       | 10         | 19       | E1b1b (100%)                 |

The number of repeats is shown for each allele. <sup>a</sup>The percentage indicates the probability of the assigned haplotype for each individual, based on the predictions of Haplogroup Predictor software (<http://www.hprg.com/hapest5/>).

<sup>b</sup>Haplogroup J2 (subhaplogroups J2a1b and J2b) is frequent in the Iberian peninsula (7%) and in North-East Africa (4%) (68,69). It has not been observed in the indigenous population of the Canary Islands (70), and its presence in the Canary Islands (71) is therefore thought to be due to colonizers from the Iberian Peninsula. Due to the relatively small number of samples from indigenous Canarians analyzed (70), the presence of this haplogroup, at low frequency, in this population cannot be ruled out.

<sup>c</sup>Haplogroup R1 (subhaplogroups R1a and R1b) is very frequent in Europe, where R1b1b2 (R-M269) is the most frequent subhaplogroup (60% in the Iberian peninsula) (69). The frequency of this subhaplogroup is much lower in North African populations (10%) (68), and its presence in present-day Canarians is considered to be due to Iberian colonizers (71). However, a pre-Hispanic origin cannot be ruled out as this haplotype has been detected at low frequency in the indigenous Canarian population (70).

<sup>d</sup>Haplogroup E1b1b, and the most frequent subhaplogroup (E-M35), are common in both North and South African populations (71,72). The subhaplogroups E1b1b1a (E-M78) and E1b1b1b (E-M81) have been observed in the current population of the Canary Islands (71). The high

frequencies of these subhaplogroups in natives of the Canary Islands (23% and 27% respectively) (70), suggest a pre-Hispanic heritage. However, both subhaplogroups are also present in the Iberian Peninsula (2% and 5% for subhaplogroups E-M78 and E-M81, respectively) (69), suggesting that an Iberian origin is also possible.

**Supplementary Table 3. IFN- $\gamma$ R1 expression on EBV-B cells from patients homozygous for the V63G or I87T mutations and from healthy controls**

| Monoclonal antibody | <i>Mean fluorescence intensity<sup>a</sup></i> |                     |                     | <i>p-value<sup>b</sup></i> |                   |               |
|---------------------|--|---------------------|---------------------|----------------------------|-------------------|---------------|
|                     | Healthy Controls (N=2)                         | I87T Patients (N=5) | V63G Patients (N=3) | I87T vs. Controls          | V63G vs. Controls | I87T vs. V63G |
| BB1E2               | 19.42 ± 1.90                                   | 9.13 ± 4.67         | 4.59 ± 1.39         | 0.034                      | 0.001             | 0.162         |
| 92101               | 69.92 ± 44.36                                  | 10.63 ± 11.07       | 3.20 ± 0.58         | 0.308                      | 0.279             | 0.304         |
| GIR 94              | 44.51 ± 8.43                                   | 22.77 ± 10.84       | 7.08 ± 0.29         | 0.054                      | 0.100             | 0.051         |
| GIR 208             | 93.10 ± 39.03                                  | 18.27 ± 19.50       | 4.73 ± 1.90         | 0.015                      | 0.192             | 0.289         |
| MMHGR1              | 178.5 ± 97.13                                  | 75.88 ± 69.73       | 65.78 ± 51.65       | 0.167                      | 0.176             | 0.837         |

<sup>a</sup>Values are the mean fluorescence intensity for each monoclonal antibody minus the mean fluorescence intensity for the isotype control, expressed as means ± SD.

<sup>b</sup>p-values: t-test.

## References supplementary tables

56. Bertranpetit, J., Sala, J., Calafell, F., Underhill, P.A., Moral, P. and Comas, D. (1995) Human mitochondrial DNA variation and the origin of Basques. *Ann. Hum. Genet.*, **59**, 63-81.
57. Corte-Real, H.B., Macaulay, V.A., Richards, M.B., Hariti, G., Issad, M.S., Cambon-Thomsen, A., Papiha, S., Bertranpetit, J. and Sykes, B.C. (1996) Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann. Hum. Genet.*, **60**, 331-350.
58. Gonzalez, A.M., Brehm, A., Perez, J.A., Maca-Meyer, N., Flores, C. and Cabrera, V.M. (2003) Mitochondrial DNA affinities at the Atlantic fringe of Europe. *Am. J. Phys. Anthropol.*, **120**, 391-404.
59. Larruga, J.M., Diez, F., Pinto, F.M., Flores, C. and Gonzalez, A.M. (2001) Mitochondrial DNA characterisation of European isolates: The Maragatos from Spain. *Eur. J. Hum. Genet.*, **9**, 708-716.
60. Pereira, L., Prata, M.J. and Amorim, A. (2000) Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. *Ann. Hum. Genet.*, **64**, 491-506.
61. Salas, A., Comas, D., Lareu, M.V., Bertranpetit, J. and Carracedo, A. (1998) MtDNA analysis of the Galician population: A genetic edge of European variation. *Eur. J. Hum. Genet.*, **6**, 365-375.
62. Rando, J.C., Pinto, F., Gonzalez, A.M., Hernandez, M., Larruga, J.M., Cabrera, V.M. and Bandelt, H.J. (1998) Mitochondrial DNA analysis of northwest African populations reveals genetic exchanges with European, near-eastern, and sub-Saharan populations. *Ann. Hum. Genet.*, **62**, 531-550.
63. Maca-Meyer, N., Arnay, M., Rando, J.C., Flores, C., Gonzalez, A.M., Cabrera, V.M. and Larruga, J.M. (2004) Ancient mtDNA analysis and the origin of the Guanches. *Eur. J. Hum. Genet.*, **12**, 155-162.
64. Fregel, R., Pestano, J., Arnay, M., Cabrera, V.M., Larruga, J.M. and Gonzalez, A.M. (2009) The maternal aborigine colonization of La Palma (Canary Islands). *Eur. J. Hum. Genet.*, **17**, 1314-1324.
65. Rando, J.C., Cabrera, V.M., Larruga, J.M., Hernandez, M., Gonzalez, A.M., Pinto, F. and Bandelt, H.J. (1999) Phylogeographic patterns of mtDNA reflecting the colonization of the Canary Islands. *Ann. Hum. Genet.*, **63**, 413-428.
66. Santos, C., Fregel, R., Cabrera, V.M., Gonzalez, A.M., Larruga, J.M. and Lima, M. (2010) Mitochondrial DNA patterns in the Macaronesia islands: Variation within and among archipelagos. *Am. J. Phys. Anthropol.*, **141**, 610-619.
67. Salas, A., Richards, M., De la Fe, T., Lareu, M.V., Sobrino, B., Sanchez-Diz, P., Macaulay, V. and Carracedo, A. (2002) The making of the African mtDNA landscape. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 1082-1111.

68. Arredi, B., Poloni, E.S., Paracchini, S., Zerjal, T., Fathallah, D.M., Makrelouf, M., Pascali, V.L., Noveletto, A. and Tyler-Smith, C. (2004) A predominantly neolithic origin for Y-chromosomal DNA variation in North Africa. *Am. J. Hum. Genet.*, **75**, 338-345.
69. Flores, C., Maca-Meyer, N., Gonzalez, A.M., Oefner, P.J., Shen, P., Perez, J.A., Rojas, A., Larruga, J.M. and Underhill, P.A. (2004) Reduced genetic structure of the Iberian peninsula revealed by Y-chromosome analysis: implications for population demography. *Eur. J. Hum. Genet.*, **12**, 855-863.
70. Fregel, R., Gomes, V., Gusmao, L., Gonzalez, A.M., Cabrera, V.M., Amorim, A. and Larruga, J.M. (2009) Demographic history of Canary Islands male gene-pool: replacement of native lineages by European. *BMC Evol. Biol.*, **9**, 181.
71. Flores, C., Maca-Meyer, N., Perez, J.A., Gonzalez, A.M., Larruga, J.M. and Cabrera, V.M. (2003) A predominant European ancestry of paternal lineages from Canary Islanders. *Ann. Hum. Genet.*, **67**, 138-152.
72. Cruciani, F., La Fratta, R., Santolamazza, P., Sellitto, D., Pascone, R., Moral, P., Watson, E., Guida, V., Colomb, E.B., Zaharova, B., *et al.* (2004) Phylogeographic analysis of haplogroup E3b (E-M215) y chromosomes reveals multiple migratory events within and out of Africa. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 1014-1022.





## Conclusiones

1. El análisis con cinco mAb específicos de IFN- $\gamma$ R1 de los monocitos y de los linfocitos EBV-B de los pacientes procedentes de Gran Canaria, mostró una expresión disminuida de IFN- $\gamma$ R1.
2. El estudio genético de los pacientes de Gran Canaria y de sus familiares confirmó una deficiencia autosómica recesiva de IFN- $\gamma$ R1 debido a una mutación que produce la sustitución de un nucleótido en la posición 188 (c.188T>G, exón 2), dando lugar a un cambio conservativo de un residuo de valina por un residuo de glicina en la posición 63 (p.V63G) en el dominio extracelular de la molécula IFN- $\gamma$ R1.
3. El estudio genético de los pacientes de Chile, Portugal y Polonia y de sus familiares confirmó una deficiencia autosómica recesiva de IFN- $\gamma$ R1 debido a una mutación que produce la sustitución de un nucleótido en la posición 260 (c. 260T>C, exón 3), dando lugar a un cambio no conservativo de un residuo de isoleucina por uno de treonina en la posición 87 (p.I87T) en el dominio extracelular de la molécula IFN- $\gamma$ R1.
4. Los monocitos de los pacientes homocigotos para la mutación p.V63G mostraron menores niveles de unión específica a IFN- $\gamma$  a bajas concentraciones de la citocina que las células control. Sin embargo, estas diferencias fueron menos marcadas a altas concentraciones de la citocina, mostrando que las células de los pacientes son capaces de unir IFN- $\gamma$ .
5. Los análisis de eventos tempranos (fosforilación de STAT-1, translocación de STAT-1 al núcleo) y tardíos (expresión de CD64, producción de IL-12p70 y TNF- $\alpha$  y la producción de IP-10) inducidos por IFN- $\gamma$  *in vitro*, mostraron que las células de los pacientes homocigotos para *IFNGR1* p.V63G mostraban una respuesta muy disminuida o ausente a dosis bajas de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, a dosis altas se apreciaba respuesta a IFN- $\gamma$ , aunque esta era discretamente menor que en las células de individuos control.

6. La mutación p.V63G del *IFNGR1* confiere un defecto autosómico recesivo parcial, no completo, de IFN- $\gamma$ R1.
7. El análisis de los linfocitos EBV-B de pacientes procedentes de Portugal, Chile y Polonia mostró una expresión disminuida de IFN- $\gamma$ R1.
8. Los ensayos de translocación de STAT-1 al núcleo en células EBV-B estimuladas con IFN- $\gamma$ , mostraron que las células de pacientes homocigotos para p.V63G o p.I87T presentan un defecto celular menos grave que el observado en células de pacientes con deficiencia recesiva completa o dominante parcial de IFN- $\gamma$ R1.
9. La presencia de las mutaciones *IFNGR1* p.V63G e p.I87T son consecuencia de un efecto fundador. El ancestro común más reciente de los pacientes homocigotos para p.V63G se estima que vivió hace aproximadamente 500 (200-1275) años, El ancestro común más reciente (MRCA *-most recent common ancestor-*) de los pacientes homocigotos para p.I87T se estima que vivió hace aproximadamente 1600 (875-2950) años.
10. La deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 debida a las mutaciones p.V63G e p.I87T de *IFNGR1* en homocigosis confiere un fenotipo clínico menos grave que el defecto autosómico recesivo completo y probablemente menor que el observado en pacientes con defecto dominante parcial de IFN- $\gamma$ R1.
11. En las deficiencias RP, RC y DP de IFN- $\gamma$ R1 se puede apreciar una correlación entre el fenotipo celular de respuesta a IFN- $\gamma$  y el fenotipo clínico.

## CAPÍTULO III

### Objetivos

La deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 es el defecto genético más frecuente responsable de MSMD. El fenotipo clínico en estos pacientes es muy heterogéneo. Debido a que la cadena IL-12R $\beta$ 1 es necesaria para la señalización tanto de la IL-12 como de la IL-23, y dado que la IL-23 es necesaria para la expansión de los linfocitos Th17, estos pacientes podrían tener una mayor susceptibilidad a candidiasis.

Los objetivos planteados son:

1. Recoger datos epidemiológicos y datos clínicos de episodios de candidiasis en pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 procedentes de diferentes países.
2. Estudiar la presentación clínica, la mortalidad y la respuesta al tratamiento de las infecciones por candidas en estos pacientes mediante la revisión del historial clínico.



# Clinical Features of Candidiasis in Patients With Inherited Interleukin 12 Receptor $\beta$ 1 Deficiency

Monia Ouederni,<sup>1,2</sup> Ozden Sanal,<sup>5</sup> Aydan Ikinçioğulları,<sup>6</sup> İlhan Tezcan,<sup>5</sup> Figen Dogu,<sup>6</sup> İthasa Sologuren,<sup>12</sup> Sigifredo Pedraza-Sánchez,<sup>16</sup> Melike Keser,<sup>9</sup> Gonul Tanir,<sup>7</sup> Chris Nieuwhof,<sup>19</sup> Elena Colino,<sup>13</sup> Dinakantha Kumararatne,<sup>20</sup> Jacov Levy,<sup>22</sup> Necil Kutukculer,<sup>10</sup> Caner Aytekin,<sup>8</sup> Estefania Herrera-Ramos,<sup>12</sup> Micah Bhatti,<sup>23</sup> Neslihan Karaca,<sup>10</sup> Ridha Barbouche,<sup>3</sup> Arnon Broides,<sup>22</sup> Ekaterini Goudouris,<sup>26</sup> José Luis Franco,<sup>27</sup> Nima Parvaneh,<sup>28</sup> Ismail Reisli,<sup>11</sup> Alexis Strickler,<sup>29</sup> Anna Shcherbina,<sup>30</sup> Ayyer Somer,<sup>9</sup> Anthony Segal,<sup>21</sup> Alfonso Angel-Moreno,<sup>14,a</sup> José Luis Lezana-Fernandez,<sup>18</sup> Mohamed Bejaoui,<sup>1,2</sup> Miriam Bobadilla-Del Valle,<sup>17</sup> Salem Kachboura,<sup>4</sup> Timothy Sentongo,<sup>24</sup> Imen Ben-Mustapha,<sup>3</sup> Jacinta Bustamante,<sup>31,32</sup> Capucine Picard,<sup>31,32,33</sup> Anne Puel,<sup>31,32,b</sup> Stéphanie Boisson-Dupuis,<sup>31,32,25,b</sup> Laurent Abel,<sup>31,32,25</sup> Jean-Laurent Casanova,<sup>31,32,25,34</sup> and Carlos Rodríguez-Gallego,<sup>12,15</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Hematology-Immunology Unit, National Bone Marrow Transplantation Center, Tunis, <sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Tunis El Manar, <sup>3</sup>Laboratory of Cytology, Pasteur Institut of Tunis, and <sup>4</sup>Department of Cardiology, Ariana Hospital, Tunis, Tunisia; <sup>5</sup>Department of Pediatric Immunology and Allergy, Ankara University School of Medicine, <sup>6</sup>Immunology Division, Hacettepe University Children's Hospital, <sup>7</sup>Department of Pediatric Infectious Diseases, Dr Sami Ulus Maternity and Children's Health and Diseases Training and Research Center, and <sup>8</sup>Department of Pediatric Immunology, Dr Sami Ulus Children's Health and Diseases Training and Research Center, Ankara, <sup>9</sup>Department of Pediatric Infectious Diseases and Clinical Immunology, Istanbul University and Istanbul Medical Faculty, <sup>10</sup>Department of Pediatric Immunology, Ege University Faculty of Medicine, Izmir, and <sup>11</sup>Department of Pediatric Immunology, Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty, Konya, Turkey; <sup>12</sup>Department of Immunology, Gran Canaria Dr Negrin University Hospital, <sup>13</sup>Department of Pediatrics and <sup>14</sup>Department of Internal Medicine, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, and <sup>15</sup>Department of Medical and Surgical Sciences, School of Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain; <sup>16</sup>Unit of Biochemistry and <sup>17</sup>Laboratory of Microbiology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán (INCMNSZ), and <sup>18</sup>Department of Pediatric Pulmonology, Laboratory of Pulmonary Physiology, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City; <sup>19</sup>Department of Internal Medicine, University Hospital, Maastricht, Netherlands; <sup>20</sup>Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrookes Hospital, Cambridge, and <sup>21</sup>Department of Medicine, University College London, United Kingdom; <sup>22</sup>Pediatric Department, Soroka Medical Center, Faculty of Health Sciences, Ben Gurion University, Beer Sheva, Israel; <sup>23</sup>Department of Pediatric Infectious Diseases, Comer Children's Hospital, University of Chicago Medicine, and <sup>24</sup>Department of Pediatrics, University of Chicago Medical Center, Illinois; <sup>25</sup>St Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, Rockefeller University, New York, New York; <sup>26</sup>Department of Pediatrics, UFRJ-Federal University of Rio de Janeiro, Brazil; <sup>27</sup>Group of Primary Immunodeficiencies, University of Antioquia, Medellín, Colombia; <sup>28</sup>Department of Pediatrics, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Iran; <sup>29</sup>Department of Pediatrics, Hospital Puerto Montt, Chile; <sup>30</sup>Department of Clinical Immunology, Center for Pediatric Hematology, Oncology, Immunology, Moscow, Russia; <sup>31</sup>Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, <sup>32</sup>University Paris Descartes, Imagine Institute, <sup>33</sup>Study Center for Primary Immunodeficiencies, Necker Hospital, AP-HP, and <sup>34</sup>Pediatric Hematology-Immunology Unit, Necker-Enfants Malades Hospital, AP-HP, Paris, France

**Background.** Interleukin 12R $\beta$ 1 (IL-12R $\beta$ 1)-deficient patients are prone to clinical disease caused by mycobacteria, *Salmonella*, and other intramacrophagic pathogens, probably because of impaired interleukin 12-dependent interferon  $\gamma$  production. About 25% of patients also display mucocutaneous candidiasis, probably owing to impaired interleukin 23-dependent interleukin 17 immunity. The clinical features and outcome of candidiasis in these patients have not been described before, to our knowledge. We report here the clinical signs of candidiasis in 35 patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency.

**Results.** Most (n = 71) of the 76 episodes of candidiasis were mucocutaneous. Isolated oropharyngeal candidiasis (OPC) was the most common presentation (59 episodes, 34 patients) and was recurrent or persistent in 26 patients. Esophageal candidiasis (n = 7) was associated with proven OPC in 2 episodes, and cutaneous candidiasis (n = 2) with

Received 26 May 2013; accepted 25 October 2013; electronically published 1 November 2013.

<sup>a</sup>Present affiliation: Department of Internal Medicine, Puerta de Hierro Hospital, Madrid, Spain.

<sup>b</sup>A. P. and S. B. D. contributed equally to this work.

Correspondence: Carlos Rodríguez-Gallego, PhD, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrin, Barranco de la Ballena s/n, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Spain (jrodgal@gobiernodecanarias.org).

**Clinical Infectious Diseases** 2014;58(2):204–13

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/cit722

OPC in 1 patient, whereas isolated vulvovaginal candidiasis (VVC;  $n = 3$ ) was not. Five episodes of proven invasive candidiasis were documented in 4 patients; 1 of these episodes was community acquired in the absence of any other comorbid condition. The first episode of candidiasis occurred earlier in life (median age  $\pm$  standard deviation,  $1.5 \pm 7.87$  years) than infections with environmental mycobacteria ( $4.29 \pm 11.9$  years), *Mycobacterium tuberculosis* ( $4 \pm 3.12$  years), or *Salmonella* species ( $4.58 \pm 4.17$  years) or other rare infections ( $3 \pm 11.67$  years). Candidiasis was the first documented infection in 19 of the 35 patients, despite the vaccination of 10 of these 19 patients with live bacille Calmette-Guérin.

**Conclusions.** Patients who are deficient in IL-12R $\beta$ 1 may have candidiasis, usually mucocutaneous, which is frequently recurrent or persistent. Candidiasis may be the first clinical manifestation in these patients.

**Keywords.** Interleukin-12 receptor  $\beta$ 1 chain; primary immunodeficiency; *Candida*; *Mycobacterium*; *Salmonella*.

Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) is characterized by a selective predisposition to clinical disease caused by mycobacteria and *Salmonella* [1]. Nine disease-causing genes have been described, including 3 genes controlling the response to interferon (IFN)  $\gamma$  (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*), 4 involved in IFN- $\gamma$  production (*IL12B*, *IL12RB1*, *NEMO*, *ISG15*) [1, 2], 1 involved in the IFN- $\gamma$ -dependent induction of interleukin 12 (IL-12; *IRF8*) [3], and another gene controlling the macrophage respiratory burst, which can be triggered by IFN- $\gamma$  (*CYBB*) [4].

Interleukin 12R $\beta$ 1 (IL-12R $\beta$ 1) deficiency is the most common genetic cause of MSMD [5, 6], with 156 patients reported to date (Supplementary Table 1). *IL12RB1* encodes the first chain of the IL-12 (IL-12R $\beta$ 1) and interleukin 23 (IL-23) receptors. Interleukin 12 is an important cytokine for the development of IFN- $\gamma$ -producing T cells and for IFN- $\gamma$  production [7]. Conversely, IL-23 is important for the expansion and maintenance of the interleukin 17 (IL-17)-producing T-cell population [8, 9]. Interleukin 12R $\beta$ 1 deficiency is the genetic cause of MSMD for which the most infections other than mycobacteriosis has been reported [1]. Salmonellosis is very common, as in IL-12p40 deficiency, but much more so than in other genetic etiologies of MSMD [1, 10, 11]. However, other infections due to intramacrophagic pathogens have also been reported (Supplementary Table 1) [1, 6]. The impairment of IL-23 immunity, alone or together with IL-12 immunity, may contribute to this relatively broad infectious phenotype [1, 9].

We recently noted that about 25% of IL-12R $\beta$ 1-deficient patients also have mild forms of chronic mucocutaneous candidiasis (CMC) [6]. This is consistent with the role of IL-23 in the maintenance of IL-17-producing T cells and the low proportions of IL-17 T cells in the patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency studied [9]. Indeed, patients with disorders associated with impaired IL-12-mediated immunity have CMC, including patients with autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I (APS-I), autosomal dominant (AD) hyper-immunoglobulin E syndrome (AD-HIES) due to dominant-negative mutations of *STAT3*, or more rarely those with caspase recruitment domain-containing protein 9 (*CARD9*) deficiency [12–17]. Isolated CMC, also known as CMC disease (CMCD), has been shown to result from AD IL-17F deficiency, autosomal recessive deficiency

of IL-17RA (the receptor for both IL-17A and IL-17F), from NF- $\kappa$ B activator 1 (*ACT1*) deficiency, or from an AD gain of *STAT1* activity [18–22]. Surprisingly, the clinical features of candidiasis have never been studied in series of patients with these inborn errors of immunity. We report here the clinical features of candidiasis in 35 patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency.

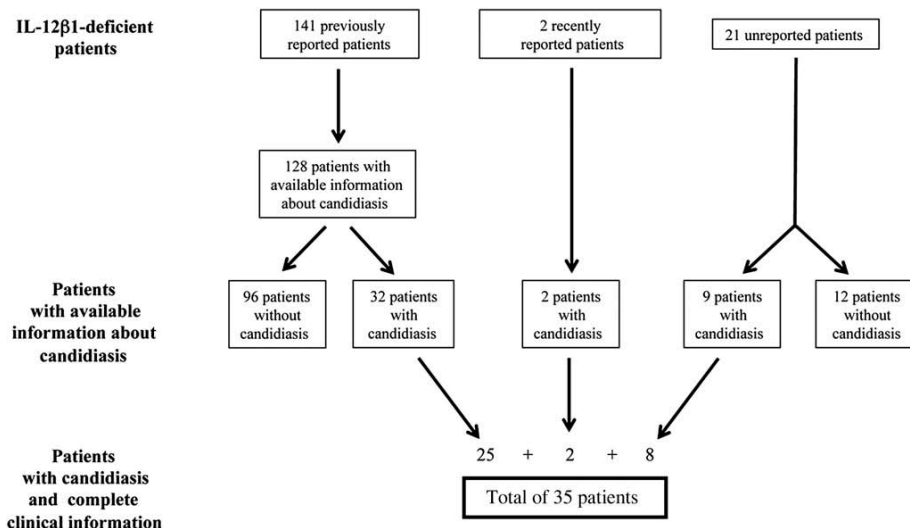
## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Candidiasis was reported in 32 (25%) of the 128 IL-12R $\beta$ 1-deficient patients previously reported (of a total of 141) for whom information about *Candida* infections was available [6]. Candidiasis was also documented in 2 recently reported IL-12R $\beta$ 1-deficient patients [23, 24] and in 9 of 21 with recent diagnoses who were not previously reported. A questionnaire was sent to physicians caring for the 34 previously reported IL-12R $\beta$ 1-deficient patients with candidiasis [6, 23, 24] and the 9 with recent diagnoses who were previously unreported. Detailed information about candidiasis was obtained for 35 patients (Figure 1).

The questionnaire included items relating to demographic data, *IL12RB1* mutations, and infectious diseases. For candidiasis, we recorded the date and patient age at the time of the episode, the *Candida* species identified, sites involved, whether the episode was community-acquired or hospital-acquired candidiasis, clinical signs and duration before treatment, use of antibiotics during or before candidiasis, use of immunosuppressants, polymorphonuclear granulocyte counts, the presence of comorbid conditions and age at onset of these conditions, clinical features for each episode, antifungal treatment and duration, and time to clinical remission. Informed consent was obtained from each patient or the patient's family. The protocol was approved by the local ethics committees of the various institutions involved.

The diagnosis of esophageal candidiasis was based on the demonstration of candidiasis by biopsy culture and/or esophagoscopy. The diagnosis of invasive candidiasis was based on the cultivation of *Candida* from normally sterile clinical fluids or biopsy specimens. We considered that an episode of candidiasis was a relapse of a previous infection when the infection reappeared at the same site <1 month after treatment withdrawal.



**Figure 1.** Selection process for interleukin (IL)-12R $\beta$ 1-deficient patients with or without candidiasis and questionnaires with complete clinical information received. The occurrence of candidiasis was included in a complete questionnaire sent to the physicians caring for the 141 patients previously reported [6]; no data about the occurrence of candidiasis were available in 13 of these patients. Candidiasis was also documented in 2 patients reported in 2011 and 2012 [23, 24]; specific questionnaires about candidiasis were sent to the physicians caring for these 2 patients. For 21 previously unreported patients, before questionnaires were sent, physicians caring for the patients were consulted about the presence of candidiasis. Questionnaires were sent only for the 9 patients with documented candidiasis, for whom 8 questionnaires with complete clinical information were received.

Patients were considered to have recurrent candidiasis if they had had  $\geq 3$  *Candida* infections and the second episode or subsequent episodes occurred  $\geq 1$  month after withdrawal of treatment for a previous episode. Recurrent VVC was defined as  $\geq 4$  episodes of VVC in 1 year. Persistent candidiasis was defined as the presence of repeated episodes of candidiasis despite treatment resulting in rarely observed candidiasis-free periods. For statistical purposes, patients with persistent or recurrent candidiasis were analyzed together.

### Statistical Analysis

Quantitative variables are presented as arithmetic means  $\pm$  standard deviations, except for the age at onset of infectious diseases, given as medians  $\pm$  standard deviations. Frequency distributions were compared using  $\chi^2$  tests or Fisher exact tests, as necessary, and odds ratios with 95% confidence intervals were calculated. Statistical analyses were performed using the LIFETEST and PHREG procedures of SAS software version 9.2 (SAS, Cary, NC, USA).

## RESULTS

We studied 35 IL-12R $\beta$ 1-deficient patients who had candidiasis. The clinical and genetic features of the patients are

summarized in Table 1. There were 76 documented episodes of candidiasis, and the epidemiological characteristics of the episodes are shown in Table 2. Most episodes ( $n = 53$ ) corresponded to documented infections in patients with recurrent or persistent candidiasis, and 23 episodes corresponded to documented infections that did not recur. *Candida* infections were documented at various anatomic sites (Figure 2). Most episodes ( $n = 59$ ; 78%) involved only the oropharyngeal cavity, but esophageal ( $n = 7$ ), cutaneous ( $n = 2$ ), and vulvovaginal ( $n = 3$ ) sites were also affected. However, 5 episodes of proven disseminated candidiasis were also recorded.

### Oropharyngeal Candidiasis

Oropharyngeal candidiasis (OPC) was the predominant manifestation (34 of 35 patients), and no risk factors were identified for 23 of the 62 episodes (59 episodes of isolated OPC and 3 episodes of OPC associated with esophageal [ $n = 2$ ], or cutaneous [ $n = 1$ ] candidiasis). The risk factors for the remaining 39 episodes included antibiotic treatment in all cases and the use of immunosuppressive drugs in 6 cases. Twenty-six patients had recurrent or persistent OPC despite oral or intravenous antifungal treatment (Supplementary Figure 1). Six patients have had OPC since birth and continuing after the age of 6 months. A combination of stomatitis, aphthous ulcers, and oral thrush

**Table 1. Genetic and Clinical Features of Interleukin 12Rβ1 –Deficient Patients With Candidiasis**

| Patient No. | Code in Reference [6] | Country of Origin     | Mutation              | Age, y <sup>a</sup> /Sex | Follow-up Outcome | Candidiasis Onset (Age, y)    | BCG Onset (Age, y) | EMI Onset (Age, y)   | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Onset (Age, y) | <i>Salmonella</i> Onset (Age, y)                             | Other Infections (Age, y)   |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|-------------------------------|--------------------|--|--|--|---|
| 1           | 30 II.5               | Spain                 | NG                    | 6.9/M                    | Deceased          | <i>Candida</i> spp. (birth)   | NV                 | ...  | ...  | <i>Salmonella enteritidis</i> (5.9)                          | Varicella (chickenpox) (5)  |
| 2           | 30 II.6               | Spain                 | 1791 +2 T > G         | 30.2/M                   | Deceased          | <i>Candida albicans</i> (2.1) | NV                 | ...  | ...  | <i>S. enteritidis</i><br><i>Salmonella portland</i> (6)      | Measles (4), varicella (5), mumps (6), <i>Campylobacter jejuni</i> (28)   |
| 3           | 97 II.1               | Tunisia               | NG                    | 29/M                     | Alive             | <i>C. albicans</i> (7)        | R                  | ...  | <i>M. tuberculosis</i> (4)                       | ...  | <i>Streptococcus</i> spp. (27),<br><i>Aerococcus viridans</i> (27),<br>Herpes (17)                                      |
| 4           | 83 II.1               | Turkey                | 783 + 1G > A          | 4/M                      | Alive             | <i>Candida</i> spp. (2)       | D (0.5)            | ...  | ...  | ...  | ...   |
| 5           | 75 II.2               | Turkey                | 783 + 1G > A          | 4/M                      | Deceased          | <i>C. albicans</i> (0.83)     | D (2)              | ...  | ...  | ...  | ...   |
| 6           | 75 II.1               | Turkey                | 783 + 1G > A          | 7/F                      | Deceased          | <i>C. albicans</i> (3)        | D (0.33)           | ...  | ...  | ...  | ...   |
| 7           | 73 II.1               | Turkey                | 783 + 1G > A          | 4/M                      | Deceased          | <i>C. albicans</i> (birth)    | D (0.33)           | ...  | ...  | ...  | ...   |
| 8           | 73 II.2               | Turkey                | 783 + 1G > A          | 11/F                     | Alive             | <i>C. albicans</i> (1)        | NV <sup>b</sup>    | <i>Mycobacterium</i> spp. (0.75) <sup>b</sup>                                | ...  | <i>Salmonella</i> group B,<br><i>Salmonella</i> group D? (6) | ...   |
| 9           | 64 II.2               | Netherlands           | Q376X                 | 28.4/F                   | Deceased          | <i>Candida</i> spp. (4.1)     | NV                 | <i>Mycobacterium avium</i> (4)   | ...  | <i>Salmonella typhimurium</i> (4)                            | Rotavirus (3)   |
| 10          | 10 II.2               | Israel (Bedouin Arab) | 700 + 362_1619–944del | 10.5/M                   | Alive             | <i>C. albicans</i> (4)        | NV                 | ...  | ...  | <i>Salmonella</i> group D (NA)                               | <i>Kingella kingae</i> (1.6),<br><i>Trichophyton rubrum</i> (4),<br><i>Streptococcus pneumoniae</i> (4.1), herpes (9.4) |
| 11          | 4 II.1                | Cyprus                | 1623_1624delinsTT     | 40/M                     | Alive             | <i>Candida</i> spp. (2.3)     | R                  | <i>Mycobacterium triplex</i> ,<br><i>Mycobacterium genense</i> (1.7)         | ...  | <i>S. enteritidis</i> (11)                                   | ...   |
| 12          | 7 II.5                | Turkey                | R173P                 | 17/M                     | Deceased          | <i>C. albicans</i> (1.7)      | R                  | <i>Mycobacterium fortitulum-chelonae</i> complex (10), <i>M. avium</i> (1.7) | <i>M. tuberculosis</i> (7)                       | ...  | <i>Acinetobacter baumannii</i> (1.7)  |
| 13          | 49 II.1               | Turkey                | 783 + 1G > A          | 1.9/M                    | Deceased          | <i>Candida</i> spp. (1)       | D (1.3)            | ...  | ...  | ...  | <i>Staphylococcus aureus</i> (NA)   |
| 14          | 39 II.2               | Turkey                | 628–644dup            | 6/M                      | Deceased          | <i>Candida</i> spp. (1.6)     | D (1.5)            | <i>M. avium</i> (3.7)  | ...  | <i>Salmonella</i> spp. (4.2)                                 | ...   |
| 15          | 39 II.5               | Turkey                | 628–644dup            | 2.5/M                    | Alive             | <i>Candida</i> spp. (birth)   | D (0.91)           | ...  | ...  | ...  | ...   |
| 16          | 41 II.2               | Turkey                | 783 + 1 G > C         | 3.1/M                    | Deceased          | <i>Candida</i> spp. (birth)   | R                  | ...  | ...  | <i>S. enteritidis</i> (1)                                    | ...   |
| 17          | 38 II.2               | Turkey                | 711 ins C             | 2/F                      | Deceased          | <i>Candida</i> spp. (birth)   | D (0.5)            | ...  | ...  | ...  | ...   |
| 18          | 44 II.1               | Mexico                | 1791 +2 T > G         | 3.5/F                    | Deceased          | <i>C. albicans</i> (2.7)      | D (0.5)            | ...  | ...  | ...  | ...   |
| 19          | 57 II.1               | Mexico                | 1791 +2 T > G         | 16/M                     | Deceased          | <i>Candida</i> spp. (15.6)    | D (0.75)           | ...  | ...  | ...  | Herpes (0.33)   |
| 20          | 78 II.2               | Mexico                | R486X                 | 4.6/M                    | Deceased          | <i>C. albicans</i> (4.4)      | D (0.5)            | <i>Mycobacterium</i> spp. (4.6)  | ...  | <i>Salmonella</i> spp. (2)                                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (4.6)  |



Table 1 continued.

| Patient No. | Code in Reference [6] | Country of Origin | Mutation              | Age, y <sup>a</sup> /Sex | Follow-up Outcome | Candidiasis Onset (Age, y)              | BCG Onset (Age, y) | EM Onset (Age, y)               | Mycobacterium tuberculosis Onset (Age, y) | Salmonella Onset (Age, y)                                      | Other Infections (Age, y)   |
|-------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|---|--------------------|---------------------------------|---|--|---|
| 21          | 25 II.1               | Spain             | 1791 +2T > G          | 7.5/F                    | Deceased          | <i>Candida glabrata-C. albicans</i> (4) | NV                 | <i>M. avium</i> (3.3)           | ...                                       | <i>S. enteritidis</i> (0.91)                                   | ...   |
| 22          | 18 II.1               | France            | Q376X                 | 30.8/M                   | Alive             | <i>C. albicans</i> (birth)              | R                  | ...                             | ...                                       | <i>Salmonella dublin</i> (2)                                   | <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp. (3)                              |
| 23          | 81 II.1               | Turkey            | 64 + 2T > G           | 4.5/M                    | Alive             | <i>Candida</i> spp. (1.2)               | D (0.5)            | ...                             | ...                                       | ...  | ...   |
| 24          | 89 II.1               | Turkey            | 1791 +2T > G          | 5.5/F                    | Alive             | <i>Candida</i> spp. (2)                 | D (2)              | ...                             | ...                                       | ...  | ...   |
| 25          | 82 II.5               | Turkey            | 1425delC              | 3/M                      | Alive             | <i>Candida</i> spp. (5)                 | D (0.5)            | ...                             | ...                                       | <i>S. enteritidis</i> (16)                                     | ...   |
| 26          |                       | Turkey            | 64 + 1G > T           | 2.1/M                    | Alive             | <i>Candida</i> spp. (5)                 | D (0.58)           | ...                             | ...                                       | ...  | ...   |
| 27          |                       | United States     | W466X/O541X           | 2.5/M                    | Alive             | <i>Candida</i> spp. (2.3)               | NV                 | <i>M. avium</i> (1.8)           | ...                                       | ...  | ...   |
| 28          |                       | Israel            | 700 + 3c2_1619-944del | 16/M                     | Deceased          | <i>C. albicans</i> (7.6)                | NV                 | <i>Mycobacterium</i> spp. (15)  | ...                                       | <i>Salmonella</i> spp. (10.4)                                  | ...   |
| 29          |                       | Brazil            | C474S                 | 7/M                      | Alive             | <i>Candida</i> spp. (0.75)              | D (0.25)           | <i>Mycobacterium</i> spp. (2)   | <i>M. tuberculosis</i> (0.75)             | <i>Salmonella</i> spp. (2)                                     | ...   |
| 30          |                       | Colombia          | C291Y                 | 2.6/M                    | Alive             | <i>Candida</i> spp. (1.8)               | D (0.33)           | ...                             | ...                                       | ...  | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (0.75)  |
| 31          |                       | Iran              | Q410X                 | 6.4/F                    | Deceased          | <i>C. albicans</i> (1.3)                | NV                 | <i>Mycobacterium</i> spp. (4.3) | ...                                       | <i>Salmonella typhi</i> (1.6), <i>Salmonella</i> group D (4.2) | <i>K. pneumoniae</i> (2)  |
| 32          |                       | Turkey            | R211X                 | 7.6/F                    | Alive             | <i>C. albicans</i> (1.5)                | D (1.5)            | ...                             | ...                                       | <i>Salmonella</i> spp. (5)                                     | <i>Escherichia coli</i> (1.5)   |
| 33          |                       | Chile             | 169delA               | 3.5/M                    | Alive             | <i>Candida</i> spp. (0.16)              | D (0.25)           | ...                             | ...                                       | ...  | ...   |
| 34          |                       | The Netherlands   | 1561G.C               | 49/M                     | Alive             | <i>C. albicans</i> (43.2)               | NV                 | <i>M. genevense</i> (43.5)      | ...                                       | ...  | <i>E. coli</i> (43.5), <i>K. pneumoniae</i> (44.4), <i>S. pneumoniae</i> (44.4) |
| 35          |                       | Russia            | Q209X/1387del6        | 8.5/F                    | Alive             | <i>C. albicans</i> (2)                  | D (0.33)           | ...                             | ...                                       | <i>S. enteritidis</i> (6)                                      | <i>Yersinia</i> spp. (2), <i>varicella</i> (3)                                  |

Abbreviations: BCG, bacille Calmette-Guérin; *Candida* spp., patient had *Candida* infection but the species was not identified; D, BCG disease after vaccination; EM, environmental mycobacteria (nontuberculous mycobacterial); NG, not genotyped; diagnosis of *IL12RB1* deficiency was based on clinical phenotype, family history, and identification of *IL12RB1* mutations in relatives; F, female; M, male; *Mycobacterium* spp., patient had mycobacterial infection but the species was not identified; NA, not available; NV, not vaccinated; R, resistant to vaccination; *Salmonella* spp., patient had nontyphoidal salmonellosis, but the species was not identified.

<sup>a</sup> Age at last follow-up or death.

<sup>b</sup> In this patient, BCG disease was suspected, probably acquired from the affected older brother's lesion. The mycobacterial species was not identified.

**Table 2. Epidemiological Characteristics of 76 Episodes of *Candida* Infection in 35 Patients With Interleukin 12Rβ1 Deficiency<sup>a</sup>**

| Characteristics                                      | Episodes, No. (%)    |
|--|----------------------|
| <b>Type of candidiasis</b>                           |                      |
| Recurrent or persistent                              | 53 (70) <sup>b</sup> |
| Acute  | 23 (30)              |
| Community acquired                                   | 69 (91)              |
| Hospital acquired <sup>c</sup>                       | 7 (9)                |
| <b>Risk factors</b>                                  |                      |
| Antibiotic treatment                                 | 42 (55)              |
| Immunosuppression                                    | 2 (3)                |
| Antibiotics plus immunosuppression                   | 5 (7)                |
| Neutropenia  | 0                    |
| Comorbid conditions <sup>d</sup>                     | 0                    |
| Central venous catheter plus antibiotics             | 2 (3)                |
| Abdominal surgery plus antibiotics                   | 1 (1)                |
| Esophageal carcinoma plus antibiotics                | 1 (1)                |
| Bone marrow transplantation plus antibiotics         | 1 (1)                |
| No risk factors recorded                             | 27 (36)              |
| <b><i>Candida</i> species</b>                        |                      |
| <i>Candida albicans</i>                              | 40 (53)              |
| Species not identified                               | 34 (45)              |
| <i>C. albicans</i> plus other <i>Candida</i> species | 2 (3) <sup>e</sup>   |
| <b>Other fungal infections</b>                       |                      |
| <i>Trichophyton rubrum</i>                           | 1 (1)                |

<sup>a</sup> The median patient age at onset of first *Candida* infection ( $\pm$  standard deviation) was  $1.5 \pm 7.87$  years.

<sup>b</sup> When the corresponding physician stated that a patient had multiple episodes of candidiasis, but only 1 episode was noted in the questionnaire, the patient was considered to have recurrent or persistent candidiasis, and only the reported episode was considered in the statistical analysis.

<sup>c</sup> *Candida* infections that occurred when the patients were hospitalized were considered probable cases of nosocomial infection.

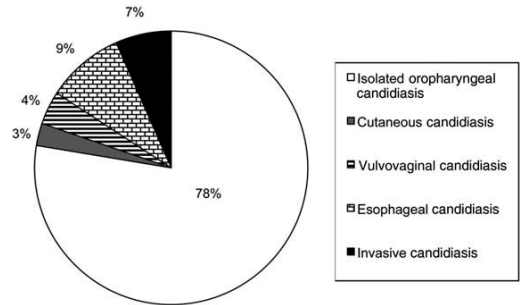
<sup>d</sup> Comorbid conditions conferring a predisposition to candidiasis, such as diabetes, renal insufficiency, or pancreatitis.

<sup>e</sup> Coinfection with *C. albicans* and *Candida glabrata* was recorded in 2 episodes.

was noted in 2 patients. Secondary prophylaxis with fluconazole or itraconazole (in 2 patients each) controlled OPC, although candidiasis recurred in both patients when prophylaxis was withdrawn. However, 2 patients continued to have candidiasis in spite of prophylaxis with fluconazole (both patients) or itraconazole (1 patient); 1 of these patients (patient 25), continued to have OPC after intravenous amphotericin B followed by intravenous caspofungin, even though *Candida* isolates were sensitive to fluconazole, itraconazole, and amphotericin B.

#### Cutaneous Candidiasis

Cutaneous candidiasis was observed in 2 patients. Despite repeated treatments with oral fluconazole, griseofulvin, and itraconazole, patient 10 had recurrent skin and scalp infections with *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans* in the absence of



**Figure 2.** *Candida* infections (episodes) in patients with interleukin 12Rβ1 deficiency. Two episodes of esophageal candidiasis and 1 of cutaneous candidiasis were associated with oropharyngeal candidiasis.

known risk factors. Patient 25 had a dermal lesion caused by *Candida* spp. on the left shoulder and neck during antibiotic treatment. The infection resolved after 2 weeks of treatment with intravenous amphotericin B.

#### Vulvovaginal Candidiasis

Vulvovaginal candidiasis due to *C. albicans* was recorded in 3 episodes in 3 patients (patient 9, age 26 years; patient 21, age 4 years; and patient 32, age 5 years). Two of these patients (patients 9 and 21) were receiving antibiotic treatment, and 1 patient was receiving immunosuppressive treatment. Coinfection with *Candida glabrata* was observed in 1 episode (in patient 21). All 3 episodes resolved following local antifungal treatment. No recurrent VVC was recorded.

#### Esophageal Candidiasis

Five patients (7 episodes) had esophageal candidiasis (Supplementary Figure 2), which manifested as decreased appetite, weight loss, and/or odynophagia. One case of community-acquired *C. albicans* superinfection of a well-differentiated squamous cell carcinoma of the esophagus (SCEC) was observed, in patient 2. This patient was receiving irregular prophylaxis with ciprofloxacin [25]. Patients 27, 28, 31, and 34 had community-acquired esophageal candidiasis at the ages of 2 years and 3 months, 9 years, 30 months, and 43 years, respectively. Patient 27 was receiving antimycobacterial treatment, and patient 31 was receiving cotrimoxazole treatment, but patients 28 and 34 were not taking antibiotics and had no other risk factors. Patients 2, 27, and 28 had previously had OPC. Patient 34 had a second episode of community-acquired esophageal candidiasis at age 44.5 years when he was receiving antimycobacterial treatment. Patient 28 also had hospital-acquired esophageal candidiasis when he was 15 years old, while receiving ceftriaxone plus prednisone treatment. Patient 2 responded

to treatment with oral fluconazole, but no response to oral fluconazole was observed twice in patient 34. Secondary prophylaxis with oral fluconazole (patient 27) or oral itraconazole (patient 31) controlled esophageal candidiasis in 2 patients, although prophylaxis with oral fluconazole was ineffective in patient 28.

### Systemic and Deep-Seated *Candida* Infections

Five episodes of documented invasive or disseminated candidiasis were recorded in 4 patients (Table 3 and Supplementary Material 2). Two patients (patients 9 and 12) had catheter-related candidemia with sepsis, caused by *C. albicans*. One of them (patient 9) developed an invasive infection of the ileus by *C. albicans* following laparotomy 1 month after an episode of candidemia. Despite antifungal treatment, 2 ileum biopsy specimen cultures were positive for *C. albicans* 9 months later. One patient had community-acquired disseminated candidiasis; patient 3 had acute pulmonary edema and endocarditis caused by *Candida spp.* Patient 20 had a systemic response, neurological symptoms, aplasia, and paralysis due to a *C. albicans* infection that was confirmed by cultures of urine and cerebrospinal fluid. However, the clinical course of the invasive candidiasis in patient 20 did not allow us to exclude the possibility that this episode was hospital acquired. Three of these patients (patients 3, 9, and 20) had had oral candidiasis since childhood. No other comorbid condition was identified in patient 3, and possible risk factors documented in patient 20 included intravenous antimycobacterial and antifungal treatment and surgical debridement of a dorsolumbar abscess.

### Onset of Candidiasis

In the 35 patients with candidiasis, the first episode of candidiasis occurred earlier in life ( $1.5 \pm 7.87$  years; range, birth to 43 years) than reported for classic MSMD-defining infections,

such as those caused by environmental mycobacteria ( $4.29 \pm 11.9$  years; range, 9 months to 43 years), *Mycobacterium tuberculosis* ( $4 \pm 3.12$  years; range, 9 months to 7 years), or *Salmonella* species ( $4.58 \pm 4.17$  years; range, 11 months to 16 years) or other infections ( $3 \pm 11.67$  years; range, 4 months to 43.5 years). By contrast, BCG vaccination induced disease at even younger ages ( $0.5 \pm 0.57$  years; range, 3 months to 2 years) than *Candida* or other infections. Nevertheless, *Candida* was the first documented infection in 19 of the 35 patients, despite the vaccination of 10 of these 19 patients with BCG vaccine, suggesting that >10% of patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency may first present with *Candida* infections.

### Mortality

The mortality rate in our 35 patients with candidiasis (49%) was higher than that previously reported for 132 symptomatic IL-12R $\beta$ 1-deficient patients (31.8%) [6]. We did not have up-to-date data for many of the previously reported patients, particularly those without candidiasis. However, we analyzed mortality for the previously reported 128 symptomatic IL-12R $\beta$ 1-deficient patients (of the 141 patients described elsewhere) for whom information about *Candida* infection was available (Table 4) [6]. Mortality rates were significantly higher ( $P = .00004$ ) for patients with candidiasis (19 of 32 [59%]) than for those without *Candida* infection (20 of 96 [21%]; odds ratio, 5.84; 95% confidence interval, 2.46–13.9). Likewise, Kaplan–Meier survival analysis (Figure 3) showed survival to be significantly lower for patients with candidiasis ( $P = .0001$  by log-rank test) than for those without *Candida* infection.

### DISCUSSION

We recently noted that about 25% of IL-12R $\beta$ 1-deficient patients have chronic CMC [6]. Oropharyngeal candidiasis, skin

**Table 3. Invasive Episodes of *Candida* Infection in Patients With Interleukin 12R $\beta$ 1 Deficiency**

| Documented <i>Candida</i> Infections |                               |   |            |                       |                        |                            |
|--------------------------------------|-------------------------------|---|------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|
| Patient No.                          | <i>Candida</i> Site           | Risk Factor   | HAC or CAC | Previous Candidiasis  | <i>Candida</i> Species | IFN- $\gamma$ <sup>a</sup> |
| 9                                    | Candidemia with sepsis        | Catheter antimycobacterial treatment                                    | HAC        | Oral candidiasis, VVC | <i>C. albicans</i>     | Yes                        |
| 9                                    | Gastrointestinal              | Laparotomy, antimycobacterial treatment                                 | HAC        | Oral candidiasis, VVC | <i>C. albicans</i>     | Yes                        |
| 12                                   | Candidemia with sepsis        | Catheter, antimycobacterial treatment                                   | HAC        | ...                   | <i>C. albicans</i>     | No                         |
| 3                                    | Endocarditis                  | No  | CAC        | Oral candidiasis      | <i>Candida spp.</i>    | No                         |
| 20                                   | Urine and cerebrospinal fluid | Antimycobacterial treatment, Surgical debridement (dorsolumbar abscess) | HAC        | Oral candidiasis      | <i>C. albicans</i>     | Yes                        |

Abbreviations: CAC, community-acquired candidiasis; HAC, hospital-acquired candidiasis; IFN, interferon; VVC, vulvovaginal candidiasis.

<sup>a</sup> IFN- $\gamma$  treatment at the time of the episodes.

**Table 4. Infections and Outcome for the Interleukin 12Rβ1–Deficient Patients With or Without Candidiasis<sup>a</sup>**

| Infections and Outcomes                      | Interleukin 12Rβ1–Deficient Patients, No. (%) <sup>b</sup> |                           |
|--|--|---------------------------|
|  | Without Candidiasis (n = 96)                               | With Candidiasis (n = 32) |
| Age at last follow-up or death, mean ± SD, y | 10.9 ± 9.48 <sup>c</sup>                                   | 10.49 ± 10.06             |
| Male sex                                     | 50 (52)  | 21 (66)                   |
| Mycobacterial disease                        | 74/96 (77)   | 25/32 (78)                |
| BCG disease                                  | 59/96 (61)   | 18/32 (56)                |
| BCG resistant <sup>d</sup>                   | 18/77 (23)   | 6/24 (25)                 |
| EM disease                                   | 8/96 (8)   | 6/32 (19)                 |
| In BCG-vaccinated patients                   | 4/77 (5)   | 3/24 (12)                 |
| In patients with BCG disease                 | 2/59 (3)   | 1/18 (6)                  |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> disease    | 7/96 (7)   | 2/26 (8)                  |
| Salmonellosis                                | 35/96 (36)   | 15/32 (47)                |
| Mortality <sup>e</sup>                       | 20/96 (21)   | 19/32 (59)                |
| Mean age at death, mean ± SD, y              | 6.69 ± 8.22 y <sup>c</sup>                                 | 9.0 ± 8.54 y              |

Abbreviations: BCG, bacille Calmette–Guérin; EM, environmental mycobacteria (nontuberculous mycobacteria); SD, standard deviation.

<sup>a</sup> Data are from reference [6]; only those patients for whom information about *Candida* infection was available were included.

<sup>b</sup> Values represent No. (%) of patients unless otherwise specified.

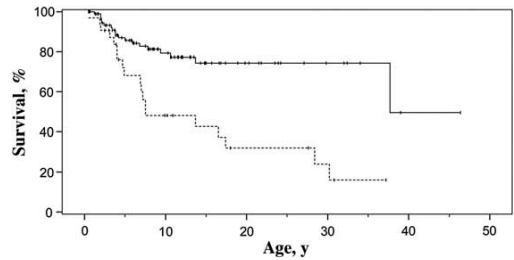
<sup>c</sup> No data were available for 1 patient.

<sup>d</sup> BCG-vaccinated patients resistant to BCG disease.

<sup>e</sup> Mortality was 23% for the 13 of the 141 patients described elsewhere [6], for whom no information about *Candida* infection was available.

infections, and/or onychomycosis due to *C. albicans* were the most common forms of mucocutaneous candidiasis in patients with AD-HIES (43%–56% of patients) [26, 27], APS-I (all patients by age 40 years and 30% in the first 2 years of life) [28, 29], or CMCD due to mutations of *IL17F*, *IL17RA* or *ACT1* or gain-of-function mutations of *STAT1* [18–22]. Oropharyngeal *C. albicans* infection was by far the most common presentation of *Candida* infection in our series of patients and was present in 6 patients at birth. Other forms of mucocutaneous candidiasis were rare in our patients. Only 3 episodes of VVC were recorded in the 9 female patients in our series. Vulvovaginal candidiasis, even if recurrent, is also common in healthy women with no known risk factors [30, 31]. In the absence of large epidemiological studies, it is probably not possible to associate the occurrence of VVC with impairments of immunity mediated by the IL-23/IL-17/interleukin 22 axis. Likewise, only 2 episodes of dermal infection were documented, and no onychomycosis was observed.

Other patients with MSMD due to mutations impairing IFN-γ-mediated responses (*IFNGR1*, *IFNGR2*, or *STAT1* deficiencies



**Figure 3.** Kaplan–Meier estimation of survival for patients with interleukin 12Rβ1 deficiency with (*dashed line*) or without (*solid line*) *Candida* infections (log-rank  $\chi^2$  14.56;  $P = .0001$ ).

due to loss-of-function alleles) do not seem to be prone to *Candida* infections, even when treated with prolonged courses of antibiotics or long-term prophylaxis [32, 33]. Overall, our data indicate a potentially causal role of IL-23/IL-17 circuit impairment, but not of IL-12/IFN-γ circuit impairment, in susceptibility to mucocutaneous candidiasis in patients with IL-12Rβ1 deficiency. The absence of onychomycosis in our patients and their lower incidence of oral and skin infections than in patients with other primary immunodeficiencies (PIDs) resulting in impaired IL-17 immunity may reflect a milder impairment of IL-17-mediated responses in patients with IL-12Rβ1 deficiency than in those with AD-HIES, APS-I, or CMCD [9, 18–22].

Esophageal candidiasis was observed in 5 patients (7 episodes) in our series. Patient 2 had esophageal candidiasis at age 25 years, coinciding with the diagnosis of SCEC, in the absence of overt predisposing factors [25]. Esophageal candidiasis is relatively common in patients with APS-I (14 of 91 Finnish patients with APS-I), but it is unusual in patients with AD-HIES [26–29, 34]. It has been suggested that there is an association between CMC and predisposition to oral and esophageal carcinomas [35]. We cannot formally exclude the possibility that candidiasis was an SCEC-predisposing factor in our patient, but the 2 conditions, candidiasis and SCEC, were diagnosed simultaneously. The IL-12/IFN-γ axis has a dramatic antitumor effect, and IL-17–producing T cells have been reported to have both anti- and protumorigenic effects [36]. Other patients with MSMD have also had cancer at young ages [25].

Most IL-12Rβ1–deficient patients continued to have recurrent or persistent OPC despite treatment with oral nystatin or fluconazole. Remarkably, fluconazole prophylaxis did not control candidiasis in 2 of 4 patients with OPC and in 1 of 2 patients with esophageal candidiasis; itraconazole prophylaxis did not eradicate candidiasis in 1 of 4 patients, but it controlled the infection in 1 patient with esophageal candidiasis. Poor

responses to treatment with azoles were found to be unrelated to resistances to these antifungals in 2 patients with OPC treated with oral fluconazole or intravenous fluconazole. Likewise, itraconazole and fluconazole prophylaxis did not control esophageal candidiasis by a *C. albicans* strain sensitive to both drugs. No antifungal prophylaxis was documented in patients without candidiasis. (For a proposal of antifungal treatment in IL-12R $\beta$ 1-deficient patients with candidiasis see Supplementary Material 3 [37].)

Remarkably, disseminated candidiasis was observed in 4 of our 35 patients, with a total of 5 episodes. Three of these 5 episodes were nosocomial, and the clinical course of the invasive candidiasis in patient 20 does not exclude the possibility that it was hospital acquired. However, 1 patient had disseminated community-acquired candidiasis in the absence of predisposing factors other than the PID. Disseminated candidiasis is extremely rare in patients with APS-I, AD-HIES, or CMCD and is thought to be nosocomial [26–29, 34, 38]. Likewise, patients with isolated inborn errors of IL-17 or IFN- $\gamma$  immunity do not seem to display invasive candidiasis, even though the latter also have severe mycobacterial and salmonella infections and often require similar in-hospital procedures [32, 33]. By contrast, invasive and fatal *Candida* infections, such as meningeal candidiasis, are observed in patients with CARD9 deficiency, the only known PID conferring a predisposition to invasive candidiasis. However, CARD9 deficiency may impair several immune responses to *Candida* and other fungi through mechanisms other than the impaired IL-17-mediated immunity [16, 17].

We acknowledge several limitations to our study. First, no data were available on the occurrence of candidiasis in 13 previously reported patients [6]. In addition, we cannot exclude the possibility that some episodes, particularly of OPC, were treated by primary care physicians and that they were not reported to the physicians providing care at tertiary hospitals. Second, 16 of the 35 patients studied were from a single country (Turkey), which could bias our data. However, the remaining 19 patients were from 13 countries in Europe, Africa, North and South America, and the Middle East. Third, it is difficult to know whether some episodes of candidiasis were only consequence of the PID or could have been secondary to other factors, such as hospital exposure, particularly in patients with invasive candidiasis who underwent surgery or in those with central lines. Fourth, our data suggest that IL-12R $\beta$ 1-deficient patient with candidiasis may have a poorer prognosis than those without candidiasis. However, there is not enough information to ascertain whether the groups of patients with or without candidiasis were comparable in terms of severity, exposure to healthcare, or other comorbid conditions; therefore, a causal relationship cannot be established.

Immune responses to *Candida* are anatomically compartmentalized, and the roles of the IL-12/IFN- $\gamma$  and IL-23/IL-17

circuits in predisposition to invasive candidiasis remain unclear [21, 30, 31, 39, 40]. In a mouse model of oral infection, the IL-12/IFN- $\gamma$  circuit was found to be more relevant than the IL-23/IL-17 axis for limiting the invasiveness of the fungus beyond the oral cavity [30, 31]. Thus, the pathogenesis of invasive candidiasis may involve the combined impairment of IL-17 and IFN- $\gamma$  immunity, as in IL-12R $\beta$ 1-deficient patients. However, candidemia is the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infections in much of the developed world [37]. Further data are needed to draw firm conclusions about susceptibility to invasive candidiasis in IL-12R $\beta$ 1-deficient patients. Finally, our data expand the known infectious phenotype of IL-12R $\beta$ 1 deficiency and indicate that candidiasis may be the first clinical manifestation in IL-12R $\beta$ 1-deficient patients.

## Notes

**Acknowledgments.** We thank the patients and their families for their trust.

**Author contributions.** M. O., I. S., E. H. R., J. B., C. P., S. B. D., L. A., J. L. C., and C. R. G. performed the research and analyzed and interpreted data. O. S., A. I., I. T., F. D., S. P. S., M. K., G. T., C. N., E. C., D. K., J. L., N. Kutukculer, C. A., M. Bhatti, N. Karaca, R. B., A. B., E. G., J. L. F., N. P., I. R., A. Strickler, A. Shcherbina, A. Somer, A. Segal, A. A. M., J. L. L. F., M. Bejaoui, M. B. D. V., S. K., T. S., and I. B. M. were responsible for the clinical evaluation of the patients and also collected data. J. L. C. and C. R. G. designed the research, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript, and M. O. collaborated in the writing of the manuscript.

**Disclaimer.** The sponsors of the study had no role in its design, the collection, analysis, and interpretation of the data, or the writing of the manuscript.

**Financial support.** This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Economía y Competitividad (grants PI06/1031 and PI10/01718), the European Regional Development Fund–European Social Fund (FEDER-FSE), Fundación Canaria de Investigación y Salud (Canarian government; INREDCAN 05/06), Fundación Caja Rural de Canarias-Chil y Naranjo (research prize 2004), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (fellowship to E. H. R.), INSERM, University Paris Descartes, Rockefeller University, National Center for Research Resources and the National Center for Advancing Sciences of the National Institutes of Health (grant 8UL1TR000043), Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant ANR-10-LABX-62-IBEID), the European Research Council, Agence Nationale de la Recherche (grant GENCMCD 11-BSV3-005-01), the St Giles Foundation, the Candidosor Association, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (grants 69992 and 182817).

**Potential conflicts of interest.** All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

1. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chappieg A, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* 2006; 18:347–61.
2. Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, et al. Mycobacterial disease and impaired IFN- $\gamma$  immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science* 2012; 337:1684–8.
3. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, et al. *IRF8* mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med* 2011; 365:127–38.

4. Bustamante J, Arias AA, Vogt G, et al. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat Immunol* **2011**; 12:213–21.
5. Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, et al. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med* **2003**; 197:527–35.
6. de Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J, et al. Revisiting human IL-12Rbeta1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine (Baltimore)* **2010**; 89:381–402.
7. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **2003**; 19:641–4.
8. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **2009**; 27:485–517.
9. de Beaucoudrey L, Puel A, Filipe-Santos O, et al. Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. *J Exp Med* **2008**; 205:1543–50.
10. MacLennan C, Fieschi C, Lammas DA, et al. Interleukin (IL)-12 and IL-23 are key cytokines for immunity against *Salmonella* in humans. *J Infect Dis* **2004**; 190:1755–7.
11. Prando C, Samarina A, Bustamante J, et al. Inherited IL-12p40 deficiency: genetic, immunologic, and clinical features of 49 patients from 30 kindreds. *Medicine (Baltimore)* **2013**; 92:109–22.
12. Puel A, Doffinger R, Natividad A, et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* **2010**; 207:291–7.
13. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KI, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* **2010**; 207:299–308.
14. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* **2007**; 448:1058–62.
15. Chandesaris MO, Melki I, Natividad A, et al. Autosomal dominant STAT3 deficiency and hyper-IgE syndrome: molecular, cellular, and clinical features from a French national survey. *Medicine (Baltimore)* **2012**; 91:e1–19.
16. Puel A, Cypowyj S, Maródi L, Abel L, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2012**; 12:616–22.
17. Lantermier F, Pathan S, Vincent QB, et al. Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. *N Engl J Med* **2013**; 369:1704–14.
18. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* **2011**; 332:65–8.
19. van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A, et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* **2011**; 365:54–61.
20. Liu L, Okada S, Kong XF, et al. Gain-of-function human *STAT1* mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* **2011**; 208:1635–48.
21. Cypowyj S, Picard C, Maródi L, Casanova JL, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* **2012**; 42:2246–54.
22. Boisson B, Wang C, Pedergnana V, et al. An ACT1 mutation selectively abolishes interleukin-17 responses in humans with chronic mucocutaneous candidiasis. *Immunity* **2013**; 39:676–86.
23. Aytekin C, Dogu F, Tuygun N, et al. Bacille Calmette-Guérin lymphadenitis and recurrent oral candidiasis in an infant with a new mutation leading to interleukin-12 receptor beta-1 deficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol* **2011**; 21:401–4.
24. Potjewijd J, de Paus RA, van Wengen A, Damoiseaux J, Verbon A, van de Vosse E. Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in a patient with a novel partial interleukin-12/23 receptor  $\beta$ 1 deficiency. *Clin Immunol* **2012**; 144:83–6.
25. Cardenes M, Angel-Moreno A, Fieschi C, et al. Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R beta 1 deficiency. *J Med Genet* **2010**; 47:635–7.
26. Schimke LF, Sawalle-Belohradsky J, Roesler J, et al. Diagnostic approach to the hyper-IgE syndromes: immunologic and clinical key findings to differentiate hyper-IgE syndromes from atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **2010**; 126:611–7.
27. Woellner C, Gertz EM, Schäffer AA, et al. Mutations in *STAT3* and diagnostic guidelines for hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* **2010**; 125:424–32.
28. Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* **2006**; 91:2843–50.
29. Betterle C, Greggio NA, Volpato M. Clinical review 93: autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* **1998**; 83:1049–55.
30. Pirofski LA, Casadevall A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Exp Med* **2009**; 206:269–73.
31. Conti HR, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect* **2010**; 12:518–27.
32. Dorman SE, Picard C, Lammas D, et al. Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet* **2004**; 364:2113–21.
33. Sologuren I, Boisson-Dupuis S, Pestano J, et al. Partial recessive IFN-gammaR1 deficiency: genetic, immunological and clinical features of 14 patients from 11 kindreds. *Hum Mol Genet* **2011**; 20:1509–23.
34. Kirkpatrick CH. Chronic mucocutaneous candidiasis. *Pediatr Infect Dis J* **2001**; 20:197–206.
35. Rosa DD, Pasqualotto AC, Denning DW. Chronic mucocutaneous candidiasis and oesophageal cancer. *Med Mycol* **2008**; 46:85–91.
36. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2010**; 10:248–56.
37. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2009**; 48:503–35.
38. Freeman AF, Holland SM. The hyper-IgE syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am* **2008**; 28:277–91, viii.
39. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* **2004**; 190:624–31.
40. Lin L, Ibrahim AS, Xu X, et al. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog* **2009**; 5:e1000703.

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **Supplementary Table 1**

Infectious diseases in reported patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency

### **Supplementary Material 2**

Invasive episodes of *Candida* infection in patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency

### **Supplementary Material 3**

Recommendations for the treatment of candidiasis in IL-12R $\beta$ 1-deficient patients

### **Supplementary Material References**

### **Supplementary Figures**

**Supplementary Table 1. Infectious diseases in reported patients with IL-12Rβ1 deficiency**

| Ref.           | Patients        | BCG vaccination | BCG disease | EM disease    | <i>M. tuberculosis</i> | Salmonellosis | Candidiasis              | Other infections  |
|----------------|-----------------|-----------------|-------------|---------------|------------------------|---------------|--------------------------|---|
| 1 <sup>a</sup> | 141 patients    | 108 patients    | 89 patients | 21 patients   | 9 patients             | 57 patients   | 32 patients <sup>b</sup> | <i>N. nova</i> (1),<br><i>T. gondii</i> chorioretinitis (1),<br><i>Toxoplasma</i> retinitis (1),<br>Disseminated <i>P. brasiliensis</i> (1),<br>Disseminated histoplasmosis (1),<br><i>K. pneumoniae</i> (4),<br><i>Klebsiella</i> spp (1),<br>Visceral leishmaniasis (1) |
| 2              | P1 <sup>c</sup> | YES             | YES         | NO            | NO                     | NO            | NO                       | NO  |
|                | P2 <sup>d</sup> | NO              | NO          | <i>M. spp</i> | NO                     | NO            | NO                       | NO  |
| 3              | P1              | NR              | NO          | <i>M. spp</i> |                        | YES           | NO                       | Disseminated <i>Nocardia</i> spp.   |
| 4              | P1 <sup>e</sup> | YES             | YES         | NO            | NO                     | NO            | NO                       | NO  |
| 5              | P1              | YES             | YES         | NO            | NO                     | YES           | NO                       | NO  |
| 6              | P1              | Probable        | NO          | <i>M. spp</i> | NO                     | NO            | NO                       | NO  |
| 7 <sup>f</sup> | P1              | YES             | YES         | NO            | NO                     | NO            | Recurrent OPC            | NO  |
| 8              | P1              | NR              | NO          | NO            | NO                     | YES           | NO                       | Disseminated <i>Coccidioides</i> spp.   |
|                | P2              | NR              | NO          | NO            | NO                     | NO            | NO                       | Disseminated <i>Coccidioides</i> spp.   |



|                 |                 |     |     |                     |                            |    |                 |    |                                    |
|-----------------|-----------------|-----|-----|---------------------|----------------------------|----|-----------------|----|------------------------------------|
| 9               | P1              | YES | NO  | NO                  | Pulmonary                  | NO | NO              | NO | Cutaneous leishmaniasis.           |
|                 | P2              | YES | NO  | NO                  | Pulmonary (6 months)       | NO | NO              | NO | Cutaneous leishmaniasis.           |
|                 | P3 <sup>g</sup> | YES | NO  | NO                  | Disseminated (6 years)     |    |                 |    |                                    |
|                 | P1              | NO  | NO  | <i>M. genavense</i> | Serofuloderma <sup>h</sup> | NO | NO              | NO | Cutaneous leishmaniasis.           |
| 10 <sup>k</sup> | P1              | NO  | NO  |                     |                            | NO | OPC, esophageal | NO |                                    |
| 11              | P1              | YES | YES | NO                  |                            | NO | Recurrent OPC   | NO |                                    |
| 12              | P1              | NR  | NO  | <i>M. spp</i>       |                            | NO |                 | NO | <i>C. neoformans</i> osteomyelitis |

BCG = Bacille Calmette-Guérin; EM: environmental micobacteria (nontuberculous mycobacteria); *N. nova*: *Nocardia nova*; *T. gondii*: *Toxoplasma gondii*; *P. brasiliensis*:

*Paracoccidioides brasiliensis*; *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; *M. spp* = patient had mycobacterial infection but the species concerned was not identified; NR; not reported; OPC: oropharyngeal candidiasis; *C. neoformans*: *Cryptococcus neoformans*.

<sup>a</sup>This reference corresponds to reference [6] in the main manuscript; <sup>b</sup> 25 of the 32 patients with candidiasis were included in our study; <sup>c</sup> Genetic confirmation of IL-12Rβ1 deficiency, S. Boisson-Dupuis personal communication; <sup>d</sup> Brother of P1. He died with unproven, suspected, IL-12Rβ1 deficiency; <sup>e</sup> Genetic confirmation of IL-12Rβ1 deficiency, D. Kumaratne and R. Doffinger personal communication; <sup>f</sup> This reference corresponds to reference [23] in the main manuscript. The patient was included in our study (P26 in Table 1 of the main manuscript); <sup>g</sup> Brother of P2, died with unproven, suspected, IL-12Rβ1 deficiency; <sup>h</sup> Suspected, unproven, tuberculosis. No microbiological confirmation. <sup>k</sup> This reference corresponds to reference [24] in the main manuscript. The patient was included in our study (P34 in Table 1 of the main manuscript); no data about candidiasis was included in the original report.

## Supplementary Material 2

*Patient 3.* This patient had recurrent oropharyngeal candidiasis (OPC), caused by *C. albicans*, from the age of seven years. At the age of 27 years, the patient consulted the Emergency Unit for fever, dyspnea, and hemoptysis. Physical examination revealed oral thrush, as well as systolic mitral and diastolic aortic murmurs. Electrocardiogram showed a negative T wave in all derivations, and Chest X rays showed cardiomegaly with images of acute pulmonary edema. Ultrasounds showed a severe aortic valve failure by sigmoid rupture and severe mitral failure with cordage rupture and image of vegetations in the mitral valve. He undergone rapid surgery, and active endocarditis with multiple vegetations on the mitral and aortic valves, with cordage rupture, was observed, requiring mitral and aortic valves replacement. Cultures of mitro-aortic valvular vegetations were positive for *Candida* of a species other than *albicans*. The infection was community-acquired and occurred in the absence of any known risk factor. P3 received i.v. amphotericin-B (1 mg/kg/day) for six weeks, and clinical remission was achieved 11 days after the start of treatment.

*Patient 9.* This patient had numerous episodes of candidiasis (OPC, vulvovaginal) since the age of four years. At the age of 27 years and two months, she suffered from sepsis. Cultures from a drain tip (for antimycobacterial treatment) and blood cultures were positive for *C. albicans*. P9 was treated with i.v. fluconazole for six weeks and the clinical response obtained was good. One month after candidemia, P9 underwent a laparotomy for ileus, during which adhesiolysis and gastro-entero(jejuno)stomy were performed, with terminal ileum resection. Cultures of intestinal tissue, ascites, stools, urine and blood were positive for *Mycobacterium avium*, but negative for *Candida*, and antimycobacterial treatment was initiated. However, from one month after laparotomy, repeated feces cultures tested positive for *C. albicans*. Ten months after laparotomy, two ileum biopsy specimens were found to be positive for *C. albicans*. The patient was treated with i.v. fluconazole and, one month later, biopsy specimen cultures were negative for *Candida*. At the age of 28 years and five months, this patient underwent allogeneic BMT. She received several courses of fluconazole before BMT, but feces cultures established during conditioning were positive for *C. glabrata*, which was treated with fluconazole. The patient died at the age of 28 years and five months, shortly after BMT.

*Patient 12.* The patient presented an episode of candidemia at the age of 17 years, whilst on antimycobacterial treatment. *C. albicans* was detected in blood cultures and a central venous line despite prophylaxis with oral itraconazole. The patient was treated with amphotericin B and caspofungin, but developed septic shock one day

later. Thereafter, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* was isolated from transtracheal aspirate and blood cultures. This bacterium accelerated the septic phase. The patient died 15 days after the onset of candidemia. Concomitant fungal and bacterial infections may have been responsible for the patient's death.

*Patient 20.* He is a male with a history of disseminated Mycobacterial infection at the age of 8 months, secondary to BCG vaccination. He had two episodes of bone infections by non-typhoidal *Salmonella* spp at the ages of 2 and 4 years. At the age of 4 years and five months he was admitted to hospital with a clinical picture characterized by weight loss, OPC, hepatosplenomegaly and multiple fistulized abscesses (neck, thorax, sacral region and pelvic limbs), in spite that he was receiving isoniazid, rifampin, ethambutol and ciprofloxacin during the past eight months. He received, through a peripheral catheter, i.v. treatment with fluconazole, Dicloxacilin and Cefotaxime during 8 days. Oral candidiasis disappeared, but three days after admission, the patient developed non-specific neurological symptoms (sleepiness, hypo activity, irritability) and seven days later a dorsolumbar abscess required debridement. A culture from the excised material was positive for *M. bovis* resistant to isoniazid, rifampin and pyrazinamide. With these findings an additional treatment with ethambutol, ciprofloxacin, prothionamide and IFN- $\gamma$  was started. During the following two weeks, a progression of neurological signs was noted. Neurological symptoms included bilateral pyramidal syndrome, with reduced velocity on conductivity of tibial nerve, and loss of legs motility, the Glasgow score was 12/15. A nuclear magnetic resonance scan showed hydrocephaly, dilatation of the lateral, third and fourth ventricles plus arachnoids inflammation with the presence of arachnoids cyst, indicating a chronic infection at the central nervous system. With this picture, a ventricular-abdominal shunt was set on patient. During the procedure, a sample for microbiological cultures was obtained, which was positive for *Mycobacterium* spp, and *Candida albicans* was identified in three consecutive cultures of CSF and in one urine culture. Patient continued with anti-mycobacterial drugs plus i.v. amphotericin-B and oral fluconazole during 4 weeks. During hospitalization, the patient suffered from hospital-acquired pneumonia, and three consecutive blood cultures were positive for *Klebsiella pneumoniae*. He was treated with piperacillin/tazobactam plus aminoglucoisid. Three weeks after the cranial surgery, patient developed clinical sings of obstruction of the ventricular-abdominal catheter, and a new surgical procedure was programmed. In spite of treatment (ciprofloxacin, streptomycin, ethambutol, prothionamide clindamycin, and recombinant human IFN- $\gamma$ ), patient's condition worsened and he developed fever, a systemic inflammatory response, wasting and neurological symptoms, like aphasia and paralysis. Patient died with signs of multi organic failure after 75 days of hospital stay at the age of 4 years and eight months old.

### Supplementary Material 3

In our experience, due to the high rate of recurrent or persistent candidiasis in patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency, the first episode of mucocutaneous candidiasis should be treated with oral fluconazole for 14-21 days. If candidiasis persists despite treatment or recurs after a period of remission, a more prolonged course of oral fluconazole is required, provided the fungal strain is susceptible to fluconazole. In patients unresponsive to fluconazole, or infected by fluconazole-resistant *Candida* isolates, switching to other azoles as itraconazole, posaconazole or voriconazole is recommended provided the strain is susceptible to those latest antifungals. In the absence of response to azoles, parenteral treatment with a lipid formulation of amphotericin B (LFAmB) or an echinocandin is recommended for azole resistant strains. Even though echinocandins or LFAmB are recommended as first line therapy in patients with invasive candidiasis [14-16], two out of the five episodes of invasive candidiasis (one episode of candidemia, and one episode of invasive infection of the ileum) in one of our patients were treated with intravenous fluconazole alone, and the patient responded to the treatment with microbiological and clinical remission. However, some situations may require other antifungals as in patients with invasive candidiasis and resistant *Candida* strains. IL-12R $\beta$ 1-deficient patients with VVC responded to standard topical treatments. Due to the low mortality associated with mucosal candidiasis, the risk of selection of fluconazole-resistant *Candida* strains, and that of drug interactions, primary prophylaxis is not recommended. Secondary prophylaxis is advisable in the most severe cases. For treatment about *Candida* infections see references 13-16.

## Supplementary Material References

1. de Beaucoudrey L., Samarina A, Bustamante J, *et al.* Revisiting human IL-12Rbeta1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine (Baltimore)* **2010**;89:381-402.
2. A. Xie N, Jiang LP, Kong XF, *et al.* Primary immunodeficiency complicated with Bacillus Calmette-Guerin infection: identification and clinical phenotype of a case of novel interleukin-12Rbeta1 gene mutation. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **2008**;46:601-4.
3. Luangwedchakarn V, Jirapongsaranuruk O, NiemeLa JE, *et al.* A novel mutation of the *IL12RB1* gene in a child with nocardiosis, recurrent salmonellosis and neurofibromatosis type I: first case report from Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol* **2009**;27:161-5.
4. Senanayake MP, Doffinger R, Kumararatne DS. Recurrent and unusual manifestations of tuberculosis in a boy with interleukin 12 receptor defect. *Ceylon Med J* **2009**;54:54-5.
5. van de Vosse E, Ottenhoff TH, de Paus RA, *et al.* *Mycobacterium bovis* BCG-it is and cervical lymphadenitis due to *Salmonella enteritidis* in a patient with complete interleukin-12/-23 receptor beta1 deficiency. *Infection* **2010**;38:128-30.
6. Schejbel L, Rasmussen EM, Kemp HB, *et al.* Combined IL-12 receptor and IgA deficiency in an adult man intestinally infested by an unknown, non-cultivable mycobacterium. *Scand J Immunol* **2011**;74:548-53.
7. Aytekin C, Dogu F, Tuygun N, *et al.* Bacille Calmette-Guérin lymphadenitis and recurrent oral candidiasis in an infant with a new mutation leading to interleukin-12 receptor beta-1 deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* **2011**;21:401-4.
8. Vinh DC, Schwartz B, Hsu AP, *et al.* Interleukin-12 receptor  $\beta$ 1 deficiency predisposing to disseminated Coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis* **2011**;52:e99-e102.
9. Boisson-Dupuis S, El Baghdadi J, Parvaneh N, *et al.* IL-12R $\beta$ 1 deficiency in two of fifty children with severe tuberculosis from Iran, Morocco, and Turkey. *PloS One* **2011**;6:e18524
10. Potjewijd J, de Paus RA, van Wengen A, Damoiseaux J, Verbon A, van de Vosse E Disseminated *Mycobacterium genavense* infection in a patient with a novel partial interleukin-12/23 receptor  $\beta$ 1 deficiency. *Clin Immunol* **2012**;144:83-6.
11. Filiz S, Kocacik Uygun DF, Verhard EM, *et al.* (2012) Cutaneous leukocytoclastic vasculitis due to *Salmonella enteritidis* in a child with interleukin-12 receptor beta-1 deficiency. *Pediatr Dermatol* [in press].

12. Jirapongsananuruk O, Luangwedchakarn V, Niemela JE, *et al.* Cryptococcal osteomyelitis in a child with a novel compound mutation of the IL12RB1 gene. *Asian Pac J Allergy Immunol* **2012**;30:79-82.
13. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2009**;48:503-35.
14. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, *et al.* ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* **2012**;18 Suppl 7:19-37.
15. Hope WW, Castagnola E, Groll AH, *et al.* ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp. *Clin Microbiol Infect* **2012**;18 Suppl 7:38-52.
16. Lortholary O, Petrikkos G, Akova M, *et al.* ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. *Clin Microbiol Infect* **2012**;18 Suppl 7:68-77.

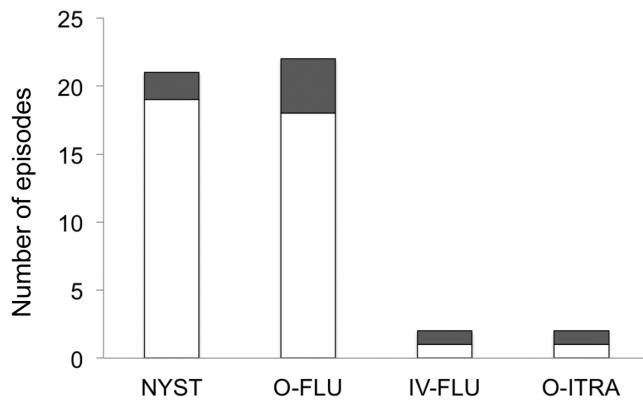
## Supplementary figures

**Supplementary Figure 1.** Poor response to antifungal treatment in IL-12R $\beta$ 1-deficient patients with oropharyngeal candidiasis.

Responses (white bars) and no responses (grey bars) to treatment were evaluated on the basis of recurrence or persistence of candidiasis after treatment. Twenty-one episodes (twenty patients) were treated with oral or topical nystatin (NYST), twenty-two (twenty patients) with oral fluconazole (O-FLU), two (two patients) with intravenous fluconazole (IV-FLU), and two (two patients) with oral itraconazole (O-ITRA). *Candida albicans* isolates from one episode in one patient who did not respond to oral nystatin were found to be resistant to this antifungal. *Candida albicans* cultured in two episodes with no response to intravenous fluconazole (one patient) or to oral fluconazole (one patient), were sensitive to fluconazole. One patient responded to intravenous fluconazole in an episode of OPC by a sensitive *C. albicans* strain.

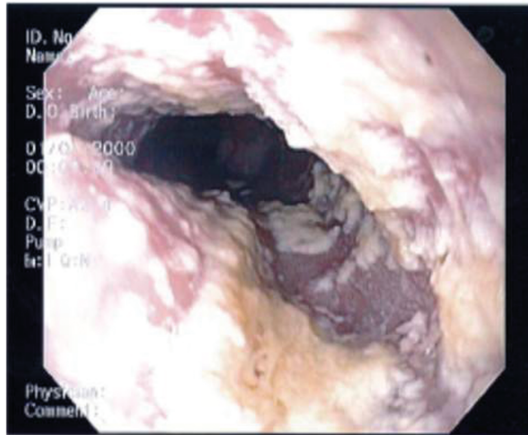
## Supplementary Figure 2.

Endoscopic image of *Candida* esophagitis in the mid-esophagus of P27 (A) and P34 (B).

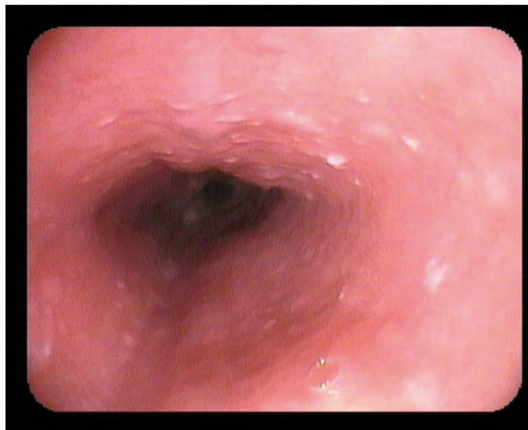


**Supplementary Figure 1**

**A**



**B**



**Supplementary Figure 2**



## Conclusiones

1. Un 25% (35/151) de los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1, presentaron infecciones por *Candida* spp.
2. La candidiasis puede ser la primera infección documentada en pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 (19 de los 35 pacientes).
3. La candidiasis orofaríngea por *C. albicans* es la presentación más común de infección por *Candida* spp. en los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 (78% de los episodios). En siete episodios de cinco pacientes se constató candidiasis esofágica. Otras formas de candidiasis mucocutánea (candidiasis vulvovaginal y candidiasis cutánea) fueron diagnosticadas en mucha menor frecuencia.
4. En cinco episodios de cuatro pacientes se documentaron infecciones invasivas por *Candida* spp. Uno de los episodios fue una infección diseminada por *C. albicans* (endocarditis) adquirido en la comunidad en un paciente sin factores de riesgo conocidos aparte de su inmunodeficiencia.
5. En pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 la candidiasis suele ser recurrente o persistente, incluso tras el tratamiento antifúngico o profilaxis secundaria.



# **Discusión general**

## DISCUSIÓN GENERAL

El eje IL-12/IFN- $\gamma$  juega un papel clave en el sistema inmunológico para, entre otras funciones, la defensa frente a micobacterias y otros microorganismos intramacrofágicos. Los defectos genéticos en el sistema IL-12/IFN- $\gamma$  se han asociado con un incremento en la susceptibilidad a infecciones por micobacterias. Hasta la fecha, se han identificado mutaciones en siete genes autosómicos (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IRF8*, *ISG15*) y en dos genes ligados al cromosoma X (*IKBKKG*, *CYBB*), implicados en MSMD. La heterogeneidad alélica resulta en la definición de hasta 18 etiologías genéticas diferentes basadas en el modo de heredabilidad, en el impacto de la mutación y en la expresión y función del alelo mutante como responsables de MSMD. La designación MSMD no recapitula todas las características clínicas, siendo también más propensos a salmonelosis y, más raramente, a infecciones por otros microorganismos intramacrofágicos, (Bustamante J *et al*, 2014; Ramirez-Alejo N *et al*, 2014; Boisson-Dupuis S *et al*, 2015).

La deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 es la etiología MSMD más común. Hasta la fecha han sido descritos 181 individuos pertenecientes a 137 familias (Bustamante J *et al*, 2014; Senanayake MP *et al*, 2015). En nuestro laboratorio se estudiaron tres pacientes relacionados de las Islas Canarias con sospecha de deficiencia de IL-12R $\beta$ 1. El caso índice presentaba infecciones recurrentes por *S. enteritidis* desde la infancia. A la edad de tres años presentó infección diseminada por *M. avium* lo que hizo sospechar un defecto en el sistema IL-12/IFN- $\gamma$ . Posteriormente se estudió a un segundo paciente (se supo que eran familiares tras el diagnóstico), un varón nacido de parientes consanguíneos en 2º grado, que presentaba salmonelosis recurrente desde la infancia, incluyendo tres episodios de osteomielitis por *Salmonella* spp.

En los estudios inmunológicos clásicos realizados al caso índice, no se observaron evidencias de laboratorio que sugirieran una inmunodeficiencia primaria. Sin embargo, los estudios realizados al segundo paciente, a la edad de 28 años, mostraron, una profunda linfopenia T. El paciente tenía en sangre periférica en el momento del estudio, 221 linfocitos T TCR $\alpha\beta$ +/mm<sup>3</sup>, 114 linfocitos T CD4/mm<sup>3</sup> y todos los linfocitos T CD4+ eran CD45R0+, lo cual es un marcador de linfocitos T de memoria. La revisión de los estudios de subpoblaciones linfocitarias realizados a este paciente mostró que los valores de linfocitos T habían disminuido progresivamente desde los primeros estudios a los 13 años

de edad. Además, los linfocitos T del paciente presentaban una respuesta proliferativa a PHA muy disminuida, con respuestas proliferativas normales a anticuerpos anti-CD3. Puesto que no se supo que estos pacientes eran familiares hasta después del diagnóstico definitivo, estos estudios sugerían en este paciente, una posible inmunodeficiencia combinada atípica o de debut tardío.

El análisis de producción de citocinas por las PBMCs de los pacientes en respuesta a mitógenos, así como la respuesta a IFN- $\gamma$ , mostró que los pacientes no producían IFN- $\gamma$  ni respondían a IL-12, mientras que producían cantidades normales de IL-2. Estos datos sugerían una posible deficiencia de IL-12R $\beta$ 1. El estudio de la expresión de receptor IL-12R $\beta$ 1 por citometría de flujo en las células de los pacientes, mediante el establecimiento de líneas de linfocitos T activados con PHA/IL-2 mostró que los pacientes no expresaban el receptor IL-12R $\beta$ 1.

Los análisis genéticos revelaron que ambos pacientes eran homocigotos para la mutación 1791+2 T>G en el gen IL12RB1. El genotipo de ambos pacientes había sido descrito previamente (Fieschi C *et al*, 2003). Un hermano de este segundo paciente había fallecido a la edad de 6 años y 11 meses como consecuencia de una infección diseminada por *S. enteritidis*. Los tres pacientes presentaron episodios de candidiasis mucocutánea. El fenotipo clínico del paciente fallecido, sugiere que también padecía una deficiencia homocigota de IL-12R $\beta$ 1.

Los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 no suelen mostrar defectos en los estudios inmunológicos clásicos. La profunda deficiencia de linfocitos T, en especial de linfocitos T CD4, del paciente adulto de la familia anteriormente descrita sugería inicialmente una inmunodeficiencia combinada de inicio tardío. Probablemente esa deficiencia de linfocitos T es debida a la cronicidad de sus infecciones y a la exhaustión del sistema inmunológico, en concreto de los linfocitos T. De hecho, prácticamente todos sus linfocitos T CD4+ eran células de memoria. Esto puede explicar la ausencia de respuesta proliferativa a PHA con respuestas normales a anticuerpos anti-CD3.

La mayoría de los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 experimentan enfermedad por micobacterias y muchos sufren salmonelosis diseminada. La penetrancia es incompleta existiendo individuos adultos sanos sin infecciones. Se estima que la penetrancia clínica de esta inmunodeficiencia a los 20 años de edad es de 79% (de Beaucoudrey L *et al*, 2010). En estos pacientes, la vacunación con BCG protege frente a posteriores infecciones por MNT, aunque no parece proteger de la tuberculosis (especie más virulenta). De hecho la enfermedad recurrente por BCG es rara (Fieschi C *et al*, 2003; Beaucoudrey L *et al*, 2010).

Por tanto, los pacientes tienen afectada la inmunidad frente a infecciones primarias causadas por especies de micobacterias, pero la inmunidad a infección por micobacterias latente o secundaria parece estar intacta. Otras infecciones presentes en estos pacientes son las debidas a patógenos como *K. pneumoniae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp., *Cryptococcus neoformans*, nocardiosis y leishmaniasis. Los pacientes con enfermedad grave causada por estos y, posiblemente, otros microorganismos deben ser investigados en relación a la deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 (Beaucoudrey L *et al*, 2010). Algunos pacientes pueden experimentar sólo enfermedad por *Salmonella* spp., sin embargo un porcentaje bajo de pacientes con deficiencia de respuesta a IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R1, IFN- $\gamma$ R2 o STAT1), sufrió de salmonelosis invasiva (Fieschi C *et al*, 2003; McLennan C *et al*, 2004). Dado que la deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 también conlleva una deficiencia en la señalización inducida por IL-23, la cual es necesaria para la expansión de linfocitos Th17, se postula que el defecto combinado de señalización por IL-23 e IL-12 confiera una mayor susceptibilidad a infección grave por salmonela en estos pacientes que en pacientes con deficiencias de respuesta a IFN- $\gamma$  (Prado C *et al*, 2013).

Nuestros tres pacientes de Gran Canaria experimentaron infecciones diseminadas recurrentes por *S. enteritidis*, y sólo uno de ellos presentó micobacteriosis. Por último, no se ha observado recurrencia de enfermedad por MNT en pacientes IL-12R $\beta$ 1 deficientes y sólo se han descrito dos casos de infecciones múltiples por MNT; uno de ellos presentó infecciones sucesivas por *M. avium*, *M. triplex* y *M. genavense* y otro pacientes tuvo infección por *M. chelonae* and *M. fortuitum*, seguido de una infección por *M. avium* (de Beaucoudrey *et al*. 2010). Sin embargo, la paciente que representó el caso índice en el estudio en Gran Canaria presentó infección recurrente y diseminada por la misma cepa de *M. avium*, tras altas dosis de corticosteroides y terapia con ciclosporina A para el tratamiento de anemia y trombocitopenia autoinmune, después de un largo periodo de remisión clínica y microbiológica, falleciendo a la edad de 7 años y 5 meses. Estos datos sugieren la necesidad de una terapia antimicobacteriana a largo plazo (o quimioprofilaxis secundaria cuando se trata de un tratamiento inmunosupresor) en pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1. Estas observaciones ponen de relieve la variabilidad en el espectro clínico de la deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 y sugieren que el ambiente y factores relacionados con el huésped, distintos de la deficiencia IL-12R $\beta$ 1, podrían influir en el fenotipo clínico de estos pacientes. Esta deficiencia, puede predisponer a formas más graves de enfermedad de lo que se creía anteriormente. Al igual que otros trastornos relacionados con MSMD, la deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 debe sospecharse en pacientes con infecciones graves o

diseminadas por micobacterias o salmonela y también en aquellos con infecciones graves por otros microorganismos de crecimiento intramacrofágico.

Un paciente de la isla de Gran Canaria con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 desarrolló un SCEC a la edad de 25 años. El SCEC no es común en el mundo desarrollado, donde la media de edad al diagnóstico es de 67 años y se relaciona frecuentemente con ingesta de alcohol y tabaco, mientras que el paciente con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 no tenía esos factores de riesgo. La frecuencia de cáncer de esófago en individuos jóvenes menores de 30 años es extremadamente rara. Nuestro paciente es el único individuo menor de 30 años diagnosticado con cáncer esofágico en las Islas Canarias en el periodo 1993-2003. Por el contrario, 14, 227 y 485 casos fueron diagnosticados para un rango de edad de 30-39, 40-59 y mayor de 60 años, respectivamente, en el mismo periodo.

Coincidente con el SCEC, el paciente presentaba también una candidiasis esofágica. Se han documentado cuatro casos de SCEC a edades jóvenes (29-42 años) en pacientes con CMCD o CMC con hipotiroidismo (2 de ellos tuvieron deficiencia selectiva de IgA) (Rosa DD *et al*, 2008; Koch D *et al*, 2009). Seis de los 91 pacientes finlandeses con APS-I han sido diagnosticados de SCC oral y esofágica a una media de edad de 37 años (29-44 años), siendo la única malignidad diagnosticada en estos pacientes (Perheentupa J *et al*, 2006). Nuestro paciente fue diagnosticado de SCEC a una edad más joven que los pacientes con APS-I, en los que el SCEC sigue típicamente a la CMC. Es plausible una relación entre la deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 y el SCEC en nuestro paciente. La incidencia de cáncer se incrementa con la edad, y la mayoría de los pacientes con deficiencia en el eje IL-12/23 son niños y adultos jóvenes. El paciente recuerda a dos individuos deficientes de IFN- $\gamma$ R1 con sarcoma de Kaposi (KS) asociado a HHV-8 y enfermedad de Hodgkin (asociada con frecuencia a infección por EBV) diagnosticados a la edad de 11 y 19 años respectivamente, así como un paciente joven con deficiencia del IFN- $\gamma$ R2 con SCC cutáneo (Camcioglu Y *et al*, 2004; Han J-Y *et al*, 2004; Toyoda H *et al*, 2010).

Más recientemente, se han diagnosticado pacientes con inmunodeficiencias primarias y cáncer. Bax *et al* (2013), describe el primer caso de linfoma de células B asociado a EBV, en un paciente con deficiencia completa de IFN- $\gamma$ R1. Los análisis inmunológicos realizados, mostraron una ausencia de expresión del IFN- $\gamma$ R1 en superficie, y una pérdida completa de respuesta a IFN- $\gamma$  *in vitro*. El paciente resultó tener una mutación que confería una deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1. A los 18 meses de edad, presentó una infección diseminada por MAC, que fue tratada con terapia antimicobacteriana. A la edad de 13 años sufrió

linfadenopatía axilar y submandibular por *M. abscessus*, siendo detectado el microorganismo en tejido y sangre y el paciente tratado con antibióticos. Sin embargo, dos años más tarde, *M. abscessus* fue detectado en varios órganos del paciente. Tras varios ciclos de terapia antimicobacteriana, los cultivos permanecían positivos para dicho microorganismo. A los 18 años, el paciente manifestó fiebre y pérdida de peso y se detectó una masa nodular con necrosis en el hígado y en el pulmón derecho. Los estudios llevados a cabo, llevaron al diagnóstico de un linfoma no Hodgkin de células B, positivo para EBV. Sin embargo, el paciente rehusó un tratamiento quimioterapéutico, en parte debido a la persistencia de la micobacteriemia y la posibilidad de empeoramiento tras el tratamiento. Finalmente, el paciente murió a los 20 años de edad, a causa de la progresión del cáncer. Además, un hermano del paciente falleció a los 6 años, debido a infección diseminada por MNT.

De entre los más de 150 pacientes con defectos en el IFN- $\gamma$ R, y sólo un caso de linfoma no Hodgkin (de los cuales un proporción importante han fallecido), sugiere que, la incidencia de linfoma no Hodgkin en pacientes con estas deficiencias IFN- $\gamma$ R, puede ser mayor que la de la población general, como se predijo en estudios previos de ratón y los estudios en humanos, constituyendo un factor de riesgo para los pacientes con predisposición a infecciones micobacterianas (Bax HI et al, 2013).

En el año 2014 se describió el primer caso de un paciente, de 11 años de edad con deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1 y germinoma intracraneal. A la edad de 2 años y 10 meses, el paciente presentó una osteomielitis multifocal por *M. scrofulaceum*. El estudio genético reveló que portaba una mutación en *IFNGR1*, que confería un defecto RC-IFN- $\gamma$ R1. El paciente respondió a la terapia antibiótica y permaneció estable clínicamente hasta los 11 años. Sin embargo, los hallazgos histológicos llevaron al diagnóstico de un germinoma intracraneal. El paciente recibió quimioterapia e irradiación local en la región pineal, experimentando un remisión completa. Tras un seguimiento de cuatro años, el paciente ha permanecido libre de tumores. En el caso de este paciente, el buen resultado posiblemente esté favorecido por el buen pronóstico global de este tipo de tumores y por la posibilidad de un adecuado tratamiento a pesar de la inmunodeficiencia (Taramasso L et al, 2014).

Tres parientes en 2º grado (todas mujeres) de una paciente noruega diagnosticada con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 (de Jong R et al, 1998), desarrollaron cáncer gástrico de tipo intestinal (Vogelaar IP et al, 2015). El estudio genético en dos de las mujeres (la otra mujer había fallecido por cáncer gástrico previo al inicio de este estudio familiar), mostró que las pacientes portaban la misma mutación en *IL12RB1* que el caso índice, aunque en



heterocigosis. Los autores también analizaron a 29 pacientes con cáncer gástrico con sospecha de una predisposición genética, basada en la historia personal y/o familiar para mutaciones en la línea germinal de los genes *IL12RB1* e *IL12RB2*. Para el análisis de las mutaciones en este grupo, se seleccionaron aquellos pacientes que fueron negativos para mutaciones en *CDH1*, puesto que es el gen de mayor susceptibilidad a cáncer gástrico (1-3% de todos los pacientes con cáncer gástrico). No se encontraron mutaciones en estos genes, en ninguno de los 29 pacientes. La paciente que representó el caso índice tampoco presentó mutaciones en *CDH1*. La incidencia de cáncer gástrico en mujeres noruegas es de 7 por cada 100.000 personas cada año. Por tanto, es poco probable que las mutaciones en *IL12RB1* e *IL12RB2* inactivadas en heterocigosis, estén implicadas con frecuencia, en la predisposición a cáncer gástrico. Sin embargo, no hay suficientes datos que determinen si las familias con mutaciones en *IL12RB1* tienen mayor riesgo de sufrir cáncer gástrico (Vogelaar IP *et al*, 2015).

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de controlar, no sólo las enfermedades infecciosas sino vigilar también la aparición de tumores, en pacientes con MSMD.

Se han descrito tasas de detección del VPH altamente divergentes en los carcinomas esofágicos de alto riesgo (tasas altas) y de bajo riesgo (tasas bajas) (Syrjanen KJ, 2002; D'Souza G *et al*, 2007). Aunque España no es área de alto riesgo para SCEC, estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de que las deficiencias en el sistema IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  puedan predisponer a tumores inducidos por virus. Sin embargo ningún ADN del VPH se amplificó de la biopsia de nuestro paciente con el Linear Array HPV (Roche®). Actualmente, la asociación entre el VPH y el SCEC sigue siendo objeto de investigación y debate. Existen numerosas publicaciones sobre las regiones de alto y bajo riesgo para carcinomas esofágicos a nivel mundial, y la fuerte asociación o no con el VPH. En gran parte, esta controversia puede deberse al diseño de los estudios, el tipo de escala y tamaño muestral utilizado. El consenso que prevalece, basado en un estudio de metaanálisis reciente, es que existe una fuerte asociación entre el VPH y SCEC. Sin embargo, parece que en una cohorte de casos, el VPH no está implicado en la patogénesis de SCEC (Liyanage SS *et al*, 2013). Es muy posible que la amplia variación sobre la implicación del VPH en el mecanismo de carcinogénesis observado en estos pacientes, pueda ser multifactorial e incluir factores ambientales, la dieta y la resistencia inmunológica a las

infecciones por VPH. Es necesario un estudio prospectivo y multicéntrico que confirme dicha asociación.

El eje de IL-12/IFN- $\gamma$  ha sido ampliamente implicado en los mecanismos de vigilancia antitumoral. Los modelos de tumor experimentales mostraron que la IL-12 tiene un efecto anti-tumoral dramático y que el IFN- $\gamma$  es crítico para la progresión de la respuesta anti-tumoral, aunque se han demostrado efectos anti-tumorales de IL-12 independientes de IFN- $\gamma$  (Colombo MP *et al*, 2002; Langrish C *et al*, 2004; Pestka S *et al*, 2004; Shi X *et al*, 2004; Dunn GP *et al*, 2006). Las células tumorales, particularmente en carcinomas esofágicos, son una diana para el IFN- $\gamma$  en el proceso de eliminación del tumor. De hecho, el desarrollo de insensibilidad a IFN- $\gamma$  es uno de los mecanismos que permite a los tumores escapar de la eliminación por la respuesta inmunológica (Dunn GP *et al*, 2006). Las deficiencias del sistema IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  pueden predisponer a cánceres no inducidos por virus, como se ha demostrado en ratón. Por ejemplo, la IL-12 ha demostrado reducir las lesiones en el ADN inducidas por radiación ultravioleta (UV), y ratones deficientes en IL-12 son más sensibles a tumores de piel inducidos por radiación UV que su homólogo normal (Meeran SM *et al*, 2006). Los pacientes deficientes en IL-12R $\beta$ 1 son también deficientes en el receptor de la IL-23 (IL-23R). La IL-23 promueve la expansión de las células Th17 polarizadas, que están reducidas en estos pacientes. Sin embargo, la IL-23 puede ejercer un papel dual en cáncer; la administración de cantidades excesivas de IL-23 está asociada con respuestas inmunológicas antitumorales significativas en modelos tumorales de ratón mientras que la IL-23 endógena se ha descrito que promueve la incidencia del tumor y el crecimiento *in vivo*. Este último efecto puede suceder a través de vías efectoras proinflamatorias y angiogénicas que nutren al tumor el cual puede ser mediado por IL-17. La expresión de IL-23, pero no la de IL-12, está incrementada en los tumores humanos, y ambas citocinas regulan antagonicamente las respuestas inflamatorias locales en el microambiente del tumor (Langowski JL *et al*, 2006; Germano G *et al*, 2008; Chen D *et al*, 2015). Un estudio reciente reveló, que el genotipo 378 GG/GC en el gen *IL12RB1*, que se asocia con una disminución de IL-12p40, puede contribuir a la susceptibilidad a cáncer de esófago (Tao YP *et al*, 2012). Estos datos y los artículos previos, apoyan que la patogénesis de tumores implica mayoritariamente daños en la inmunidad mediada por IFN- $\gamma$ , y que las deficiencias del sistema IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  podrían predisponer a cáncer.

Como se ha descrito anteriormente, los tres pacientes de Gran Canaria con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 padecieron al menos un episodio de candidiasis mucocutánea. Este hecho, unido a la observación de que aproximadamente un 25% de los pacientes con esta inmunodeficiencia descritos hasta 2010 había sufrido episodios de candidiasis (de Beaucoudrey L *et al*, 2010), fue el que originó que se realizaran estudios de candidiasis en pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1.

En la serie de 151 pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 en los que había información acerca de la presencia de candidiasis, 43 (más de un 25%) habían presentado esta complicación. Se recogió información de 76 episodios en 35 pacientes, y se pudo constatar que la candidiasis orofaríngea por *C. albicans* era la presentación más común de infección por *Candida* spp. en los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1, la cual estaba presente en 6 de los pacientes desde el nacimiento. La candidiasis esofágica se observó en 5 pacientes (7 episodios). Otras formas de candidiasis mucocutánea se presentaron con menor frecuencia. Sólo 3 episodios de candidiasis vulvovaginal fueron registradas en las 9 mujeres de esta serie de pacientes, no siendo recurrente en ninguno de los casos, y al menos un caso estuvo asociado con tratamiento inmunosupresor. Se han descrito pacientes con deficiencia de APS-I y AD-HIES que sufrieron candidiasis vulvovaginal después de la pubertad. Sin embargo, la candidiasis vulvovaginal, incluso recurrente, es también común en mujeres sanas sin factores de riesgo conocidos (Pirofski LA *et al*, 2009; Conti HR *et al*, 2010). En ausencia de estudios epidemiológicos con un mayor tamaño muestral, los cuales no son factibles actualmente, probablemente no sea posible sacar conclusiones acerca de la predisposición a candidiasis en pacientes con deficiencias del sistema IL-23/IL-17-IL-22. Por otra parte, sólo fueron documentados 2 episodios de infección cutánea y no se observó onicomycosis. En los pacientes con deficiencias en la inmunidad mediada por IL-17, las formas más comunes de CMC debido a *C. albicans* fueron la candidiasis orofaríngea, infecciones de la piel y/o la onicomycosis: 43%-56% de los pacientes con AD-HIES (Schimke LF *et al*, 2010; Woellner C *et al*, 2010), todos los pacientes a los 40 años y el 30% en los primeros 2 años de vida en pacientes con APS-I (Betterle C *et al*, 1998; Perheentupa J *et al*, 2006), y todos los pacientes con CMCD debido a mutaciones en *IL17F*, *IL17RA*, *IL17RC* (Ling Y *et al*, 2015) o *ACT1* (Boisson B *et al*, 2013). De modo similar, la mayoría de pacientes con mutaciones de ganancia de función en *STAT1* presentaron candidiasis mucocutánea, aunque pudiera haber un sesgo por selección debido a candidiasis, ya que en los últimos años se han publicado algunos pacientes que no

presentan candidiasis (Liu L *et al*, 2011; Puel A *et al*, 2011; van de Veerdonk F *et al*, 2011; Sampaio E *et al*, 2013).

En cambio, los pacientes con MSMD debido a mutaciones que dañan la respuesta mediada por IFN- $\gamma$  (deficiencias de IFN- $\gamma$ R1, IFN- $\gamma$ R2 o STAT1 con pérdida de función) no parecen ser propensos a infecciones por *Candida* spp., incluso cuando son tratados con ciclos prolongados de antibióticos o profilaxis a largo plazo (Dorman SE *et al*, 2004; Sologuren I *et al*, 2011). Estos resultados sugieren que la susceptibilidad a la candidiasis mucocutánea en los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 es debida a deficiencias en la inmunidad dependiente del circuito IL-23/IL-17 pero no de IL-12/IFN- $\gamma$ . La menor incidencia de infecciones orales y de piel y la ausencia de onicomicosis en nuestros pacientes comparado con otra IDP con un daño en la inmunidad de IL-17, puede deberse en parte a un menor deterioro de la respuesta mediada por IL-17 en pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 que en aquellos con AD-HIES, APS-I o CMCD (de Beaucoudrey L *et al*, 2008; Liu L *et al*, 2011; Puel A *et al*, 2011; van de Veerdonk F *et al*, 2011; Boisson B *et al*, 2013; Kumar N *et al*, 2014; Sharfe N *et al*, 2014)

La candidiasis diseminada ha sido documentada en 4 de los 35 pacientes, con un total de 5 episodios. Tres de los episodios fueron nosocomiales. Sin embargo, un paciente sufrió candidiasis diseminada adquirida en la comunidad en ausencia de otros factores de predisposición más que la IDP. Además, el curso clínico de la candidiasis invasiva documentada en otro paciente, no excluye que esta fuera adquirida en el hospital. En los pacientes con daño selectivo de IL-23/IL-17, la candidiasis diseminada es muy poco frecuente. De 2 series incluyendo datos históricos de 132 pacientes con APS-I, se registraron sólo 2 episodios con candidiasis diseminada de origen nosocomial. En la deficiencia AD-HIES, de las series publicadas, sólo se ha descrito 1 paciente con candidiasis diseminada nosocomial, siendo también extremadamente rara en pacientes con CMCD, y, si ocurre, es generalmente nosocomial. (Betterle C *et al*, 1998; Kirkpatrick CH, 2001; Perheentupa J *et al*, 2006; Freeman AF *et al*, 2008; Schimke LF *et al*, 2010; Woellner C *et al*, 2010). Los pacientes con defectos innatos aislados de IL-17 o IFN- $\gamma$ , no parecen mostrar candidiasis invasiva, aunque en el caso del IFN- $\gamma$ , los pacientes tienen infecciones por micobacterias y salmonela graves y con frecuencia requieren de procedimientos hospitalarios similares (Dorman SE *et al*, 2004; Sologuren I *et al*, 2011). Por el contrario, las infecciones invasivas y fatales por *Candida* spp., como la candidiasis meníngea, se observaron en pacientes con deficiencia de CARD9, la única IDP conocida, junto con la

deficiencia de CGD que predispone a candidiasis invasiva (Lanternier F et al, 2015). Es importante señalar que los pacientes con deficiencia de CARD9 a menudo presentan además infecciones graves por dermatofitos. CARD9 es un adaptador que actúa regulando los receptores de tipo C de las lectinas, tales como Dectina-1, Dectina-2 y Mincle, los cuales reconocen componentes de los carbohidratos de la pared de los hongos. Por lo tanto, la deficiencia de CARD9 podría dañar varias respuestas inmunológicas frente a *Candida* spp. y otros hongos, a través de mecanismos distintos al deterioro de la inmunidad mediada por IL-17 (Puel A et al, 2012; Lanternier F et al, 2013).

El primer episodio de la candidiasis en la serie de 35 pacientes, fue a edades más tempranas que las observadas para las infecciones definidas como MSMD clásicas, como las causadas por MNT, *M. tuberculosis*, o especies de *Salmonella* spp., y la mostrada para otras infecciones. Por el contrario, la enfermedad por vacunación con BCG indujo enfermedad a edades aún más tempranas que *Candida* spp. u otras infecciones. A pesar de ello, la candidiasis fue la primera infección documentada en 19 de los 35 pacientes, pese a la vacunación de 10 de los 19 pacientes con vacuna BGC. En conjunto, estos resultados indican que en más de un 10% de los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1, la candidiasis puede ser la primera infección que presenten.

Es importante señalar que la mayoría de los episodios de candidiasis (n=53, 70% de los episodios) correspondieron a infecciones documentadas en pacientes con candidiasis persistente o recurrente, y que la mayoría de los pacientes deficientes de IL-12R $\beta$ 1 continuaron teniendo candidiasis recurrente o persistente a pesar del tratamiento con nistatina oral o fluconazol.

Los datos obtenidos en el estudio de candidiasis en pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1, amplían el fenotipo infeccioso de esta inmunodeficiencia y sugieren que esta inmunodeficiencia debe sospecharse en pacientes con candidiasis, incluso en ausencia de infecciones por micobacterias y salmonela, pudiendo la candidiasis presentarse como la primera manifestación clínica documentada.

La tasa de mortalidad en los 35 pacientes con candidiasis (49%) fue mayor que la descrita previamente para 132 pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 sintomáticos (31,8%). Aunque no se han podido actualizar los datos para muchos de los pacientes descritos anteriormente, particularmente aquellos sin candidiasis, se analizó la mortalidad de los 128 pacientes sintomáticos deficientes de IL-12R $\beta$ 1 (de los 141 pacientes que se describen en el otro estudio) en los cuales la información sobre la infección por *Candida* spp. estaba disponible (de Beaucoudrey L et al, 2010). Las tasas de mortalidad fueron

significativamente mayores ( $P = 0.00004$ ;  $OR = 5.84$ ;  $IC\ 95\% 2.46-13.9$ ) para los pacientes con candidiasis (19 de 32 [59%]) que para aquellos sin infección por *Candida* spp. (20 de 96 [21%]). El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró que la supervivencia era significativamente menor en los pacientes con candidiasis ( $P = 0.0001$  mediante el test log-rank) que para aquellos sin infección por *Candida* spp. Por tanto, los datos también sugieren que los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 que sufren de candidiasis pueden ser más propensos a un mal pronóstico que aquellos pacientes que no sufren de candidiasis. Sin embargo, no es posible establecer un principio de causalidad para la infección por especies de *Candida* y una mayor mortalidad en estos pacientes.

Tradicionalmente, se ha considerado que la inmunidad mediada por células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  era la responsable de la defensa frente a *Candida* spp. (Romani L, 2004; Lin L *et al*, 2009). El descubrimiento en el año 2005 de una subpoblación de linfocitos T productores de IL-17, sugirió que son estas células, las Th17, las responsables de la inmunidad frente a *Candida* spp. (Huang W *et al*, 2004; Conti HR *et al*, 2009). Sin embargo, todavía existe controversia acerca del papel de las Th17 en la defensa frente a *Candida* spp. en ratón, dado que varía dependiendo por ejemplo, de la cepa e inóculo (hifas, levaduras) (Rizzetto L *et al*, 2015).

Las inmunodeficiencias primarias son un modelo ideal para descifrar el papel de componentes específicos de la inmunidad en la defensa frente a infecciones concretas en humanos en condiciones naturales. Cada vez son más los datos que indican que muchas de las observaciones realizadas en modelos murinos, principalmente en el ámbito de la inmunidad y la infección, no son extrapolables a humanos (Mestas J *et al*, 2004; Gharib SA *et al*, 2010; Davis MM, 2012 ). En el caso concreto de la candidiasis, es importante subrayar que *C. albicans* es un comensal específico de humanos pero no de ratón. Además, existen importantes diferencias en la ontogenia fenotipo y función de las Th17 de humanos y de ratón (Korn T *et al*, 2009; Pirofski LA *et al*, 2009; Zhou L *et al*, 2009; van de Veerdonk FL *et al*, 2010; Szabo EK *et al*, 2011; Cypowyj S *et al*, 2012; McGeachy MJ *et al*, 2012). Otra limitación en los modelos de ratón es la ruta de infección, puesto que en humanos la ruta natural de entrada es por vía oral, mientras que en muchos de los experimentos con ratones la infección se provoca vía gástrica o sistémica (por vía intravenosa). Es además difícil extrapolar los datos de los modelos experimentales murinos, ya que la infección por *Candida* spp. en modelos de ratón requiere grandes tamaños de inóculo, lo que probablemente genera una respuesta inmunológica aguda

primaria, un escenario que contrasta con lo observado en los seres humanos, que muestran memoria inmunológica frente al hongo y en los que la candidiasis generalmente sigue un curso crónico (Pirofski LA *et al*, 2009). Por otra parte, hoy sabemos que la defensa del sistema inmunológico frente a *Candida* spp. está anatómicamente compartimentalizada, y el papel del circuito IL-12/IFN- $\gamma$  y del IL-23/IL-17 en la predisposición a candidiasis sistémica es controvertido (Huang W *et al*, 2004; Lin L *et al*, 2009; Pirofski LA *et al*, 2009; Conti HR *et al*, 2010; Cypowyj S *et al*, 2012). En un modelo murino de infección oral, que es la ruta natural de entrada de *C. albicans* en el huésped humano, el circuito IL-12/IFN- $\gamma$  fue más importante que el circuito IL-23/IL-17 para limitar la propagación del hongo más allá de la cavidad oral y por tanto el consiguiente desarrollo de infección diseminada (Pirofski LA *et al*, 2009; Conti HR *et al*, 2010). En este modelo de ratón, el modelo experimental más fisiológico (infección oral con *C. albicans*) se vio que los ratones deficientes de IL-12 y, por tanto, deficientes en la producción de IFN- $\gamma$ , no son particularmente susceptibles a candidiasis orofaríngea, mientras que sí lo son los ratones deficientes de IL-23 o del receptor de la IL-17. Sin embargo, observaron que en este modelo de infección oral, los ratones con deficiencia de IL-12 presentaban mayor susceptibilidad a infección diseminada. Parece por tanto que el sistema IL-23/IL-17 protege frente a candidiasis orofaríngea, y los datos en humanos, así como el modelo de infección oral de ratón, sugieren que el sistema IL-12/IFN- $\gamma$  es importante para limitar la extensión de la infección por *Candida* spp. más allá de la mucosa oral, existiendo en su ausencia una predisposición a mayor susceptibilidad de infección diseminada (Conti HR *et al*, 2009). Dado que los pacientes con defectos innatos aislados de IL-17 o IFN- $\gamma$  aparentemente no muestran candidiasis sistémica, la combinación de un daño en la inmunidad mediada por IL-17 e IFN- $\gamma$ , como ocurre en los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1, podría estar implicada en la patogénesis de candidiasis invasiva. En ausencia de estudios más amplios, los cuales no son posibles en la actualidad debido al limitado número de pacientes diagnosticados, no se puede concluir si el efecto combinado de deficiencias de la inmunidad mediada por IFN- $\gamma$  e IL-17 puede predisponer en humanos a la diseminación de *Candida* spp. desde las mucosas.

En función de las mutaciones causales, la deficiencia de IFN- $\gamma$ R1 puede presentarse como una deficiencia RC, DP o RP, con importantes diferencias en los fenotipos celular y clínico así como en el pronóstico de los pacientes. Los defectos RC de IFN- $\gamma$ R1 son debidos a mutaciones que causan una ausencia de expresión de IFN- $\gamma$ R1 o la expresión de

receptores, ya sea normal o anómala, incapaces de señalar en respuesta a IFN- $\gamma$ . Como consecuencia, esta deficiencia es generalmente fatal en los primeros años de vida. La deficiencia DP de IFN- $\gamma$ R1 es causada por mutaciones en la región transmembrana de IFN- $\gamma$ R1. Debido a que estos receptores son capaces de recircular entre la membrana y el citoplasma, se acumulan en grandes cantidades en la membrana celular, por lo que las células de los pacientes muestran un aumento de expresión de IFN- $\gamma$ R1. Sin embargo, estos receptores mutados son incapaces de señalar, compitiendo con los receptores que no presentan la mutación y ejerciendo un efecto dominante negativo. Como consecuencia, los pacientes con deficiencia DP de IFN- $\gamma$ R1 presentan una forma parcial de inmunodeficiencia, mucho menos grave que la forma RC (Dorman SE *et al*, 2004). En 1997, se describió la deficiencia RP de IFN- $\gamma$ R1 en dos hermanos con una presentación clínica mucho menos grave que la deficiencia RC (Jouanguy E *et al*, 1997). Los dos pacientes presentaban la mutación p.I87T en *IFNGR1* en homocigosis. Como consecuencia de esta mutación, las células de los pacientes presentaban una expresión anómala, pero detectable en células EBV-B, de moléculas IFN- $\gamma$ R1 en membrana. Estos receptores mostraban un defecto de señalización, la cual no estaba completamente suprimida.

En el momento de realizar el trabajo presentado en esta tesis se habían descrito dos pacientes homocigotos para la mutación p.V63G procedentes de la isla de Gran Canaria, la cual se consideraba que confería una deficiencia RC de IFN- $\gamma$ R1. (Allende LM *et al*, 2001; Casanova J-L *et al*, 2002; Rosenzweig SD *et al*, 2005; Filipe-Santos O *et al*, 2006).

El defecto de producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a LPS o BCG e IFN- $\gamma$ , con una producción normal de IFN- $\gamma$  tras activación y sin otras anomalías inmunológicas, llevó a sospechar una deficiencia de activación mediada por IFN- $\gamma$  en dos hermanos que fueron nuestro caso índice. Dado que las células de los dos hermanos presentaban un defecto de expresión de IFN- $\gamma$ R1, se secuenció el gen *IFNGR1* como primera aproximación, identificándose la mutación p.V63G, la cual segregaba con la enfermedad con un patrón autosómico recesivo.

La presentación clínica de la inmunodeficiencia en alguno de los pacientes llevó a sospechar que realmente esta inmunodeficiencia representara una forma RP de la enfermedad.

Los pacientes homocigotos para p.V63G presentaban valores reducidos de IFN- $\gamma$ R1 con la mayoría de, pero no todos, los anticuerpos monoclonales ensayados. Sin embargo, este dato no es de utilidad para el diagnóstico diferencial de las deficiencias RC y RP, ya que hay mutaciones que confieren una deficiencia RC de IFN- $\gamma$ R1 que se asocian con una



expresión normal de un IFN- $\gamma$ R1 no funcional (Jouanguy E *et al*, 2000; Dorman SE *et al*, 2004). El estudio *in vitro* de unión de IFN- $\gamma$  a su receptor, así como el análisis de los eventos tempranos y tardíos de activación mediada por IFN- $\gamma$  mostraron que, efectivamente, p.V63G es un alelo hipomórfico, y que la homocigosis para la mutación p.V63G de *IFNGR1* confiere una deficiencia RP de IFN- $\gamma$ R1. En un estudio previo, utilizando líneas celulares transducidas con genes en los que se habían introducido mutaciones mediante mutagénesis dirigida, el alelo p.V63G fue descrito como una variante hipomórfica (van de Wetering D *et al*, 2010). Sin embargo, este modelo sugirió que la expresión de la variante p.V63G así como de la variante p.I87T, provocan un deterioro mucho más grave de la expresión de IFN- $\gamma$ R1 y de la activación mediada por IFN- $\gamma$ R1 que la observada en el análisis de PBMC y líneas celulares EBV-B procedentes de los pacientes.

Para el estudio mostrado en la presente tesis se desarrollaron varias técnicas *in vitro* novedosas que permiten diferenciar las deficiencias parciales de las deficiencias completas de IFN- $\gamma$ R1. En particular, el análisis mediante citometría de flujo de la unión de IFN- $\gamma$  a su receptor, así como el análisis de la producción IP-10 en respuesta a dosis crecientes de IFN- $\gamma$  y el análisis de la producción de IL-12p70 en respuesta a LPS con dosis crecientes de IFN- $\gamma$ . Estas dos últimas son considerablemente más resolutivas para el análisis diferencial de estas formas parciales frente a las formas RC, que el análisis de TNF- $\alpha$  en respuesta a dosis crecientes de LPS con dosis crecientes de IFN- $\gamma$ . De hecho, son las técnicas que utilizamos actualmente para el diagnóstico de estas inmunodeficiencias (Olbrich P *et al*, 2015).

Estas técnicas posiblemente sean útiles también para diferenciar y diagnosticar deficiencias parciales y completas de IFN- $\gamma$ R2. En el caso del análisis de eventos tempranos y tardíos de activación mediada por IFN- $\gamma$ , estas técnicas también podrían ser útiles para diferenciar formas completas y parciales de deficiencia de STAT1. Sin embargo, estas técnicas no se han ensayado en pacientes con estas inmunodeficiencias, por lo que no se puede confirmar actualmente su utilidad para su diagnóstico diferencial.

Mientras que en los individuos sanos, no se detectan concentraciones de IFN- $\gamma$  en plasma, todos los pacientes con estas formas de deficiencia de IFN- $\gamma$ R1, presentan altos niveles de IFN- $\gamma$  en plasma. Esto es debido a una expresión anómala de las moléculas de IFN- $\gamma$ R1 que lleva a un defecto de señalización del IFN- $\gamma$ , aunque esta no esté completamente suprimida. La recogida de muestras de plasma durante la infección micobacteriana, sólo fue posible en uno de los pacientes de la serie con deficiencia RP-

IFN- $\gamma$ R1 descritos en esta tesis. El paciente, homocigoto para la mutación p.V63G, presentó concentraciones de IFN- $\gamma$  en plasma excesivamente altas en los 3 días previos a su fallecimiento a la edad de 7 años y dos meses (análisis post-mortem: 15253, 25972 y 17360 pg/ml, los días 1, 2 y 3 antes del fallecimiento, respectivamente). Esto podría reflejar una alta carga micobacteriana debido a un diagnóstico tardío de la infección. Al excluir a este paciente de la comparación, no se observaron diferencias en las concentraciones séricas de IFN- $\gamma$ , entre los pacientes homocigotos para p.V63G y p.I87T. Estos datos contrastan con los niveles muy altos de IFN- $\gamma$  observados en los pacientes con RC-IFN- $\gamma$ R1. Sin embargo, en los pacientes con DP-IFN- $\gamma$  la concentración de IFN- $\gamma$  en plasma es indetectable. Por tanto, parece que los niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$ , son un buen indicador en el curso de infecciones graves, y de enfermedades micobacterianas, en particular, tanto en pacientes con deficiencia de RP-IFN- $\gamma$ R1 como en pacientes con deficiencia de RC-IFN- $\gamma$ R1 (Fieschi C *et al*, 2001; Sologuren I *et al*, 2011).

Previamente se había descrito, a raíz del estudio de dos hermanos afectados de MSMD, que la mutación p.I87T de *IFNGR1* en homocigosis confería una deficiencia RP de IFN- $\gamma$ R1 (Jouanguy E *et al*, 1997). Los ensayos de translocación de STAT-1 al núcleo en células EBV-B estimuladas con IFN- $\gamma$ , mostraron que las células de los pacientes homocigotos para p.V63G presentan una disminución de la translocación a concentraciones intermedias de IFN- $\gamma$ , aunque la translocación de STAT-1 era detectable. Sin embargo, a concentraciones altas de IFN- $\gamma$ , la translocación de STAT-1 al núcleo era normal. Al comparar las células EBV-B de pacientes homocigotos para p.V63G y p.I87T, se observaron niveles más bajos de translocación de STAT-1 al núcleo en las células EBV-B p.V63G que en las células EBV-B p.I87T cuando ambas líneas celulares se estimularon con concentraciones intermedias de IFN- $\gamma$ , aunque esta diferencia no fue significativa. A altas concentraciones de IFN- $\gamma$  no se observaron diferencias de translocación de STAT-1 al núcleo entre las dos líneas celulares. En un estudio previo, se vio que las células EBV-B de un paciente con deficiencia DP-IFN- $\gamma$ R1, respondía mal a concentraciones intermedias y altas de IFN- $\gamma$ , con un nivel de meseta a concentraciones intermedias (Dupuis S *et al*, 2000). Los resultados presentados en esta tesis muestran, que las mutaciones p.V63G y p.I87T dan lugar a un fenotipo celular menos grave que las mutaciones responsables de la deficiencia DP de IFN- $\gamma$ R1.

Recientemente, se ha detectado en un paciente una mutación en homocigosis que afecta al codón de inicio (M1K) y confiere un forma parcial de enfermedad (Kong XF *et al*, 2010). El impacto de esta mutación depende del tipo celular y del tejido. No se encontró

expresión y funcionalidad del IFN- $\gamma$ R1 en los fibroblastos del paciente. Sin embargo, sí se detectó expresión del IFN- $\gamma$ R1 en las células EBV-B del paciente que, aunque presentaban una respuesta débil a IFN- $\gamma$ , ésta no estaba suprimida. El fenotipo clínico de esta paciente es más grave que el de los pacientes descritos previamente con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ . La paciente fue vacunada con BCG al nacer, y sufrió infecciones graves micobacterianas causadas por BCG y *M. avium*. Esta paciente, al igual que los pacientes con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ , presentó niveles altos de IFN- $\gamma$  en plasma (Kong XF *et al*, 2010).

En vista de las importantes implicaciones de pronóstico y tratamiento, es indispensable un meticuloso diagnóstico inmunológico y molecular en pacientes con deficiencia de IFN- $\gamma$ R1, analizando la respuesta a dosis crecientes de IFN- $\gamma$ .

Debido a la ocurrencia de la mutación p.V63G en homocigosis en pacientes de 5 familias de la isla de Gran Canaria, se realizó el análisis de un posible efecto fundador, el cual se realizó también para la mutación p.I87T. El estudio mostró que ambas mutaciones provienen de un efecto fundador. El MRCA para la mutación p.V63G vivió probablemente hace aproximadamente 500 (200-1275) años, mientras que para la mutación p.I87T el MRCA se estima que vivió hace unos 1600 (875-2950) años.

Los estudios basados en marcadores autosómicos en la población actual de Gran Canaria destacan a una fuerte influencia europea, en su mayoría de la Península Ibérica (Fregel R *et al*, 2009). Pero debido a una fuerte asimetría sexual consecuencia de la descendencia procedente del cruce entre hombres de origen europeo y mujeres indígenas de origen bereber procedentes del noreste africano, hay una contribución autóctona, sobre todo de linajes maternos. Para determinar el origen más probable de las familias que portan la mutación p.V63G se analizó la variación del haplotipo para la uniparentalidad heredada del cromosoma Y, y el ADN mitocondrial (ADNmt). Los datos obtenidos son consistentes con la historia de colonización de las Islas Canarias. El MRCA para los pacientes p.V63G se remonta a la colonización de las Islas Canarias por los europeos, en su mayoría de España (finales del siglo XV y XVI). Esto, junto con el mayor conocimiento de la contribución genética de España a la población de las islas, sugiere que esta mutación llegó con un colono de la Península Ibérica, probablemente de España. Sin embargo, el archipiélago canario fue probablemente poblado primero por colonos del noroeste africano de origen bereber, en el primer milenio antes de Cristo, observándose además un sustrato aborigen que también se observa en la población actual de las Islas Canarias. De hecho, los análisis de marcadores heredados uniparentalmente revelan una fuerte asimetría sexual,

con descendencia procedente del cruce de hombres europeos y mujeres indígenas. El probable origen europeo del cromosoma Y en los pacientes de sexo masculino es consistente con la hipótesis de una mutación traída por un colono español masculino entre el siglo XV o XVI (Maca-Meyer N *et al*, 2004; Fregel R *et al*, 2009b).

Es difícil identificar una hipótesis única más probable sobre las migraciones bajo el efecto fundador de p.I87T. Sin embargo, las Azores fueron pobladas a principios del siglo XV, antes de la ola de emigración a Sudamérica, de acuerdo con la estimación de que el paciente de las Azores está relacionado más lejanamente con los pacientes de Portugal que con los chilenos.

Clinicamente, los pacientes descritos con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 tienen un fenotipo clínico mucho menos grave que los pacientes con deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1 (Dorman SE *et al*, 2004; Rosenzweig SD *et al*, 2005; Filipe-Santos O *et al*, 2006). Los pacientes sufrieron de infecciones por micobacterias causadas por BCG y/o MNT (*M. avium*, *M. avium complex*, *M. abscessus*, *M. szulgai*). La primera enfermedad por MNT comienza en la niñez, pero se produce más tarde en los pacientes con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 que en los pacientes con deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1, aunque la edad de inicio fue similar en los pacientes con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 y en aquellos con deficiencia DP-IFN- $\gamma$ R1. Nueve pacientes con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 desarrollaron osteomielitis, siendo la única presentación en cuatro de los pacientes, al menos en el momento del diagnóstico. Los pacientes con la mutación p.V63G descrita en un estudio anterior también sufrieron de osteomielitis por *M. avium* y *M. szulgai* como única presentación (Jouanguy E *et al*, 1997). El 72% de los pacientes con DP-IFN- $\gamma$ R1 presentaron osteomielitis, en algunos de ellos, incluso sin afectación en otros órganos. Sin embargo, no se han detectado infecciones con afectación ósea en los pacientes con deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1 (Allende LM *et al*, 2001; Dorman SE *et al*, 2004; Okada S *et al*, 2007; Lee WI *et al*, 2009; Sologuren I *et al*, 2011; Roesler J *et al*, 2011; Bustamante J *et al*, 2014; Rose DM *et al*, 2014).

En cinco pacientes con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1, la vacunación con BCG fue la causa de enfermedad por BCG, aunque un paciente había sido vacunado en la infancia sin complicaciones. De igual forma, la penetrancia de la enfermedad asociada a la vacuna BCG en pacientes con deficiencia DP-IFN- $\gamma$ R1 fue alta aunque no completa, mientras que todos los pacientes con deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1 vacunados con BCG desarrollaron enfermedad por BCG. Los pacientes con deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1 sufrieron enfermedad

crónica diseminada por micobacterias que no se resolvió con tratamiento y padecieron recurrencias tras la interrupción de antibióticos. El trasplante de médula ósea es el único tratamiento curativo eficaz para estos pacientes (Roesler J *et al*, 2004; Rosenzweig SD *et al*, 2005; Filipe-Santos O *et al*, 2006; Chantrain CF *et al*, 2006; Olbrich P *et al*, 2015). Al igual que los pacientes con deficiencia DP-IFN- $\gamma$ R1, los pacientes con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 tuvieron infecciones micobacterianas que se resolvieron rápidamente con un tratamiento adecuado. Incluso en ausencia de profilaxis, la infección recurrente o múltiple por micobacterias sólo fue observada en un paciente con *M. abscessus* multirresistente (II. 1), que recibió un ciclo corto de tratamiento antimicobacteriano debido a su toxicidad. El tratamiento recomendado en estos pacientes para la enfermedad micobacteriana es un uso prolongado de antibióticos, e IFN- $\gamma$  si es requerido. El trasplante de médula ósea no está indicado y no se requiere de profilaxis con antibióticos. Esta presentación contrasta con la del paciente homocigoto para la mutación M1K, descrita más recientemente, el cual presenta una deficiencia mucho más grave que la conferida por las mutaciones p.V63G y p.I87T y requirió un trasplante de progenitores hematopoyéticos (Kong XF *et al*, 2010; Bustamante J *et al*, 2014). En pacientes con deficiencia DP-IFN- $\gamma$ R1, se ha observado que la tasa de recaída por micobacterias es alta (Rosenzweig SD *et al*, 2005; Filipe-Santos O *et al*, 2006), y la enfermedad causada por MNT con presentación inicial en edades tardías es frecuente en pacientes con deficiencia DP-IFN- $\gamma$ R1 (Dorman SE *et al*, 2004). Estos datos indican que los defectos RP-IFN- $\gamma$ R1 confieren un fenotipo clínico menos grave que los defectos RC-IFN- $\gamma$ R1 y, probablemente, que los observados en pacientes con defectos DP-IFN- $\gamma$ R1, debido a la alta tasa de recaída por micobacterias que presentan éstos últimos. Los hallazgos encontrados en nuestros pacientes, resaltan una estrecha correlación entre el genotipo *IFNGR1*, el fenotipo celular sobre capacidad de respuesta de IFN- $\gamma$  y el fenotipo clínico.

En cuanto al pronóstico de la enfermedad, 17 (58%) de los 31 pacientes diagnosticados hasta el año 2014, con deficiencia RC-IFN- $\gamma$ R1 fallecieron, incluyendo cuatro muertes tras el trasplante de médula ósea. Sólo cuatro de los 22 pacientes descritos hasta 2004 llegaron a la edad de 12 años. En el año 2007 un paciente llegó a la edad de 19 años. Este había sufrido seis episodios de infección por micobacterias que se trataron con antibióticos de 6 a 9 meses para cada uno de los episodios (Newport MJ *et al*, 1996; Altare F *et al*, 1998; Holland SM *et al*, 1998; Roesler J *et al*, 1999; Noordzij JG *et al*, 2007; Bustamante J *et al*, 2014). Sólo 1 paciente de los 68 descritos con deficiencia DP-IFN- $\gamma$ R1, ha fallecido y varios pacientes han alcanzado o han sido diagnosticados en la edad adulta.

El paciente con más edad descrito en el año 2004 alcanzó los 62 años (Jouanguy E *et al*, 1999b; Dorman SE *et al*, 2004; Rosenzweig SD *et al*, 2004; Okada S *et al*, 2007; Lee WI *et al*, 2009; Roesler J *et al*, 2011; Bustamante J *et al*, 2014). Los pocos pacientes con deficiencia RC o RP de IFN- $\gamma$ R1 descritos desde entonces sugieren el mismo escenario. Por el contrario, 14 de los 16 pacientes con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 debido a mutaciones p.V63G y p.I87T, están vivos. Los estudios realizados no permiten saber cuál de las dos mutaciones estudiadas en la deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 (p.V63G y p.I87T) confiere un fenotipo más grave. La heterogeneidad clínica en estos pacientes, incluso entre individuos homocigotos para la misma mutación, podría ser debida a varios factores, incluyendo diferencias en la exposición ambiental, el tipo de microorganismo, la virulencia y la resistencia antibiótica de las distintas cepas, o a un retraso en el diagnóstico y adecuado tratamiento antibiótico. La variabilidad del huésped para otros genes, también podría influir en la respuesta inmunológica de estos pacientes.

En los pacientes con RP-IFN- $\gamma$ R1 debido a mutaciones p.V63G y p.I87T se identificaron infecciones por bacterias (*M. tuberculosis*, n=1; *M. avium*, n=3; *M. abscessus*, n=1; *Haemophilus influenzae*, n=1; *K. pneumoniae*, n=1; *Legionella* spp., n=1; *Shigella sonnei*, n=1; *Salmonella* spp., n=3; *Mycoplasma pneumoniae*, n=2), virus (VZV, n=2; VRS, n=1; *Molluscum contagiosum*, n=1), y parásitos (*Cryptosporidium* spp. n=1; *Toxoplasma gondii*, n=1). En el caso concreto de las infecciones virales, al menos las infecciones por VZV, ocurridas de forma natural en pacientes no vacunados, siguieron un curso clínico normal y autolimitado. Uno de los pacientes homocigotos para la mutación p.V63G fue diagnosticado de osteomielitis multifocal por *M. avium* a la edad de 33 meses, dio positivo para EBV y HHV8 en los análisis serológicos. Sin embargo este paciente no tuvo manifestaciones clínicas reseñables que caracterizan a la infección por estos virus. Esto indica que la deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 no predispone a infecciones por virus. Un hermano de uno de los pacientes homocigotos para p.V63G murió a la edad de 10 años a causa de una meningitis por *M. bovis* (causada por una cepa distinta de BCG) (Allende LM *et al*, 2001). Un paciente homocigoto para p.I87T presentó una tuberculosis clínica a la edad de 3 años y una neumonitis por *M. pneumoniae* a los 6 años de edad (Jouanguy E *et al*, 1997). La presentación de estos pacientes sugiere que, al igual que los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 (de Beaucoudrey L *et al*, 2010), los pacientes con deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 pueden presentarse con tuberculosis clínica.

Esta primera serie de pacientes demuestra que la deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 no se limita al único paciente publicado en 1997 (Jouanguy E *et al*, 1997). Todos los niños de Gran

Canaria con infecciones por MNT presentaron defectos en el sistema IL-12/IFN- $\gamma$ . Cuatro de los cinco niños diagnosticados con infección diseminada por MNT entre 1997-2009, tuvieron deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 y un niño sufrió deficiencia de IL-12R $\beta$ 1. Además dos pacientes adultos con infección diseminada por micobacterias (probablemente por MNT), y un adulto con infecciones extraintestinales recurrentes por especies de *Salmonella* (principalmente *S. enteritidis*), fueron diagnosticados durante el mismo periodo. Estos resultados sugieren que las deficiencias del sistema IL-12/IFN- $\gamma$ , como la deficiencia RP-IFN- $\gamma$ R1 o la deficiencia de IL-12R $\beta$ 1, son más frecuentes de lo sospechado inicialmente y deben ser consideradas en niños y adultos con enfermedad por micobacterias y salmonela, incluso en adultos sin otras infecciones previas.

Los estudios realizados en pacientes con MSMD han ayudado a revelar el importante papel que juega el sistema IL-12/IFN- $\gamma$  en humanos en la defensa frente a micobacterias y salmonela y la importancia del sistema IL-23/IL-17 en la defensa frente a *Candida* spp. en mucosas. Los datos de los que se dispone actualmente, pueden sugerir también que las deficiencias en componentes del sistema IL-12/IFN- $\gamma$  podrían predisponer a cáncer en edades jóvenes.

Los estudios realizados en pacientes con MSMD también han puesto de manifiesto que los estudios *in vitro* no sólo facilitan el diagnóstico y el asesoramiento genético, sino que informan sobre el manejo clínico y el pronóstico del paciente, y ayudan a predecir la efectividad de las terapias adyuvantes.





# **Conclusiones generales**

## CONCLUSIONES GENERALES

### **Base molecular y consecuencias clínicas de la deficiencia de IL-12R $\beta$ 1.**

1. Se ha identificado una mutación en homocigosis en *IL12RB1* en tres pacientes relacionados de las Islas Canarias con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1.
2. En algunos pacientes con defectos en el eje IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$ , la infección por salmonela es la única infección grave documentada.
3. Los trastornos del sistema IL-12-IL-23/IFN- $\gamma$  pueden predisponer a cáncer en edades jóvenes.

### **Predisposición a candidiasis en pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1.**

4. La deficiencia de IL-12R $\beta$ 1 predispone a candidiasis.
5. La presentación más común de infección por *Candida* spp. en los pacientes con deficiencia de IL-12R $\beta$ 1, es la candidiasis orofaríngea por *C. albicans*, aunque pueden presentarse otras formas de candidiasis mucocutánea, como la candidiasis esofágica, candidiasis vulvovaginal, candidiasis cutánea y raramente candidiasis diseminada.
6. La candidiasis en estos pacientes es en su mayoría recurrente o persistente a pesar del tratamiento antifúngico oral o intravenoso.

## Base molecular y consecuencias clínicas de la deficiencia recesiva parcial de IFN- $\gamma$ R1.

7. Se ha detectado una mutación en *IFNGR1* (p.V63G) en cinco pacientes de cuatro familias de Gran Canaria.
8. Aunque previamente se pensaba que la mutación p.V63G era responsable de un defecto recesivo completo de IFN- $\gamma$ R1, se ha demostrado que la homocigosidad para p.V63G confiere un defecto recesivo parcial de IFN- $\gamma$ R1.
9. Se han desarrollado nuevas técnicas para el diagnóstico de deficiencias debidas a defectos de señalización mediada por el receptor de IFN- $\gamma$ . Entre estas técnicas, están las basadas en la citometría de flujo, en particular el análisis de unión de IFN- $\gamma$  a su receptor y el análisis de la producción de IL-12p70 y de IP-10 en respuesta a dosis crecientes de IFN- $\gamma$ .
10. La detección de la expresión de IFN- $\gamma$ R1 y el análisis de respuesta a IFN- $\gamma$  *in vitro*, facilitan el diagnóstico, ayudan a diferenciar entre las distintas formas de deficiencia de IFN- $\gamma$ R1 existentes (RC, DP y RP), y predicen la efectividad de las terapias adyuvantes.
11. La mutación p.V63G es el resultado de un efecto fundador con una edad estimada para el ancestro común más reciente (MRCA) de 500 (200-1275) años.
12. El MRCA de los pacientes con deficiencia parcial de IFN- $\gamma$ R1 de Chile, Portugal y Polonia, homocigotos para la mutación p.I87T se estima que ha vivido hace 1600 (875-2950) años.
13. Los defectos RP-IFN- $\gamma$ R1 debidos a homocigosidad para las mutaciones p.V63G y p.I87T confieren un fenotipo clínico menos grave que los defectos RC-IFN- $\gamma$ R1 y probablemente que los observados en pacientes con DP-IFN- $\gamma$ R1.
14. Las deficiencias responsables de MSMD pueden ser más comunes de lo que se pensaba inicialmente y deben ser consideradas tanto en niños como en adultos que

presenten infecciones diseminadas por micobacterias, especialmente micobacterias no tuberculosas.

# **Bibliografía**

## BIBLIOGRAFÍA

Abdullah Z, Knolle PA. Scaling of immune responses against intracellular bacterial infection. *EMBO J* 2014;**33**:2283–94.

Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA *et al*. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014;**369**:20130428

Acosta-Rodriguez E V, Napolitani G, Lanzavecchia A *et al*. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007b;**8**:942–9.

Acosta-Rodriguez E V, Rivino L, Geginat J *et al*. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;**8**:639–46.

Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL *et al*. Primary immunodeficiency diseases: An update on the classification from the International Union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2014;**5**:1–33.

Al-Muhsen S, Casanova J-L. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:1043–51.

Alcaïs A, Abel L, Casanova J. Review series Human genetics of infectious diseases : between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest* 2009;**119**:2506–14.

Alcaïs A, Fieschi C, Abel L *et al*. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med* 2005;**202**:1617–21.

Altare F, Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S *et al*. A causative relationship between mutant IFN $\gamma$ R1 alleles and impaired cellular response to IFN $\gamma$  in a compound heterozygous child. *Am J Hum Genet* 1998;**62**:723–6.

Allende LM, López-Goyanes a, Paz-Artal E *et al*. A point mutation in a domain of gamma interferon receptor 1 provokes severe immunodeficiency. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;**8**:133–7.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F *et al*. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008;**20**:1361–8.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F *et al.* Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol* 2012;**33**:505–12.

Ashman RB, Vijayan D, Wells CA. IL-12 and related cytokines: function and regulatory implications in *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol* 2011;**2011**:686597.

Averbuch D, Chaggier A, Boisson-Dupuis S *et al.* The clinical spectrum of patients with deficiency of Signal Transducer and Activator of Transcription-1. *Pediatr Infect Dis J* 2011;**30**:352–5.

Bax HI, Freeman AF, Anderson VL *et al.* B-cell lymphoma in a patient with complete interferon gamma receptor 1 deficiency. *J Clin Immunol* 2013;**33**:1062–6.

de Beaucoudrey L, Puel A, Filipe-Santos O *et al.* Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. *J Exp Med* 2008;**205**:1543–50.

de Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J *et al.* Revisiting human IL-12Rbeta1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine (Baltimore)* 2010;**89**:381–402.

Behrends J, Renaud J-C, Ehlers S *et al.* IL-22 Is Mainly Produced by IFN $\gamma$ -Secreting Cells but Is Dispensable for Host Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS One* 2013;**8**:e57379.

Betterle C, Greggio NA, Volpato M. Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:1049–55.

Beutler B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 2009;**227**:248–63.

Boisson-Dupuis S, Kong X-F, Okada S *et al.* Inborn errors of human STAT1: allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious phenotypes. *Curr Opin Immunol* 2012;**24**:364–78.

Bogunovic D, Boisson-Dupuis S, Casanova J-L. ISG15: leading a double life as a secreted molecule. *Exp Mol Med* 2013;**45**:e18.

Boisson-Dupuis S, Kong X-F, Okada S *et al.* Inborn errors of human STAT1: allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious phenotypes. *Curr Opin Immunol* 2012;**24**:364–78.

Boisson B, Wang C, Pedergnana V *et al.* An ACT1 mutation selectively abolishes interleukin-17 responses in humans with chronic mucocutaneous candidiasis. *Immunity* 2013;**39**:676–86.

Boisson-Dupuis S, Bustamante J, El-Baghdadi J *et al.* Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. *Immunol Rev* 2015;**264**:103–20.

Brosch R, Gordon S V, Marmiesse M *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:3684–9.

Burbelo PD, Browne SK, Sampaio EP *et al.* Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia. *Blood* 2010;**116**:4848–58.

Bustamante J, Arias AA, Vogt G *et al.* Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat Immunol* 2011;**12**:213–21.

Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L *et al.* Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- $\gamma$  immunity. *Semin Immunol* 2014;**26**:454–70.

Cahalan MD, Gutman G a. The sense of place in the immune system. *Nat Immunol* 2006;**7**:329–32.

Camcioglu Y, Picard C, Lacoste V *et al.* HHV-8-associated Kaposi sarcoma in a child with IFN $\gamma$ R1 deficiency. *J Pediatr* 2004;**144**:519–23.

Caragol I, Casanova J. Inherited disorders of the Interleukin-12 / Interferon-gamma axis : Mendelian predisposition to mycobacterial disease in man. 2003;**22**:263–76.

Casanova J-L, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:581–620.

Chantrain CF, Bruwier A, Brichard B *et al.* Successful hematopoietic stem cell transplantation in a child with active disseminated *Mycobacterium fortuitum* infection and interferon-gamma receptor 1 deficiency. *Bone Marrow Transplant* 2006;**38**:75–6.

Chapgier A, Kong XF, Boisson-Dupuis S *et al.* A partial form of recessive STAT1 deficiency in humans. *J Clin Invest* 2009;**119**:1502–14.



Chapgier A, Wynn RF, Jouanguy E *et al.* Human complete Stat-1 deficiency is associated with defective type I and II IFN responses in vitro but immunity to some low virulence viruses in vivo. *J Immunol* 2006;**176**:5078–83.

Cheepsattayakorn a, Cheepsattayakorn R. Human genetic influence on susceptibility of tuberculosis: From infection to disease. *J Med Assoc Thail* 2009;**92**:136–41.

Chen D, Li W, Liu S *et al.* Interleukin-23 promotes the epithelial-mesenchymal transition of oesophageal carcinoma cells via the Wnt/beta-catenin pathway. *Sci Rep* 2015;**5**:8604.

Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;**13**:155–68.

Conti HR, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect* 2010;**12**:518–27.

Conti HR, Shen F, Nayyar N *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009;**206**:299–311.

Cooper a M, Magram J, Ferrante J *et al.* Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 1997;**186**:39–45.

Cooper AM, Kipnis A, Turner J *et al.* Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol* 2002;**168**:1322–7.

Cooper AM. Mouse model of tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;**5**:a018556.

Curtis J, Luo Y, Zenner HL *et al.* Susceptibility to tuberculosis is associated with variants in the ASAP1 gene encoding a regulator of dendritic cell migration. *Nat Genet* 2015;**47**:523–7.

Cypowyj S, Picard C, Maródi L *et al.* Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* 2012;**42**:2246–54.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;**356**:1944–56.

Davis MM. Immunology taught by humans. *Sci Transl Med* 2012;**4**:117fs2.

Dickinson RE, Milne P, Jardine L *et al.* The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. *Blood* 2014;**123**:863–74.

Döffinger R, Smahi a, Bessia C *et al.* X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 2001;**27**:277–85.

Dorman SE, Picard C, Lammas D *et al.* Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet (London, England)* 2004;**364**:2113–21.

Duhen T, Geiger R, Jarrossay D *et al.* Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009;**10**:857–63.

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006;**6**:836–48.

Dupuis S, Doffinger R, Picard C *et al.* Human interferon-gamma-mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion. *Immunol Rev* 2000;**178**:129–37.

Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S *et al.* Impaired response to interferon- $\alpha/\beta$  and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 2003;**33**:388–91.

Durandy A, Peron S, Fischer A. Hyper-IgM syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 2006;**18**:369–76.

Eyerich K, Foerster S, Rombold S *et al.* Patients with Chronic Mucocutaneous Candidiasis Exhibit Reduced Production of Th17-Associated Cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol* 2008;**128**:2640–5.

Fieschi C, Dupuis S, Picard C *et al.* High levels of interferon gamma in the plasma of children with complete interferon gamma receptor deficiency. *Pediatrics* 2001;**107**:E48.

Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E *et al.* Low Penetrance, Broad Resistance, and Favorable Outcome of Interleukin 12 Receptor 1 Deficiency: Medical and Immunological Implications. *J Exp Med* 2003;**197**:527–35.

Fieschi C, Bosticardo M, de Beaucoudrey L *et al.* A novel form of complete IL-12/IL-23 receptor beta1 deficiency with cell surface-expressed nonfunctional receptors. *Blood* 2004;**104**:2095–101.

Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A *et al.* Inborn errors of IL-12/23- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* 2006;**18**:347–61.

Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH *et al.* X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med* 2006b;**203**:1745–59.

Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;**19**:93–129.

Flynn JL. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect* 2006;**8**:1179–88.

Fortin a, Abel L, Casanova JL *et al.* Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;**8**:163–92.

Freeman AF, Holland SM. The hyper-IgE syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008;**28**:277–91, viii.

Fregel R, Betancor E, Suarez NM *et al.* Temporal evolution of the ABO allele frequencies in the Canary Islands: the impact of the European colonization. *Immunogenetics* 2009a;**61**:603–10.

Fregel R, Gomes V, Gusmao L *et al.* Demographic history of Canary Islands male gene-pool: replacement of native lineages by European. *BMC Evol Biol* 2009b;**9**:181.

Germano G, Allavena P, Mantovani A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine* 2008;**43**:374–9.

Gharib SA, Nguyen E, Altemeier WA *et al.* Of mice and men: comparative proteomics of bronchoalveolar fluid. *Eur Respir J* 2010;**35**:1388–95.

Glocker E-O, Hennigs A, Nabavi M *et al.* A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 2009;**361**:1727–35.

Griffith DE. Management of disease due to *Mycobacterium kansasii*. *Clin Chest Med* 2002;**23**:613–21.

den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett* 2014;**162**:103–12.

Hambleton S, Salem S, Bustamante J *et al.* IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med* 2011;**365**:127–38.

Van Hoeyveld E, Zhang PX, De Boeck K *et al.* Hyper-immunoglobulin M syndrome caused by a mutation in the promotor for CD40L. *Immunology* 2007;**120**:497–501.

Han J-Y, Rosenzweig SD, Church JA *et al.* Variable presentation of disseminated nontuberculous mycobacterial infections in a family with an interferon-gamma receptor mutation. *Clin Infect Dis* 2004;**39**:868–70.

Holland SM, Dorman SE, Kwon A *et al.* Abnormal regulation of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor-alpha in human interferon-gamma receptor 1 deficiency. *J Infect Dis* 1998;**178**:1095–104.

Holland SM, Vinh DC. Yeast infections--human genetics on the rise. *N Engl J Med* 2009;**361**:1798–801.

Hsu AP, Sampaio EP, Khan J *et al.* Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* 2011;**118**:2653–5.

Huang W, Na L, Fidel PL *et al.* Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004;**190**:624–31.

Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005;**5**:521–31.

Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 2015;**16**:343–53.

Janeway CAJ, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:197–216.

de Jong R, Altare F, Haagen IA *et al.* Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998;**280**:1435–8.

Jönsson B, Ridell M, Wold AE. Non-tuberculous mycobacteria and their surface lipids efficiently induced IL-17 production in human T cells. *Microbes Infect* 2012;**14**:1186–95.

Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S *et al.* Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med* 1996;**335**:1956–61.

Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S *et al.* IL-12 and IFN- $\gamma$  in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 1999;**11**:346–51.

Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F *et al.* Partial interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 1997;**100**:2658–64.

Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D *et al.* A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* 1999b;**21**:370–8.

Jouanguy E, Dupuis S, Pallier A *et al.* In a novel form of IFN-gamma receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN-gamma. *J Clin Invest* 2000;**105**:1429–36.

Karlsson EK, Kwiatkowski DP, Sabeti PC. Natural selection and infectious disease in human populations. *Nat Rev Genet* 2014;**15**:379–93.

Khader SA, Bell GK, Pearl JE *et al.* IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 2007;**8**:369–77.

Khader SA, Pearl JE, Sakamoto K *et al.* IL-23 Compensates for the Absence of IL-12p70 and Is Essential for the IL-17 Response during Tuberculosis but Is Dispensable for Protection and Antigen-Specific IFN- Responses if IL-12p70 Is Available. *J Immunol* 2005;**175**:788–95.

Kirkpatrick CH. Chronic mucocutaneous candidiasis. *Pediatr Infect Dis J* 2001;**20**:197–206.

Kisand K, Bøe Wolff AS, Podkrajsek KT *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* 2010;**207**:299–308.

Koch D, Lilic D, Carmichael AJ. Autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis and primary hypothyroidism complicated by oesophageal carcinoma. *Clin Exp Dermatol* 2009;**34**:e818–20.

Koenderman L, Buurman W, Daha MR. The innate immune response. *Immunol Lett* 2014;**162**:95–102.

Kong X-F, Vogt G, Chapgier A *et al.* A novel form of cell type-specific partial IFN-gammaR1 deficiency caused by a germ line mutation of the IFNGR1 initiation codon. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:434–44.

Kong X-F, Vogt G, Itan Y *et al.* Haploinsufficiency at the human IFNGR2 locus contributes to mycobacterial disease. *Hum Mol Genet* 2013;**22**:769–81.

Korn T, Bettelli E, Oukka M *et al.* IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;**27**:485–517.

Kristensen IA, Veirum JE, Møller BK *et al.* Novel STAT1 alleles in a patient with impaired resistance to mycobacteria. *J Clin Immunol* 2011;**31**:265–71.

Kumar N, Hanks ME, Chandrasekaran P *et al.* Gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) mutation-related primary immunodeficiency is associated with disseminated mucormycosis. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**134**:236–9.

Langowski JL, Zhang X, Wu L *et al.* IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006;**442**:461–5.

Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ *et al.* IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004;**202**:96–105.

Lanternier F, Pathan S, Vincent QB *et al.* Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. *N Engl J Med* 2013;**369**:1704–14.

Lanternier F, Mahdavian SA, Barbati E *et al.* Inherited CARD9 deficiency in otherwise healthy children and adults with *Candida* species-induced meningoencephalitis, colitis, or both. *J Allergy Clin Immunol* 2015;**135**:1558–68.e2.

Larosa DF, Orange JS. 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**121**:S364–9; quiz S412.

Lee W-I, Huang J-L, Lin T-Y *et al.* Chinese patients with defective IL-12/23-interferon-gamma circuit in Taiwan: partial dominant interferon-gamma receptor 1 mutation presenting as cutaneous granuloma and IL-12 receptor beta1 mutation as pneumatocele. *J Clin Immunol* 2009;**29**:238–45.

Lin L, Ibrahim AS, Xu X *et al.* Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog* 2009, DOI: 10.1371/journal.ppat.1000703.

Ling Y, Cypowyj S, Aytakin C *et al.* Inherited IL-17RC deficiency in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* 2015;**212**:619–31.

Liu L, Okada S, Kong X-F *et al.* Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* 2011;**208**:1635–48.

Liyanage SS, Rahman B, Ridda I *et al.* The aetiological role of human papillomavirus in oesophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;**8**:e69238.

Maca-Meyer N, Arnav M, Rando JC *et al.* Ancient mtDNA analysis and the origin of the Guanches. *Eur J Hum Genet* 2004;**12**:155–62.

MacLennan C, Fieschi C, Lammas DA *et al.* Interleukin (IL)-12 and IL-23 are key cytokines for immunity against Salmonella in humans. *J Infect Dis* 2004;**190**:1755–7.

Marazzi MG, Chaggier A, Defilippi A-C *et al.* Disseminated Mycobacterium scrofulaceum infection in a child with interferon-gamma receptor 1 deficiency. *Int J Infect Dis* 2010, DOI: 10.1016/j.ijid.2009.03.025.

Marciano BE, Huang C-Y, Joshi G *et al.* BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: Complications, risks, and vaccination policies. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**133**:1134–41.

Marquis JF, Kapoustina O, Langlais D *et al.* Interferon regulatory factor 8 regulates pathways for antigen presentation in myeloid cells and during tuberculosis. *PLoS Genet* 2011, DOI: 10.1371/journal.pgen.1002097.

Martinez J, Martinez L, Rosenblueth M *et al.* How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of Klebsiella. *Int Microbiol* 2004;**7**:261–8.

Martínez-Barricarte R, Megged O, Stepensky P *et al.* Mycobacterium simiae Infection in Two Unrelated Patients with Different Forms of Inherited IFN- $\gamma$ R2 Deficiency. *J Clin Immunol* 2014;**34**:904–9.

Martinez-Martinez L, Martinez-Saavedra MT, Fuentes-Prior P *et al.* A novel gain-of-function STAT1 mutation resulting in basal phosphorylation of STAT1 and increased distal IFN-gamma-mediated responses in chronic mucocutaneous candidiasis. *Mol Immunol* 2015;**68**:597-605.

Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol* 2007;**51**:1139–47.

Mayer-Barber K, Barber B. Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, DOI: 10.1001/cshperspect.a018424.

McGeachy MJ, McSorley SJ. Microbial-Induced Th17: Superhero or Supervillain? *J Immunol* 2012;**189**:3285–91.

Medzhitov R, Janeway Jr. CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;**9**:4–9.

Medzhitov R. Approaching the Asymptote: 20 Years Later. *Immunity* 2009;**30**:766–75.

Meeran SM, Mantena SK, Meleth S *et al.* Interleukin-12-deficient mice are at greater risk of UV radiation-induced skin tumors and malignant transformation of papillomas to carcinomas. *Mol Cancer Ther* 2006;**5**:825–32.

Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004;**172**:2731–8.

Moncada-Vélez M, Martínez-Barricarte R, Bogunovic D *et al.* Partial IFN- $\gamma$ R2 deficiency is due to protein misfolding and can be rescued by inhibitors of glycosylation. *Blood* 2013;**122**:2390–401.

Muñoz L, Stagg HR, Abubakar I. Diagnosis and Management of Latent Tuberculosis Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, DOI: 10.1101/cshperspect.a017830.

Newport MJ, Huxley CM, Huston S *et al.* A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996;**335**:1941–9.

Noordzij JG, Hartwig NG, Verreck FAW *et al.* Two patients with complete defects in interferon gamma receptor-dependent signaling. *J Clin Immunol* 2007;**27**:490–6.

Ng W-F, von Delwig A, Carmichael AJ *et al.* Impaired T(H)17 responses in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with and without autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**126**:1006–15, 1015.e1–4.

Odds FC, Davidson a. D, Jacobsen MD *et al.* Candida albicans Strain Maintenance, Replacement, and Microvariation Demonstrated by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:3647–58.

Okada S, Ishikawa N, Shirao K *et al.* The novel IFNGR1 mutation 774del4 produces a truncated form of interferon-gamma receptor 1 and has a dominant-negative effect on interferon-gamma signal transduction. *J Med Genet* 2007;**44**:485–91.



Okada S, Markle JG, Deenick EK *et al.* IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* 2015;**349**:606–13.

Olbrich P, Martinez-Saavedra MT, Perez-Hurtado JM *et al.* Diagnostic and therapeutic challenges in a child with complete interferon-gamma receptor 1 deficiency. *Pediatr Blood Cancer* 2015;**62**:2036–9.

Ottenhoff THM, Kaufmann SHE. Vaccines against Tuberculosis : Where Are We and Where Do We Need to Go? 2012;**8**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002607.

Ottenhoff THM, Verreck F a W, Lichtenauer-Kaligis EGR *et al.* Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet* 2002;**32**:97–105.

Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;**28**:454–67.

Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009;**227**:221–33.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;**48**:503–35.

Perheentupa J. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:2843–50.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;**202**:8–32.

Picard C, Casanova J-L, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I $\kappa$ B deficiency. *Clin Microbiol Rev* 2011;**24**:490–7.

Pirofski L, Casadevall A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Exp Med* 2009;**206**:269–73.

Png E, Alisjahbana B, Sahiratmadja E *et al.* A genome wide association study of pulmonary tuberculosis susceptibility in Indonesians. *BMC Med Genet* 2012;**13**:5.

Prando C, Samarina A, Bustamante J *et al.* Inherited IL-12p40 deficiency: genetic, immunologic, and clinical features of 49 patients from 30 kindreds. *Med* 2013;**92**:109–22.

Puel A, Picard C, Ku C-L *et al.* Inherited disorders of NF-kappaB-mediated immunity in man. *Curr Opin Immunol* 2004;**16**:34–41.

Puel A, Picard C, Cypowyj S *et al.* Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans: A role for IL-17 cytokines? *Curr Opin Immunol* 2010;**22**:467–74.

Puel A, Döffinger R, Natividad A *et al.* Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* 2010b;**207**:291–7.

Puel A, Cypowyj S, Bustamante J *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 2011;**332**:65–8.

Puel A, Cypowyj S, Maródi L *et al.* Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;**12**:616–22.

Ramirez-Alejo N, Santos-Argumedo L. Innate defects of the IL-12/IFN-gamma axis in susceptibility to infections by mycobacteria and salmonella. *J Interferon Cytokine Res* 2014;**34**:307–17.

Reichenbach J, Rosenzweig S, Döffinger R *et al.* Mycobacterial diseases in primary immunodeficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;**1**:503–11.

Richardson JP, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence* 2015;**5594**:1–11.

Rizzetto L, Weil T, Cavalieri D. Systems Level Dissection of *Candida* Recognition by Dectins: A Matter of Fungal Morphology and Site of Infection. *Pathogens* 2015;**4**:639–61.

Roesler J, Kofink B, Wendisch J *et al.* *Listeria monocytogenes* and recurrent mycobacterial infections in a child with complete interferon-gamma-receptor (IFN $\gamma$ R1) deficiency: mutational analysis and evaluation of therapeutic options. *Exp Hematol* 1999;**27**:1368–74.

Roesler J, Horwitz ME, Picard C *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for complete IFN- $\gamma$  receptor 1 deficiency: A multi-institutional survey. *J Pediatr* 2004;**145**:806–12.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004;**4**:1–23.

Rosa DD, Pasqualotto AC, Denning DW. Chronic mucocutaneous candidiasis and oesophageal cancer. *Med Mycol* 2008;**46**:85–91.

Rose DM, Atkins J, Holland SM *et al.* A novel mutation in IFN-gamma receptor 1 presenting as multisystem Mycobacterium intracellulare infection. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**133**:591–2.

Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev* 2005;**203**:38–47.

Rosenzweig SD, Holland SM. Recent insights into the pathobiology of innate immune deficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;**11**:369–77.

Salem S, Langlais D, Lefebvre F *et al.* Functional characterization of the human dendritic cell immunodeficiency associated with the IRF8(K108E) mutation. *Blood* 2014;**124**:1894–904.

Sallusto F, Zielinski CE, Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *Eur J Immunol* 2012;**42**:2215–20.

Sampaio EP, Bax HI, Hsu AP *et al.* A novel STAT1 mutation associated with disseminated mycobacterial disease. *J Clin Immunol* 2012;**32**:681–9.

Sampaio EP, Hsu AP, Pechacek J *et al.* Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutations and disseminated coccidioidomycosis and histoplasmosis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**:1624–34.

Schimke LF, Sawalle-Belohradsky J, Roesler J *et al.* Diagnostic approach to the hyper-IgE syndromes: immunologic and clinical key findings to differentiate hyper-IgE syndromes from atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**126**:611–7.e1.

Senanayake MP, Kumararatne DS, Doffinger R *et al.* Disseminated BCG in an infant with interleukin-12 receptor B1 (IL12RB1) deficiency. *Paediatr Int Child Health* 2015;**35**:69–71.

Sharfe N, Nahum A, Newell A *et al.* Fatal combined immunodeficiency associated with heterozygous mutation in STAT1. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**133**:807–17.

Shamriz O, Engelhard D, Rajs AP *et al.* Mycobacterium szulgai chronic multifocal osteomyelitis in an adolescent with inherited STAT1 deficiency. *Pediatr Infect Dis J* 2013;**32**:1345–7.

Sharma VK, Pai G, Deswarte C *et al.* Disseminated Mycobacterium avium Complex Infection in a Child with Partial Dominant Interferon Gamma Receptor 1 Deficiency in India. *J Clin Immunol* 2015;**35**:459–62.

Shi X, Cao S, Mitsuhashi M *et al.* Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms. *J Immunol* 2004;**172**:4111–22.

Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;**10**:427–39.

Sologuren I, Boisson-Dupuis S, Pestano J *et al.* Partial recessive IFN-gammaR1 deficiency: genetic, immunological and clinical features of 14 patients from 11 kindreds. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:1509–23.

Stein CM. Genetic Epidemiology of Tuberculosis Susceptibility: Impact of Study Design. *PLoS Pathog* 2011;**7**:e1001189.

Syrjanen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002;**55**:721–8.

Szabo EK, MacCallum DM. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* 2011;**320**:1–8.

Tao Y-P, Wang W-L, Li S-Y *et al.* Associations between polymorphisms in IL-12A, IL-12B, IL-12Rbeta1, IL-27 gene and serum levels of IL-12p40, IL-27p28 with esophageal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;**138**:1891–900.

Taramasso L, Boisson-Dupuis S, Garre ML *et al.* Pineal germinoma in a child with interferon-gamma receptor 1 deficiency. case report and literature review. *J Clin Immunol* 2014;**34**:922–7.

Toyoda H, Ido M, Nakanishi K *et al.* Multiple cutaneous squamous cell carcinomas in a patient with interferon gamma receptor 2 (IFN gamma R2) deficiency. *J Med Genet* 2010;**47**:631–4.

Trifari S, Kaplan CD, Tran EH *et al.* Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2009;**10**:864–71.

Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:S24–32.

Uzel G. The range of defects associated with nuclear factor kappaB essential modulator. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;**5**:513–8.

Uzel G, Sampaio EP, Lawrence MG *et al.* Dominant gain-of-function STAT1 mutations in FOXP3 wild-type immune dysregulation–polyendocrinopathy–enteropathy–X-linked–like syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**:1611–23.e3.

van de Veerdonk FL, Netea MG. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr Fungal Infect Rep* 2010;**4**:238–43.

van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* 2011;**365**:54–61.

van de Vosse E, Haverkamp MH, Ramirez-Alejo N et al. IL-12Rbeta1 deficiency: mutation update and description of the IL12RB1 variation database. *Hum Mutat* 2013;**34**:1329–39.

van de Wetering D, de Paus RA, van Dissel JT et al. Functional analysis of naturally occurring amino acid substitutions in human IFN-gammaR1. *Mol Immunol* 2010;**47**:1023–30.

Vinh DC. Insights into human antifungal immunity from primary immunodeficiencies. *Lancet Infect Dis* 2011;**11**:780–92.

Vogelaar IP, van der Post RS, van de Vosse E et al. Gastric cancer in three relatives of a patient with a biallelic IL12RB1 mutation. *Fam Cancer* 2015;**14**:89–94.

Wang L, Zhou W, Zhao W et al. Clinical Features and Genetic Analysis of 20 Chinese Patients with X-Linked Hyper-IgM Syndrome. *Immunol Res* 2014, DOI: 10.1155/2014/683160.

Wei XQ, Rogers H, Lewis M a. O et al. The Role of the IL-12 Cytokine Family in Directing T-Cell Responses in Oral Candidosis. *Clin Dev Immunol* 2011;**2011**:1–10.

WHO. Global tuberculosis report 2014 (WHO). 2014:171. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf)

Woellner C, Gertz EM, Schaffer AA et al. Mutations in STAT3 and diagnostic guidelines for hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:424–32.e8.

Wu UI, Holland SM. Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2015;**15**:968-80.

Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 2009;**21**:146–52.

