

**Ana Flávia da Silva Pina**

**DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Pediatria.

São Paulo  
2024

**Ana Flávia da Silva Pina**

**DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Pediatria.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Terreri

Coorientadoras:

Profa. Dra. Gleice Clemente Souza Russo

Profa. Dra. Maria Isabel de Moraes-Pinto

São Paulo

2024

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E CIÊNCIAS**  
**APLICADAS À PEDIATRIA**

Chefe do Departamento:

Profa. Dra. Soraia Tahan

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Gustavo Falbo Wandalsen

**Ana Flávia da Silva Pina**

**DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA**

**Presidente da Banca:**

**Profª. Drª Maria Teresa de Sande e Lemos Ramos Ascensão Terreri**

---

**Banca Examinadora:**

**Profª. Drª Adriana Rodrigues Fonseca**

---

**Profª. Drª Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães**

---

**Profª. Drª Vânia D'Almeida**

---

**Suplente:**

**Prof. Dr. Rogério do Prado**

---

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,  
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pina, Ana Flávia da Silva

Doença de Kawasaki e infecção por SARS-CoV-2 em crianças: avaliação clínica e de marcadores genéticos associados ao desenvolvimento da doença / Ana Flávia da Silva Pina. - São Paulo, 2024.

VI, 70f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Ciências aplicadas à Pediatria.

Título em inglês: Kawasaki disease and SARS-CoV-2 infection in children: clinical evaluation and genetic markers associated with the development of the disease.

1. Doença de Kawasaki . 2. Marcadores genéticos . 3. SARS-CoV-2.

## **Dedicatória**

Porque o que move a vida é o sonho, dedico aos que me ajudam a sonhar: Tiago, Márcia, Romildo, Ana Beatriz, João Henrique e Regina.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer, primeiramente, às minhas orientadoras Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Teresa Terreri, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Gleice Clemente e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Isabel de Moraes. Agradeço por todo conhecimento que me foi transmitido, direcionamentos e orientações, mas também por todo carinho, paciência e compreensão desde o início do meu trajeto até aqui. As levarei comigo como exemplo de educadoras, médicas e pesquisadoras.

Agradeço aos meus pais que sempre foram meus exemplos e os primeiros a me mostrar o quão gratificante a carreira acadêmica pode ser, mesmo que árdua em alguns momentos. Dedico a eles essa tese e agradeço por todo apoio, incentivo e amor durante toda a minha formação, porque sei que eles sempre a colocaram como prioridade desde o jardim de infância até esse momento.

Aos meus irmãos também deixo meu muito obrigada, sempre torceram por mim, tiveram paciência, me entenderam nos meus piores momentos e comemoraram comigo todas as conquistas até aqui. Obrigada aos meus amigos colegas de profissão e ao ambulatório da Reumatologia Pediátrica da Unifesp, sua amizade e apoio valem muito para mim.

Por fim, agradeço ao meu marido, Tiago, que sempre apoiou e incentivou meus sonhos, esteve ao meu lado em cada passo da jornada com paciência e amor.

## Resumo

**Objetivos:** Este estudo tem como objetivo realizar análise genética de pacientes pediátricos diagnosticados com doença de Kawasaki (DK) após o início de pandemia por SARS-CoV-2, através de extração de DNA, sequenciamento e análise de regiões de interesse do exoma. É de grande relevância caracterizarmos o perfil genético dos pacientes no nosso meio e avaliarmos os grupos com potencial de maior gravidade de doença, podendo no futuro direcionar melhores opções de diagnóstico e de terapêutica.

**Casuística e método:** Foram incluídos no estudo pacientes até 20 anos de idade com diagnóstico de DK completa ou incompleta de acordo com os critérios da *American Heart Association*, no período da pandemia da COVID-19. A coleta foi realizada entre março de 2020 e outubro de 2021. Dados clínicos e laboratoriais foram extraídos do prontuário. Foi realizada coleta de sangue dos pacientes, em seguida realizada extração de DNA com o Kit Qiagen segundo as instruções do fabricante; após extração, amostras foram armazenadas em temperatura de -80 °C no Laboratório de Pesquisas da Disciplina de Infectologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo. O DNA genômico extraído sofreu uma fragmentação seguida de indexação, captura e enriquecimento com sondas desenhadas para o genoma humano com kit de preparo de biblioteca Nextera DNA Flex (Nextera DNA Library Preparation Kit). O sequenciamento de nova geração (NGS) das sequências-alvo foi realizado utilizando a plataforma NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, EUA). Após revisão de literatura, genes de interesse relacionados à DK e desenvolvimento de MIS-C e DK associado à COVID-19 foram selecionados. As variantes encontradas foram analisadas nas principais bases de dados genéticos e classificadas em 'patogênicas', 'provavelmente patogênicas', 'significado incerto', 'provavelmente benignas', e 'benignas' de acordo com critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica.

**Resultados:** Foram selecionados 25 pacientes com diagnóstico de DK, dos quais 15 (60%) pacientes preencheram critérios para DK completo e 10 (40%), para incompleto. Além disso, 8 (32%) pacientes foram classificados como COVID+, pois apresentavam RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 e/ou sorologia (IgM, IgG ou IgA) positiva. Foi realizada a extração e análise de exoma dos 25 pacientes e selecionadas zonas de interesse para análise de acordo com mutações identificadas em estudos anteriores.



Foram encontradas duas mutações, no gene ABCA4 e no gene ABCC6, classificadas como provavelmente patogênicas, em dois pacientes, respectivamente. No total, 12 variantes de significado incerto (VUS) foram encontradas em 11 pacientes. Nos restantes 14 pacientes não foram encontradas mutações significativas. **Conclusão:** Dessa forma, no presente estudo, realizamos extração de DNA com realização de exoma e posterior análise de genes de interesse de 25 pacientes com diagnóstico de DK. Relatamos também suas características clínicas e laboratoriais. Foram encontradas duas mutações classificadas como provavelmente patogênicas em dois pacientes. No total, 12 VUS foram encontradas em 11 pacientes. Estudos posteriores se fazem necessários para que possamos evidenciar características genéticas próprias da população brasileira que possam influenciar no surgimento da DK.



## Abstract

**Objective:** This study aims to perform a genetic analysis of pediatric patients diagnosed with Kawasaki Disease (KD) after the start of the SARS-CoV-2 pandemic, through DNA extraction, sequencing and analysis of regions of interest in the exome. It is of great importance to characterize the genetic profile of patients in our environment and evaluate groups with the potential for greater severity of the disease, being able to direct better diagnostic and therapeutic options in the future. **Methods:** Patients up to 20 years of age diagnosed with complete or incomplete KD according to the American Heart Association criteria, during the COVID-19 pandemic, were included in the study. Collection was carried out between March 2020 and October 2021. Clinical and laboratory data were extracted from the medical records. Blood was collected from the patients, followed by DNA extraction using the Qiagen Kit according to the manufacturer's instructions; After extraction, samples were stored at -80 °C in the Research Laboratory of the Pediatric Infectious Diseases Discipline at the Federal University of São Paulo. The extracted genomic DNA underwent fragmentation followed by indexing, capture and enrichment with probes designed for the human genome with the Nextera DNA Flex library preparation kit (Nextera DNA Library Preparation Kit). Next-generation sequencing (NGS) of target sequences was performed using the NextSeq 550 platform (Illumina, San Diego, CA, USA). After reviewing the literature, genes of interest related to KD and the development of MIS-C and KD associated with COVID-19 were selected. The variants found were analyzed in the main genetic databases and classified as 'pathogenic', 'probably pathogenic', 'uncertain significance', 'probably benign', and 'benign' according to criteria established by the American College of Medical Genetics and Genomics. **Results:** 25 patients diagnosed with KD were selected, of which 15 (60%) patients met criteria for complete KD and 10 (40%) for incomplete KD. Furthermore, 8 (32%) patients were classified as COVID+, as they had a positive RT-PCR for SARS-CoV-2 and/or positive serology (IgM, IgG or IgA). Exome extraction and analysis of the 25 patients was performed and areas of interest were selected for analysis according to mutations identified in previous studies. Two mutations were found, in the ABCA4 gene and the ABCC6 gene, classified as probably pathogenic, in two patients, respectively. In total 12 variants of uncertain significance

(VUS) were found in 11 patients. In the remaining 14 patients, no significant mutations were found. **Conclusion:** Therefore, in the present study, we performed DNA extraction with exome analysis and subsequent analysis of genes of interest from 25 patients diagnosed with KD. We also report their clinical and laboratory characteristics. Two mutations classified as probably pathogenic were found in two patients. In total, 12 VUS were found in 11 patients. Further studies are necessary so that we can highlight genetic characteristics specific to the Brazilian population that may influence the emergence of KD.

## Sumário

Dedicatória	
Agradecimentos	
Resumo	
Lista de Abreviaturas	14
Lista de quadros e figuras	15
1. REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 Doença de Kawasaki	16
1.2 Epidemiologia	19
1.3 Etiopatogenia da Doença de Kawasaki	21
1.4 Fisiopatologia da Doença de Kawasaki	22
1.5 Aspectos genéticos associados à Doença de Kawasaki	23
1.6 Surgimento da MIS-C e sua associação com a Doença de Kawasaki	28
2. JUSTIFICATIVA	32
3. HIPÓTESES	33
4. OBJETIVOS	34
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
5.1 Critérios de inclusão e exclusão	35
5.2 Avaliação clínica	35
5.3 Coleta de material para análise laboratorial	36
5.4 Análise genética e interpretação dos resultados	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	54
8. ANEXOS	73

## Lista de abreviaturas

<b>DK</b>	Doença de Kawasaki
<b>IgIV</b>	Imunoglobulina endovenosa
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases da matriz
<b>RRP</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>DAMPs</b>	Padrão Molecular Associado ao Dano
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitários humanos
<b>SNP</b>	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
<b>ITPKC</b>	<i>Inositol-trisphosphate 3-kinase C</i>
<b>IP3</b>	Inositol 1,2,4 trisfosfato
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>NFAT</b>	Fator nuclear de células T ativadas
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento beta
<b>MBL</b>	<i>Mannose-binding lectin</i>
<b>FCyRS</b>	Fração FC de Imunoglobulinas
<b>MIS-C</b>	<i>Multisystem Inflammatory Syndrome in Children</i>
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa
<b>SRAG</b>	Síndrome Respiratória Aguda Grave
<b>SAM</b>	Síndrome de Ativação Macrofágica
<b>AIJ</b>	Artrite Idiopática Juvenil
<b>LES</b>	Lúpus Eritematoso Sistêmico
<b>HMGB1</b>	<i>High mobility group box 1</i>
<b>NGS</b>	Sequenciamento de nova geração
<b>CNVS</b>	<i>Copy number variation</i>
<b>ACMG</b>	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
<b>VUS</b>	Variante de significado incerto
<b>GWAS</b>	<i>Genome-wide association study</i>

## **Lista de Figuras e Quadros**

Figura 1. Avaliação de suspeita de doença de Kawasaki incompleta.

Figura 2. Possíveis papéis de ITPKC e CASP3 na via  $\text{Ca}^{2+}$ /NFAT em células T.

Figura 3 - Sinalização de TGF- $\beta$  através de vias dependentes e independentes de Smad.

Quadro 1- Critérios de patogenicidade utilizados para classificar as variantes

Quadro 2 - Critérios de benignidade utilizados para classificar as variantes

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Doença de Kawasaki

Doença de Kawasaki (DK) é uma síndrome febril inflamatória aguda, autolimitada, classificada como vasculite de vasos de médio calibre de acordo com a nomenclatura da Conferência de Chapel Hill (Jennette, 2013). Afeta predominantemente crianças entre seis meses e cinco anos de idade. Em menor frequência, o diagnóstico é feito em crianças mais velhas e adultos, quando se associa com maior gravidade (Dietz, 2017).

A DK é caracterizada por febre elevada, de difícil controle, por pelo menos cinco dias de duração, podendo estar associada com exantema polimorfo (presente em 90% dos pacientes), alterações em lábios e cavidade oral (em 80-90%), hiperemia conjuntival bilateral não purulenta (em 80-90%), edema doloroso em mãos e pés e/ou eritema purpúrico de palmas e plantas, além de linfadenomegalia cervical unilateral dolorosa, maior que 1,5 cm de diâmetro (apenas 50% dos casos) (Dajani, 1993).

Tais manifestações estão presentes na fase aguda da doença associadas à febre, que tem duração de aproximadamente 10 dias. Após a defervescência, inicia-se a fase subaguda, quando geralmente surge descamação em placas de extremidades, de início em região periungueal em mãos e pés. Adicionalmente, outras manifestações clínicas podem surgir como artralgia e artrite, dor abdominal, diarreia, hepatoesplenomegalia, meningite asséptica, síndrome de ativação macrofágica, entre outras (Baker, 2008).

A DK pode cursar com vasculite necrosante sistêmica, com comprometimento de vasos de médio calibre, e predomínio das artérias coronárias. O aneurisma das artérias coronárias é a principal complicação da doença, com morbidade significativa e potencial para óbito (Amano, 1980).

Os pacientes apresentam aumento de provas inflamatórias, como proteína C reativa (PCR) e velocidade de hemossedimentação (VHS), anemia e leucocitose. Elevação de enzimas hepáticas e bilirrubinas, dislipidemia, hipoalbuminemia e



leucocitúria estéril são outras alterações que podem ser encontradas. Na fase subaguda, surge a plaquetose (Makino, 2019).

O ecocardiograma Doppler é obrigatório durante a investigação da DK, em virtude de a principal complicação da doença ser a alteração de artérias coronárias, podendo ser evidenciadas desde dilatações discretas reversíveis, até aneurismas gigantes, com potencial de ruptura e formação de trombos. A alteração coronariana está presente em até 30% dos pacientes quando a DK não é tratada adequadamente. Essa frequência é reduzida para aproximadamente 5% quando o tratamento é precoce. Miocardite, insuficiência mitral ou aórtica também podem estar presentes (Terrerri, 2013; Rossi, 2015).

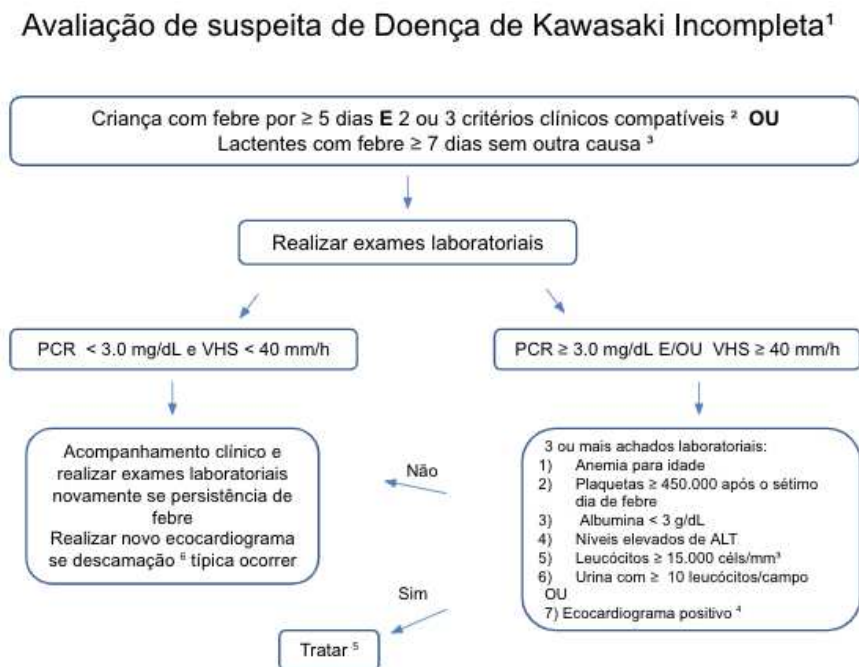
O diagnóstico da DK é clínico e definido através dos critérios de diagnóstico para a doença, quando excluídas outras causas. O paciente preenche os critérios de diagnóstico quando apresenta febre por mais de cinco dias associada à presença de pelo menos quatro dos demais critérios a seguir: alterações de cavidade oral, conjuntivite, exantema polimorfo, alteração das extremidades e adenomegalia cervical (McCrindle, 2017).

Entretanto, alguns pacientes não preenchem os critérios diagnósticos para DK e mesmo assim evoluem para doença coronariana. Assim, é essencial o diagnóstico desses pacientes com DK incompleta para o estabelecimento precoce do tratamento, evitando a complicação coronariana (Minich, 2007).

O diagnóstico da DK incompleta deve ser estabelecido quando o paciente apresenta febre de pelo menos cinco dias de duração, associada à elevação de VHS e/ou PCR, com presença de alteração laboratorial (três dos seguintes achados: anemia, leucitose, plaquetose após sétimo dia de febre, elevação de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), hipoalbuminemia e leucocitúria) ou com ecocardiograma positivo (presença de aneurisma de artéria coronária; ou presença de 3 ou mais de outras características sugestivas, incluindo diminuição da função ventricular esquerda, regurgitação mitral, derrame pericárdico ou escores Z na artéria coronária descendente anterior esquerda ou na artéria coronária direita de 2 a 2,5) (McCrindle, 2017).

Adicionalmente, lactentes de até 6 meses que apresentem febre com duração de sete dias, sem causa conhecida, associada a aumento de reagentes de fase aguda

também preenchem critérios para DK incompleta quando há a presença de três dos seis achados laboratoriais ou o ecocardiograma com a presença dos achados descritos acima. A figura 1 mostra o fluxograma para a avaliação de DK incompleta.



**Figura 1.** Avaliação de suspeita de doença de Kawasaki incompleta. (1) Na ausência de um “padrão ouro” para o diagnóstico, este algoritmo não pode ser baseado em evidências, mas representa a opinião informada do comitê de especialistas. A consulta com um especialista deve ser solicitada sempre que for necessária assistência. (2) Os achados clínicos da doença de Kawasaki estão listados acima no texto. As características que sugerem que outro diagnóstico deve ser considerado incluem conjuntivite exsudativa, faringite exsudativa, lesões intraorais ulcerativas, erupção cutânea bolhosa ou vesicular, adenopatia generalizada ou esplenomegalia. (3) Bebês com idade ≤ 6 meses têm maior probabilidade de desenvolver febre prolongada sem outros critérios clínicos para doença de Kawasaki; esses bebês correm um risco particularmente alto de desenvolver anomalias nas artérias coronárias. (4) A ecocardiografia é considerada positiva para fins deste algoritmo se qualquer uma das 3 condições for atendida: escore Z da artéria coronária descendente anterior esquerda ou artéria coronária direita  $\geq 2,5$  é observado aneurisma de artéria coronária; ou existem  $\geq 3$  outras características sugestivas, incluindo diminuição da função ventricular esquerda, regurgitação mitral, derrame pericárdico ou escores Z na artéria coronária descendente anterior esquerda ou na artéria coronária direita de 2 a 2,5. (5) Se o

ecocardiograma for positivo, o tratamento deve ser administrado dentro de 10 dias do início da febre ou após o décimo dia de febre na presença de sinais clínicos e laboratoriais (proteína C reativa [PCR], velocidade de hemossedimentação [VHS]) de inflamação contínua. (6) A descamação típica começa sob as unhas dos dedos das mãos e dos pés. ALT- alanina transaminase. Brian W. McCrindle. Circulation. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Scientific Statement for Health Professionals From the American Heart Association, Volume: 135, Issue: 17, Pages: e927-e999, DOI: (10.1161/CIR.0000000000000484).

Realizado o diagnóstico clínico, o tratamento deve ser iniciado preferencialmente antes do sétimo dia de sintomas, com o objetivo de reduzir a incidência de aneurisma de coronária. A terapia primária deve ser feita com imunoglobulina humana intravenosa (IgIV), 2g/kg e ácido acetilsalicílico (AAS) na dose de 30 a 50mg/kg/dia. Diante de fatores de risco indicando má resposta à IgIV, deve-se associar corticoterapia endovenosa (1-2mg/kg/dia). Caso o paciente não responda ao tratamento inicial nas primeiras 48 horas, deve ser realizada uma segunda dose de IgIV, ou pulsoterapia com glicocorticoide ou glicocorticoide associado à IgIV (Wardle, 2017; McCrindle, 2017).

Fatores de risco para má resposta à primeira dose de IgIV foram descritos e incluem: dosagem de sódio menor que 133 mmol/L, febre por menos de 4 dias ao diagnóstico, transaminase glutâmico oxalacética > 100 U/L, neutrofilia ao hemograma (> 80% de neutrófilos), PCR > 10 U/L, idade menor que 12 meses, plaquetas < 300.000/mm<sup>3</sup>. É válido ressaltar que tais fatores de risco foram obtidos através de estudos que visavam identificar características clínicas e laboratoriais de pacientes com má resposta ao glicocorticoide na população asiática; e apesar da sua boa acurácia na população asiática, não devem ser extrapolados para a população ocidental (Kobayashi, 2006; Egami 2006; Sano, 2007).

## **1.2 Epidemiologia da Doença de Kawasaki**

A DK é a segunda vasculite mais comum na infância e sua incidência mundial varia conforme o continente estudado. O nordeste asiático apresenta taxas de

incidência maiores quando comparado à Europa e América do Norte. Japão, Coreia do Sul e Taiwan possuem elevada incidência da doença (Makino, 2018).

A incidência anual no Japão foi de 308 para cada 100.000 crianças menores que 5 anos nos anos de 2013 a 2014 (Makino, 2018). Adicionalmente, na Coreia do Sul, foram descritos 199,7 casos para cada 100.000 crianças menores que 5 anos no ano de 2014 (Kim, 2014), enquanto Taiwan apresentou 82,8 casos para cada 100.000 crianças menores que 5 anos em 2010 (Lin, 2015).

Outras localidades apresentam taxas menores de incidência. Nos EUA, a incidência é estimada em 17,5 a 20,8 casos para cada 100.000 crianças menores que 5 anos (Uehara, 2012). Os estudos epidemiológicos nos EUA e Canadá ressaltam que as taxas de incidência são consideravelmente maiores nas populações de ascendência japonesa e nas ilhas do Pacífico. Adicionalmente, a incidência anual na Europa é entre 5 e 10 casos para cada 100.000 crianças menores que 5 anos. Os países com menor incidência são a Finlândia, Noruega e Suécia, enquanto o país com a maior incidência é a Irlanda (Lynch, 1996; Dolezalová, 2004; Heuclin, 2009; Tacke, 2014).

Com relação aos estudos na América Latina, são descritos dados apenas do Chile. Borzutzky et al revisaram registros hospitalares entre 2001 e 2007 procurando DK em menores de 18 anos. A taxa de hospitalização associada à DK foi de 7,6 casos para cada 100.000 crianças menores de 5 anos.

Além disso, observaram-se variações entre os grupos populacionais com relação à resposta ao tratamento com IgIV. Define-se resistência à IgIV como febre persistente ou recorrente após 36h de sua administração. Pacientes com tal evolução clínica têm risco aumentado de complicações coronarianas (Makino 2018).

De forma contraditória, a incidência da DK não é diretamente proporcional à incidência da resistência à IgIV. Podemos observar na Alemanha uma incidência de 7,2 casos de DK para cada 100.000 crianças < 5 anos, com uma taxa de 26,8% de casos com resistência à IgIV (Jakob, 2016). Já o Japão e Taiwan, os países com maior número de casos da doença, apresentaram 17% e 12,5% de casos com resistência à IgIV, respectivamente (Lin, 2005; Makino, 2018).

Além da variação de incidência conforme a localidade, a frequência de DK também oscila conforme determinadas épocas do ano. Estudos conduzidos no

hemisfério norte em latitudes extratropicais, evidenciaram uma incidência 40% maior nos meses de janeiro a março, em comparação ao período de agosto a outubro (Burns, 2013). A variação do número de casos de acordo com a época do ano foi reportada por diversos países, como Japão, Coreia do Sul, Taiwan, EUA, Canadá e Índia (Lin, 2005; Uehara, 2012; Kim, 2014; Wu, 2017; Makino, 2018).

Os estudos acima citados, contribuem com mais informações acerca das causas da DK. A variação conforme grupos populacionais sugere uma causa genética comum entre as populações que pode estar associada à maior suscetibilidade para desenvolvimento da doença, enquanto que a variação sazonal corrobora a hipótese da influência de fatores de risco associados com o ambiente, como maior exposição a agentes infecciosos, variação do clima, entre outros.

### **1. 3 Etiopatogenia da Doença de Kawasaki**

A associação entre agentes infecciosos e a DK vem sendo descrita por vários autores, porém até o momento não se tem relato de forma decisiva e constante de um agente que seja gatilho.

Chang LY et al encontraram em Taiwan maior incidência de patógenos virais nos pacientes com DK quando comparados aos controles saudáveis. Os principais vírus descritos como envolvidos na patogênese incluem enterovírus, adenovírus, rinovírus e coronavírus (Chang, 2014). Outros estudos observaram associação entre DK e bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Mycoplasma* e *Chlamydia* (Normann, 1999; Wang, 2001; Barton, 2002; Matsubara, 2006).

Adicionalmente, crianças infectadas por *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica* apresentaram quadro clínico que preenchia critérios para DK. Tais pacientes apresentavam mais sintomas abdominais e menor incidência de aneurismas de coronárias (Marriott, 1985; Feeney, 2020).

Os sinais e sintomas da DK e a liberação intensa de citocinas pró-inflamatórias que ocorrem durante a fase aguda da doença lembram outras doenças infecciosas, como a síndrome de choque tóxico pelas bactérias *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Faulkner, 2005). Alguns estudos mostraram que, em comparação com indivíduos saudáveis, pacientes com DK apresentam um repertório desequilibrado de células T

V $\beta$ , com frequências aumentadas de células T V $\beta$ 2+ e V $\beta$ 81+, levando à sugestão inicial de que superantígenos poderiam ter um papel desencadeante na DK (Abe, 1992; Abe, 1993; Curtis, 1995). Porém, tal achado não foi encontrado em outros estudos, podendo-se concluir que a DK pode ser desencadeada por múltiplos antígenos convencionais (Pietra, 1994; Mancina, 1998).

#### **1.4 Fisiopatologia da Doença de Kawasaki**

As alterações imunológicas na DK ocorrem de forma sistêmica, após o estímulo inicial (infeccioso ou não), desencadeando a ativação dos sistemas imunes inato e adaptativo. Na fase inicial da doença os pacientes apresentam hiperativação do sistema inato, acompanhada de uma resposta imune relacionada a Th17 e inibição da resposta de células T e B (Hara, 2016).

A DK cursa com infiltrado inflamatório na parede das artérias coronárias. Análise imunohistoquímica de tecidos humanos advindos de autópsias revelam acúmulo na parede arterial de monócitos, macrófagos e neutrófilos, bem como a presença de células T CD8+ ativadas (Rowley 2000; Brown, 2001; Takahashi, 2017). Adicionalmente, linfócitos T  $\gamma\delta$  foram encontrados de forma predominante na análise de sangue periférico de pacientes com DK na fase aguda (Ikeda, 2010). O infiltrado inflamatório promove liberação de citocinas como TNF e IL-1 $\beta$  gerando dano endotelial, com evolução para aneurismas de coronária (Leung,1989). Analisando as alterações no sistema imunológico adaptativo durante a fase aguda da DK, os estudos destacam diminuição da contagem absoluta de linfócitos T, com supressão acentuada da proliferação de células T induzida por receptores de células T CD3 (Kuijpers 1999), '*downregulation*' das vias de sinalização do receptor de células T e B, além de diminuição das células T reguladoras e B (Ikeda, 2010; Ling, 2011; Hoang, 2014), e elevação da proporção de células T auxiliares Th17 (Jia, 2010).

A arterite necrotizante se desenvolve nas duas semanas iniciais, associada à infiltração de neutrófilos, que destroem as camadas íntima, média e alguns segmentos da adventícia da parede arterial. Proteínas da família S100 estão presentes no citoplasma de neutrófilos, monócitos e macrófagos e estão possivelmente envolvidas nesse processo inflamatório, uma vez que foram encontradas em maiores

concentrações em pacientes com DK, quando comparados aos controles saudáveis (Abe, 2005; Armaroli, 2019). Heterodímeros S100A8/A9 (calprotectina) têm sua concentração reduzida no plasma após o tratamento com IgIV, exceto em pacientes que desenvolvem aneurismas coronarianos gigantes (Lech, 2019).

Após essa etapa inicial, o período subagudo e crônico da doença é marcado por proliferação de miofibroblastos no lúmen arterial, podendo gerar obstrução das artérias coronárias, resultando em estenose e trombose arterial na fase crônica da doença. O infiltrado inflamatório é composto por linfócitos T CD8+, plasmócitos IgA+, eosinófilos e macrófagos, contribuindo para o dano arterial (Gordon, 2009; Orestein, 2012).

Dentro do processo de remodelação da parede arterial, as metaloproteinases da matriz (MMPs) têm papel significativo na DK. MMPs são endopeptidases dependentes de zinco, que degradam a matriz extracelular (Siefert 2012). Níveis aumentados de MMP3 e MMP9 foram encontrados em pacientes com DK e estão relacionados com o desenvolvimento de aneurismas de coronárias. Tais proteínas coordenam a migração vascular de células do músculo liso e neoformação da camada íntima (Popper, 2007; Shimizu 2010; Johnson, 2011).

A participação predominante da imunidade inata na fisiopatologia da DK é clara, uma vez que as alterações coronarianas são precipitadas pela ação de neutrófilos e monócitos.

Estudos realizados por análise de transcriptoma demonstraram o envolvimento de células do sistema imune inato e expressão aumentada do inflamassoma durante a fase aguda da doença (Hoang, 2014; Fury, 2014). Análises *in vitro* de células de sangue periférico extraídas de pacientes com DK revelaram liberação espontânea de IL-1, que cessou após tratamento com IgIV (Leung, 1989). Além disso, pacientes com DK, na fase aguda da doença, apresentaram concentrações mais elevadas de IL-1 e IL-18 quando comparados a pacientes com outras doenças febris, enquanto na fase crônica da doença foi observada uma redução dessas citocinas (Alphonse, 2016).

Corroborando a hipótese de ativação do complexo inflamassoma NLRP3, os transcritos gênicos relacionados ao NLRP3 têm sua expressão aumentada em células do sangue periférico de pacientes na fase aguda da DK, com diminuição na fase de convalescença. Além disso, foi encontrada expressão aumentada do gene IL-1 em

pacientes na fase aguda da doença que foi relacionada à resistência ao tratamento com IgIV (Fury, 2010; Alphonse 2016).

Outra estrutura importante para o desenvolvimento da DK são os Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), que contribuem para a eliminação de patógenos e restos celulares ao reconhecer os PAMPs (Padrão Molecular Associado ao Patógeno) e DAMPs (Padrão Molecular Associado ao Dano). Exemplos de RRP incluem pentraxinas, lectina ligadora de manose e substância amiloide A. Kusuda et al, após análise de pacientes com DK, evidenciaram que alguns RRP estão ligados à imunoglobulina G, desta forma o tratamento com IgIV pode funcionar absorvendo RRP ligados, retirando PAMPs e DAMPs da corrente sanguínea de pacientes com DK (Kusuda, 2014; Okuzaki, 2017).

### **1.5 Aspectos genéticos associados à Doença de Kawasaki**

Características epidemiológicas da DK, variação significativa de fenótipo e de frequência de acordo com grupos populacionais e sazonalidade reforçam a hipótese do envolvimento de um agente infeccioso, que muitas vezes gera infecção assintomática, no desenvolvimento da DK naqueles pacientes geneticamente predispostos.

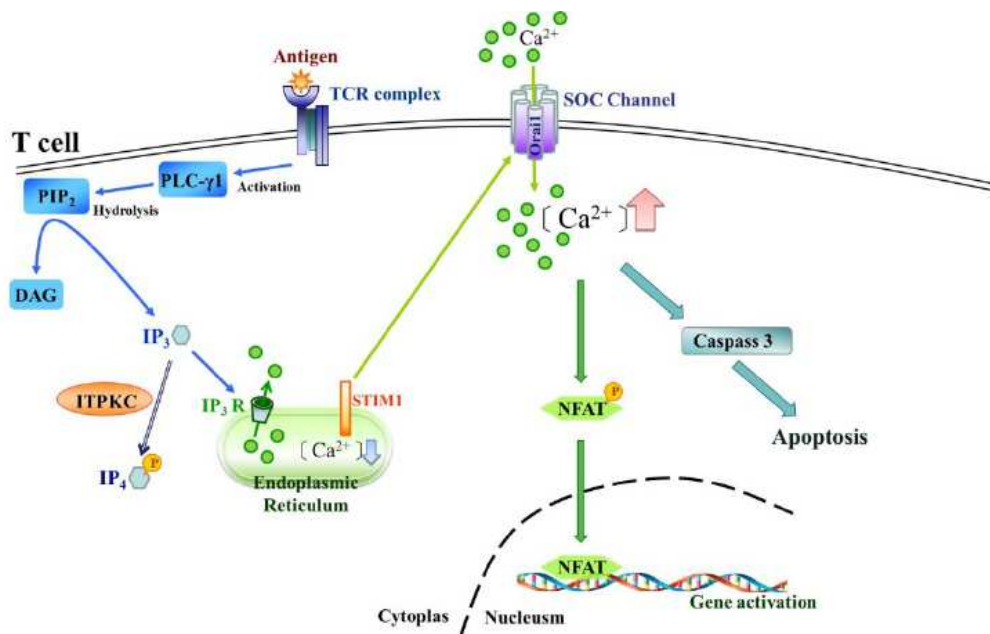
Alguns genes que compõem os antígenos leucocitários humanos (HLA), distribuídos de forma diferente entre vários grupos étnicos, foram associados com a maior susceptibilidade à DK. Por exemplo, foi observada associação do HLA- BW54 em pacientes japoneses (Matsuda, 1977) e do HLA- BW51 em pacientes de origem judaica e caucasianos (Krensky, 1983).

Variações genéticas, como polimorfismo de nucleotídeo único (*Single-Nucleotide Polymorphism - SNP*), têm sido estudadas por diversos autores, e algumas mutações já foram comprovadamente relacionadas com o desenvolvimento da DK. Um SNP funcional no inositol-triphosphate 3-kinase C (ITPKC), que está presente na sinalização de diversas células, tem sido associado ao aumento no risco de lesões coronarianas em pacientes taiwaneses (Kuo, 2011), japoneses e americanos com DK (Onouchi, 2008). Em células T, inositol 1,2,4 trisfosfato (IP3) é liberado após a estimulação do receptor de células T(TCR), aumentando os níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , gerando a translocação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), produção de IL-2 e ativação



de células T. ITPKC age negativamente regulando a ação de células T, uma vez que bloqueia a ligação de IP<sub>3</sub> com seu receptor (Jayaraman, 1995). A hipótese é de que polimorfismos em ITPKC possam contribuir para maior atividade de células T e facilitariam ativação do inflamassomo NLRP3, com aumento da produção de IL-1 $\beta$  and IL-18 (Alphonse, 2016).

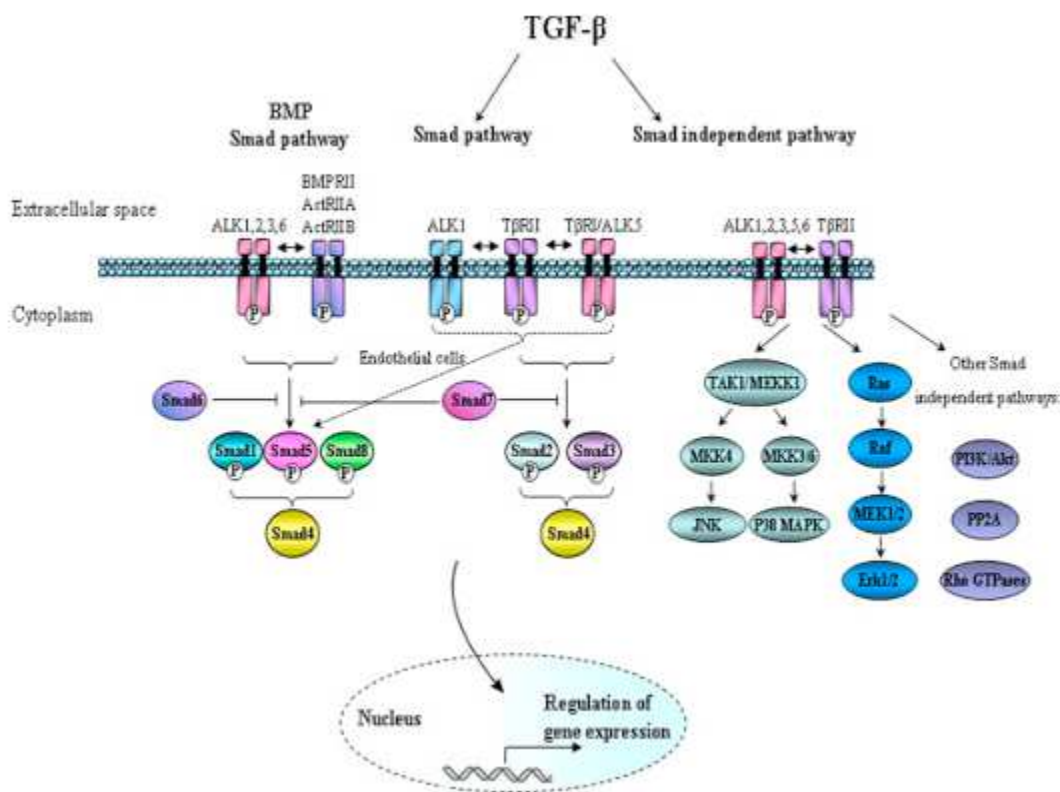
Outro polimorfismo associado a maior susceptibilidade para o desenvolvimento da DK e resposta ao tratamento com IgIV, foi encontrado em *ORAI1*. *ORAI1* é uma proteína funcionando como canal iônico seletivo de cálcio ligado à membrana, que participa da via de sinalização do NFAT. O SNP de *ORAI1* foi associado à DK na população japonesa, e esse polimorfismo foi encontrado 20 vezes mais na população japonesa do que na europeia (Onuchi, 2016). A via de sinalização NFAT e os canais de Ca<sup>2+</sup> são importantes para regulação intracelular de cálcio iônico, como consequência à ativação do inflamassomo e produção de IL-1. Adicionalmente, outro SNP relevante foi encontrado em *SLC8A1* que decodifica canais de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Tal polimorfismo está relacionado à maior susceptibilidade do desenvolvimento de DK e formação de aneurismas de coronária (Shimizu, 2016). (Figura 2)



**Figura 2.** Possíveis papéis de ITPKC e CASP3 na via Ca<sup>2+</sup>/NFAT em células T. TCR, receptor de células T; PLC, fosfolipase C; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>R, receptor de inositol 1,4,5-trifosfato; IP<sub>4</sub>, inositol 1,3,4,5-tetraquifosfato; PKC, proteína quinase C; ITPKC, inositol 1,4,5-trifosfato 3-quinase C; CASP3,

caspase-3; RE, retículo endoplasmático; ORAI1, modulador 1 de cálcio ativado pela liberação de cálcio; STIM1, molécula de interação estromal 1; NFAT, fator nuclear de células T ativadas. Fonte: adaptado de Kuo H.C.; Chang W.C. Cardiovascular Lesions of Kawasaki Disease: From Genetic Study to Clinical Management. 18 Julho 2012. DOI: 10.5772/48341

É sabido que a ativação de células T e a remodelação cardíaca, mediadas pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), correspondem a um mecanismo relevante na patogenia da DK. Dessa forma, foi evidenciado que polimorfismos genéticos da via do TGF- $\beta$  estão associados a maior susceptibilidade para surgimento de DK e desenvolvimento de aneurismas de coronária na população europeia e estadunidense. Tais polimorfismos incluem TGFB2, TGFBR2 e SMAD3 (Shimizu, 2011). (Figura 3)



**Figura 3.** Sinalização de TGF- $\beta$  através de vias dependentes e independentes de Smad. O TGF- $\beta$  liga-se a um complexo de receptores transmembranários serina/treonina quinases (T $\beta$ RII e T $\beta$ RI) e induz à fosforilação e ativação de T $\beta$ RI por T $\beta$ RII. Na maioria das células, o TGF- $\beta$  interage com T $\beta$ RII e ALK5, mas nas células endoteliais também pode sinalizar via ALK1. Sinalização de BMPs via BMPRII, ActRIIA e ActRIIB e receptores tipo I ALK1, 2, 3 e 6. Receptores tipo I ativados induzem à fosforilação de Smads regulados por receptor específico (R-Smads: Smad1, 2, 3, 5 e 8). ALK5 induz à fosforilação de

Smad2 e Smad3, e ALK1, 2, 3 e 6 medeiam a fosforilação de Smad1, Smad5 e Smad8. Os R-Smads ativados formam complexos heteroméricos com o mediador comum Smad4, que se acumulam no núcleo, onde podem atuar como complexos de fatores de transcrição e regular a expressão de genes alvo específicos. Fonte: Adaptado de Lifshitz V.; Frenkel D. in Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition), 2013

Outro mecanismo imunopatogênico conhecido é o aumento de TNF- $\alpha$  circulante na fase aguda da doença e sua associação com dano cardíaco. Corroborando essa hipótese, alterações na expressão do TNF- $\alpha$  devido ao SNP foram encontradas em pacientes com DK. Uma associação positiva foi encontrada relacionando lesões coronarianas com o genótipo TNF- $\alpha$  308A/G na população caucasiana (Quasney, 2001). Entretanto, na população japonesa não foi encontrada relação com nenhum polimorfismo associado ao TNF (Kawasaki T, 1974).

Adicionalmente, pacientes com DK tiveram expressão aumentada de CD40 ligante (CD40L) em células T CD4+ e plaquetas, quando comparados aos pacientes com outras síndromes febris. A expressão aumentada de CD40L estava relacionada ao surgimento de aneurismas de coronárias e diminuiu após tratamento com IgIV. (Wang, 2003). Um SNP em *CD40* foi encontrado em pacientes japoneses com DK e foi mais frequente em pacientes com aneurismas coronarianos do sexo masculino do que no sexo feminino (Onouchi, 2004). Outro SNP em *CD40* foi encontrado em uma coorte tailandesa, relacionando o polimorfismo com maior susceptibilidade à DK e desenvolvimento de aneurismas (Kuo, 2012).

A lectina ligadora de manose (*Mannose-binding lectin* - MBL) é um PRR do sistema imune inato capaz de ativar a cascata do sistema complemento, ligando-se à superfície de organismos patogênicos (Turner, 2003). Polimorfismos em MBL2 foram associados com maior risco de desenvolver DK em uma coorte japonesa (Sato, 2009), e um SNP no MBL2 foi relacionado ao maior desenvolvimento de lesões coronarianas em uma coorte holandesa de pacientes com DK (Biezeveld, 2006).

Polimorfismos em genes que decodificam receptores para fração Fc de imunoglobulinas (Fc $\gamma$ Rs) foram associados ao desenvolvimento de doenças autoimunes e infecciosas (Manger, 1998). Em estudo realizado com mais de 2000 pacientes com DK e 9000 controles com múltiplas coortes de diferentes populações, foi observado um SNP em FCGR2A, o qual decodifica Fc $\gamma$ RIIA (CD32a) (Khor, 2011).

Ouchi et al encontraram uma associação de polimorfismos no gene SLC11A1, em uma coorte com 71 crianças japonesas com diagnóstico de DK, mesmo gene associado à hipersensibilidade à BCG (Ouchi, 2003).

Diversos estudos analisaram associações genéticas por meio de uma análise de todo o genoma humano, quando não somente genes de interesse específico são avaliados. Um dos primeiros estudos, realizado Burgner et al em 2009, encontrou 31 genes associados à DK na população holandesa, dentre eles LNX1, CAMK2D, ZFH3, CSMD1 e TCP1. Além disso, funcionalmente, a expressão de tais genes estava significativamente reduzida na fase aguda da doença, quando comparada com a fase de convalescença.

Os estudos que envolvem análise genética podem trazer muitas informações acerca da etiologia da DK e acrescentarão opções diagnósticas e terapêuticas para os pacientes acometidos. Devido à variação genética entre as diferentes populações, diversas mutações são encontradas.

## **1.6 Surgimento da MIS-C e sua associação com a Doença de Kawasaki**

Acredita-se que a DK esteja relacionada a infecções virais, principalmente aquelas que afetam o trato respiratório. O aumento significativo na incidência de DK após o estabelecimento da pandemia de COVID-19 ressalta a importância dessa associação (Verdoni, 2020; Whittaker 2020).

Embora as principais características clínicas da COVID-19 já tenham sido descritas logo no início da circulação do vírus, o quadro clínico na população pediátrica foi detalhado mais tardiamente. Estudos mostraram que crianças e adolescentes são suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2, porém uma grande porcentagem de crianças é assintomática ou oligossintomática (Onder, 2020; Dong, 2020; Badal, 2021; Milani, 2021). As crianças com COVID-19 apresentam sintomas mais leves, têm menor risco de hospitalização e de complicações com risco de vida (Nikolopoulou & Maltezoub, 2022).

Entretanto, alguns pacientes na faixa etária pediátrica, apresentam após exposição ao SARS-CoV-2 sintomas que preenchem critérios para DK. Os primeiros casos surgiram na Europa (Toubiana, 2020; Verdoni, 2020; Whittaker, 2020) e Estados Unidos (Godfred-Cato, 2020). No início da pandemia, Verdoni et al relataram aumento de 30 vezes nos casos de DK em Bergamo, Itália (Verdoni, 2020).

Alguns pacientes não preenchem critérios para DK, porém apresentam algumas características comuns, a chamada 'doença de Kawasaki-like'. A doença na faixa etária pediátrica associada à COVID-19 foi chamada de *Multisystem Inflammatory Syndrome in Children* (MIS-C) e a confirmação do contato com o vírus é realizada por meio de sorologia e/ou Transcrição Reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Feldstein 2020, Verdoni 2020).

Algumas diferenças entre MIS-C e DK podem ser destacadas: DK é mais reportada na população asiática e em menores de 5 anos, com a maioria dos casos com boa evolução, enquanto a MIS-C é mais comum em pacientes com ascendência africana, hispânica ou latina. Sintomas como dor abdominal, vômitos, diarreia são mais comuns na MIS-C, assim como choque e coagulopatia. Além disso, a faixa etária das crianças acometidas é maior (CDC, 2020; Cherqaoui, 2021; Belay 2021).

A COVID-19 cursa com diferentes apresentações clínicas: indivíduos assintomáticos, outros com síndrome gripal, pacientes com síndrome respiratória aguda grave (SRAG) com necessidade de cuidados intensivos e suporte ventilatório e pacientes com doença sistêmica com distúrbio de coagulação. Estudos têm mostrado que os pacientes com pior evolução clínica demonstram sinais sugestivos de hipersecreção de citocinas (tempestade de citocinas). Tais sinais incluem: coagulopatia, diminuição dos níveis de fibrinogênio, plaquetopenia e dosagem de D-dímero elevada; trombocitopenia e leucopenia ao hemograma; dano tecidual e lesão hepática, elevação de desidrogenase láctica, transaminase pirúvica e transaminase oxalacética; e ativação de macrófagos, com níveis elevados de ferritina (WHO, 2019; Mattiuzzi, 2020).

Este conceito de tempestade de citocinas e as alterações laboratoriais que ocorrem na COVID-19 se assemelham à síndrome de ativação macrofágica (SAM), complicação rara de doenças como artrite idiopática juvenil (AIJ), lúpus eritematoso sistêmico (LES) e DK (Verdoni, 2020).

Henderson et al 2021, ressaltam que a hiperinflamação na COVID-19 difere do quadro de hiperprodução de citocinas, causado por outros vírus, uma vez que a infecção pelo SARS-CoV-2 gera elevação de ferritina de forma mais modesta e a lesão de órgãos é predominantemente no sistema respiratório. Entretanto, quanto piores forem as condições clínicas dos pacientes com SRAG com COVID-19, maiores são as semelhanças com o quadro de tempestade de citocinas e de SAM.

Corroborando tais suspeitas, Verdoni et al demonstraram que dentre 10 pacientes com DK e teste positivo para COVID-19, 50% apresentaram hipoperfusão tecidual com hipotensão sistólica, 80% linfopenia, trombocitopenia, hiponatremia, elevação de D-dímero e hipertrigliceridemia, sendo que 50% dos pacientes preenchem critérios para SAM (critérios estabelecidos pela *Paediatric Rheumatology International Trials Organisation*) (Verdoni, 2020).

Os sintomas relacionados à DK, MIS-C ou doença 'Kawasaki-like' surgem na fase subaguda a crônica da infecção pelo vírus, provavelmente gerados por mecanismo imunomediado, ao invés de efeito direto do vírus (Liu, 2020, Verdoni, 2020).

Analisando a fisiopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2, é sabido que o vírus infecta células endoteliais e do sistema imunológico através do receptor da enzima conversora da angiotensina 2 (Liu, 2020). O dano endotelial sofrido pelos pacientes pode estar relacionado à indução de apoptose e piroptose que o vírus provoca nas células infectadas (Varga, 2020).

Em indivíduos suscetíveis, o vírus interage com o hospedeiro de forma convencional, qualificando-se como gatilho. O resultado desse processo de morte celular gera DAMPs que levam à ativação do sistema imune inato algumas semanas após a infecção pelo vírus, período em que surgem os sintomas de DK ou MIS-C (Liu, 2020; Tang, 2020, Lee, 2020). Corroborando tal hipótese, foi encontrado aumento de DAMPs como HMGB1(*High mobility group box 1*) e S100A nos pacientes com COVID-19 grave e MIS-C (Chen, 2020a; Chen, 2020b; Ramaswamy, 2020).

Comparativamente, proteínas do grupo S100, HMGB1, fosfolipídios oxidados, proteína associada à apoptose contendo um domínio CARD, caspase-1 e gasdermina-D são reconhecidos como DAMPs. Alguns estudos observaram aumento

da concentração de tais proteínas nos pacientes com DK (Foell, 2003; Abe, 2005; Hoshina 2008; Truong, 2019; Nakashima, 2019; Jia, 2019). DAMPs ativam células do sistema imune inato e do endotélio para produção de citocinas pró-inflamatórias, com consequente ativação do inflamassoma NLRP3, resultando em aceleração da piroptose de células endoteliais e monócitos (Zeng, 2019).

Adicionalmente, em casos graves de COVID-19 foi observado um funcionamento inadequado do sistema imune adaptativo, com linfopenia, redução de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ circulantes, falha na ativação de células T CD8+ citotóxicas e células NK (Liu, 2020). Nos pacientes com MIS-C, observou-se linfopenia com diminuição de linfócitos TCD3+, CD4+ naive e CD8+ (Consiglio, 2020).

Sole et al (2021) analisaram as diferenças clínicas e laboratoriais de pacientes com DK e MIS-C. Na coorte observada pelos autores, as citocinas relacionadas ao IFN- $\gamma$ , à IL-1 e aos monócitos foram os principais fatores relacionados à fase aguda da inflamação, tanto no grupo MIS-C quanto no grupo DK. A diferença encontrada foi um aumento considerável das citocinas relacionadas ao IFN- $\gamma$  no subgrupo dos pacientes com MIS-C grave, quando comparados ao grupo *Kawasaki-like*.

Chou et al identificaram mutações em 3 pacientes (17%), de um total de 18, com diagnóstico de MIS-C. Os defeitos foram encontrados no gene XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) e CYBB (*cytochrome b-245 beta chain*) e as variantes encontradas são preditas como patogênicas.

XIAP é uma proteína que contribui para ativação celular e *downregulation* do sistema NLRP3 inflamassoma. A CYBB decodifica uma subunidade do sistema NADPH oxidase, essencial para o *burst* oxidativo em fagócitos e responsável pela eliminação de patógenos fagocitados; e variantes deletérias de CYBB causam doença granulomatosa crônica.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Em virtude da pandemia de COVID-19, houve aumento expressivo na incidência de DK em crianças, que apresentaram quadros mais graves, refletindo em aumento de morbidade e de mortalidade em algumas regiões. É de grande relevância caracterizarmos o perfil genético dos pacientes no nosso meio e avaliarmos os grupos com potencial de maior gravidade de doença, podendo no futuro direcionar melhores opções de diagnóstico e de terapêutica.



### **3. OBJETIVO**

Realizar análise genética de pacientes pediátricos diagnosticados com DK após o início de pandemia por SARS-CoV-2, através de extração de DNA, sequenciamento e análise de regiões de interesse do exoma.

#### **4. HIPÓTESE**

O perfil genético dos pacientes com DK após o surgimento do SARS-CoV- 2 caracteriza-se por mutações consideradas patogênicas e mostra mutações em comum. Diferentes fenótipos apresentam diferentes genótipos.

## **5. CASUÍSTICA E METODOLOGIA**

Trata-se de estudo prospectivo, multicêntrico observacional realizado no Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo em parceria com 6 centros de Reumatologia Pediátrica brasileiros (7 centros ao total).

O projeto foi encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos das instituições envolvidas, tendo sido aprovado em 10/09/2020 sob o número CAAE: 33575120.7.1001.5505 (Anexo 1).

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do Termo de Assentimento, foram incluídos no trabalho os indivíduos que preencheram os critérios de inclusão (Anexos 2 e 3).

Foram avaliados 25 crianças e adolescentes diagnosticados com DK completa ou incompleta na presença ou ausência de infecção pelo SARS-CoV-2.

### **5.1 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos no estudo:

Grupo Kawasaki: pacientes até 20 anos de idade com diagnóstico de DK completa ou incompleta de acordo com os critérios de American Heart Association (McCrindle, 2017) no período da pandemia da COVID-19. A coleta foi realizada entre março de 2020 e dezembro de 2022

### **5.2 Avaliação clínica**

Os seguintes dados clínicos foram coletados através de análise de prontuário: nome, idade, sexo, peso, índice de massa corpórea, comorbidades prévias, sinais e sintomas apresentados pelo paciente, necessidade de terapia intensiva, terapêutica utilizada, resultados laboratoriais como hemograma, eletrólitos, função renal, função hepática, provas de fase aguda de inflamação, D-dímero, ferritina, provas da coagulação, além de exames de imagem realizados como ecocardiograma e tomografia computadorizada de tórax.

Os pacientes foram considerados positivos para COVID-19 quando apresentaram PCR para SARS-CoV-2 positivo e/ou sorologia IgG, IgM ou IgA positivas para SARS-CoV-2, no período do estudo a vacinação para faixa etária pediátrica não tinha sido aprovada. Além disso, analisamos os pacientes de acordo com a definição de caso da OMS (WHO, 2021) para MIS-C. Realizamos análise estatística comparando achados clínicos e laboratoriais de pacientes positivos para COVID-19 e pacientes negativos COVID-19, através do teste Teste U de Mann-Whitney.

### **5.3 Coleta de material para análise laboratorial**

Foi realizada coleta de 4 mL de sangue por meio de punção venosa em membros superiores, sendo este procedimento realizado por profissional de saúde devidamente capacitado. Após a coleta da amostra, o sangue foi armazenado em frasco de EDTA e enviado ao Laboratório de Pesquisas da Disciplina de Infectologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo.

As amostras de sangue de pacientes com DK advindos dos outros centros de pesquisa vinculados a este estudo e diferentes daqueles do Hospital São Paulo/Unifesp foram coletadas no seu respectivo centro, por profissional de saúde capacitado, armazenadas em frasco de EDTA e enviadas por *courrier* para amostras biológicas para o Laboratório de Pesquisas da Disciplina de Infectologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo.

As amostras de sangue coletado foram processadas em até vinte quatro horas após sua coleta. A extração de DNA foi realizada com o Kit QIAmp DNA blood Mini Kit (Qiagen, Alemanha) segundo as instruções do fabricante; após extração, amostras foram armazenadas em temperatura de -80 °C no Laboratório de Pesquisas da Disciplina de Infectologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo.

O DNA genômico já extraído sofreu uma fragmentação seguida de indexação, captura e enriquecimento com sondas desenhadas para o genoma humano com kit de preparo de biblioteca Nextera DNA Flex (Nextera DNA Library Preparation Kit). O sequenciamento de nova geração (NGS) das sequências-alvo foi realizado utilizando a plataforma NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, EUA).

As chamadas variantes de único nucleotídeo (SNVs), pequenas InDels, grandes deleções e duplicações (CNVs) foram realizadas com a versão pipeline de bioinformática DRAGEN3.6, com GRCh37 como referência do genoma humano através da plataforma de análise da Emedgene. A interpretação das variantes foi realizada de acordo com as diretrizes do Guia American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards, 2015).

#### **5.4 Análise genética e interpretação dos resultados**

Após revisão de literatura, genes de interesse relacionados à DK e desenvolvimento de MIS-C e DK associado à COVID-19 foram selecionados. Os seguintes genes foram associados à DK: ITPKC, ORAI1, FCGR2, CD40, BLK, CASP3, TGFB2, TGFB2, MMP, SMAD, ITPR3, KIF25, PTPRJ, SPECC1L, RPN2, PTGS1, CARD8, NAALADL2, ZFH3. Além disso, os seguintes genes foram associados à MIS-C: FREM1, MOP, POLG, C6, C9, ABCC6, ABCA4, NLRP12, BSCL2, XIAP, CYBB, SOCS1.

As variantes encontradas foram analisadas nas principais bases de dados genéticos e classificadas em 'patogênicas', 'provavelmente patogênicas', 'significado incerto', 'provavelmente benignas', e 'benignas' de acordo com critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica e a Associação de Patologia Molecular- The American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology - ACMMG/AMP (Richards, 2015).

Foi realizada priorização de variantes potencialmente patogênicas com qualidade de sequenciamento e mapeamento acima de 30 de profundidade e leitura acima de 10. Além disso, devendo ter frequência alélica menor global inferior a 0,01 em pelo menos um banco de dados populacional (1000 Genomes; ESP6500; Exome Aggregation Consortium - ExAC; The Genome Aggregation Database - GnomAD; e o banco de dados brasileiro de variantes genômicas ABraOM).

Nos quadros 1 e 2 encontram-se os critérios utilizados para classificar as variantes em patogênicas e benignas.

**Quadro 1- Critérios de patogenicidade utilizados para classificar as variantes**

<b>Evidência de patogenicidade</b>	<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
Evidência muito forte	PVS1	Variante nula ( <i>nonsense</i> , <i>frameshift</i> , canônico $\pm$ 1 ou 2 locais de <i>splice</i> , códon de iniciação, deleção única ou multiexon) em um gene onde LOF é um mecanismo conhecido de doença.
Evidência forte	PS1	Mesma mudança de aminoácido em uma variante patogênica previamente estabelecida, independentemente da mudança de nucleotídeo.
Evidência forte	PS2	Mutação de novo confirmada (paciente com doença, sem histórico familiar, com pai e mãe testados)
Evidência forte	PS3	Estudos funcionais <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> bem estabelecidos que apoiam um efeito prejudicial no gene ou produto gênico.
Evidência forte	PS4	Prevalência da variante em pessoas afetadas significativamente maior do que nos controles
Evidência moderada	PM1	Localizado em uma região ' <i>hot spot</i> ' mutacional ou domínio funcional crítico e bem estabelecido (por exemplo, sítio ativo de uma enzima) sem variantes benignas frequentes
Evidência moderada	PM2	Ausência ou com baixa frequência em bancos de dados populacionais
Evidência moderada	PM3	Para recessivos - detectável com uma mutação patogênica em trans
Evidência moderada	PM4	O comprimento da proteína muda como resultado de deleções/inserções <i>in-frame</i> em uma região não repetida ou variantes de <i>stop-loss</i> .
Evidência moderada	PM5	<i>Missense</i> que altera um resíduo de aminoácido, no qual uma <i>missense</i> diferente é previamente estabelecida como patogênica
Evidência moderada	PM6	De novo não confirmado (sem dados paternos ou maternos)
A favor de patogenicidade	PP1	Variante segregada com doença em múltiplos membros da família afetados em gene sabidamente causador da doença
A favor de patogenicidade	PP2	Variante <i>missense</i> em um gene que tem uma baixa taxa de variantes <i>missense</i> benignas e em que as variantes <i>missense</i> são um mecanismo comum de doença.
A favor de patogenicidade	PP3	Múltiplas linhas de evidência computacional com um efeito deletério sobre o gene ou produto do gene (conservação, evolução, impacto de <i>splicing</i> , etc)
A favor de patogenicidade	PP4	O fenótipo do paciente ou história familiar é altamente específico para uma doença com etiologia de um único gene
A favor de	PP5	Fonte confiável relatou recentemente a variante como patogênica, mas a evidência

patogenicidade		não está disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente.
----------------	--	---

Adaptado de Richards et al., 2015

## Quadro 2 - Critérios de benignidade utilizados para classificar as variantes

Evidência de benignidade	Categoria	Descrição
Critério independente para benignidade	BA1	Muito comum (frequência do alelo é > 5%)
Evidência forte	BS1	Alta frequência (comum), maior do que esperado para doença
Evidência forte	BS2	Presente no controle saudável,
Evidência forte	BS3	Estudos funcionais in vitro ou in vivo bem estabelecidos que mostram nenhum efeito prejudicial no gene ou produto gênico.
Evidência forte	BS4	Falta de segregação nos membros afetados de uma família.
A favor de benignidade	BP1	Variante <i>missense</i> em um gene, que as variantes truncadas são conhecidas por causar doenças.
A favor de benignidade	BP2	Observado em trans com uma variante patogênica para um gene/distúrbio dominante totalmente penetrante ou observado em cis com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança
A favor de benignidade	BP3	Deleções/inserções <i>in-frame</i> em uma região repetitiva sem uma função conhecida
A favor de benignidade	BP4	Múltiplas linhas de evidência computacional não sugerem nenhum impacto no gene ou produto do gene (conservação, evolução, impacto de <i>splicing</i> , dentre outras)
A favor de benignidade	BP5	Causa alternativa (variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para doença)
A favor de benignidade	BP6	Fonte confiável relatou recentemente a variante como benigna, mas a evidência não está disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente.
A favor de benignidade	BP7	Uma variante sinônima (silenciosa) para a qual algoritmos de previsão de <i>splicing</i> não preveem nenhum impacto na sequência de consenso de <i>splice</i> nem a criação de um novo local de <i>splice</i> e o nucleotídeo não é altamente conservado.

Adaptado de Richards et al., 2015

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe J, et al. Characterization of T cell repertoire changes in acute Kawasaki disease. *J. Exp. Med.* 1993;177:791–796.

Abe J, et al. Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J. Immunol.* 2005;174:5837–5845.

Abe J, et al. Selective expansion of T cells expressing T-cell receptor variable regions V beta 2 and V beta 8 in Kawasaki disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992;89:4066–4070.

Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J Immunol* 2005; 174: 5837–5845.

Alphonse MP, et al. Inositol-triphosphate 3-kinase C mediates inflammasome activation and treatment response in Kawasaki disease. *J. Immunol.* 2016;197:3481–3489.

Alphonse MP, et al. Inositol-triphosphate 3-kinase C mediates inflammasome activation and treatment response in Kawasaki disease. *J. Immunol.* 2016;197:3481–3489.

Amano S 1980, Hazama F, Kubagawa H, Tasaka K, Haebara H, Hamashima Y. General pathology of Kawasaki disease: on the morphological alterations corresponding to the clinical manifestations. *Acta Pathol Jpn.* 1980; 30:681–694

Armaroli G, et al. Monocyte-derived interleukin-1 $\beta$  as the driver of S100A12-induced sterile inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells: implications for the pathogenesis of Kawasaki disease. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71:792–804.

Badal S., Thapa Bajgain K., Badal S., et al. Prevalence, clinical characteristics, and outcomes of pediatric COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.* 2021;135:104715.



Baker AL, Lu M, Minich LL, Atz AM, Klein GL, Korsin R, Lambert L, Li JS, Mason W, Radojewski E, Vetter VL, Newburger JW; Pediatric Heart Network Investigators. Associated symptoms in the ten days before diagnosis of Kawasaki disease. *J Pediatr.* 2009; 154:592–595.e2.

Barton M, Melbourne R, Morais P, Christie C. Kawasaki syndrome associated with group A streptococcal and Epstein–Barr virus co-infections. *Ann Trop Paediatr.* (2002) 22:257–60. 10.1179/027249302125001543

Belay E.D., Abrams J., Oster M.E., et al. Trends in geographic and temporal distribution of us children with multisystem inflammatory syndrome during the COVID-19 Pandemic. *JAMA Pediatr.* 2021;175(8):837–845.

Biezeveld MH, et al. Polymorphisms in the mannose-binding lectin gene as determinants of age-defined risk of coronary artery lesions in Kawasaki disease. *Arthritis Rheum.* 2006;54:369–376.

Burgner D, Davila S, Breunis WB et al (2009) A genome-wide association study identifies novel and functionally related susceptibility loci for Kawasaki disease. *PLoS Genet* 5:e1

Burns JC, Herzog L, Fabri O, Tremoulet AH, Rodó X, Uehara R, Burgner D, Bainto E, Pierce D, Tyree M, Cayan D, Kawasaki Disease Global Climate Consortium Seasonality of Kawasaki disease: a global perspective. *PLOS ONE.* 2013;8(9):e74529.

CDC (2020) Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/mis-c/hcp/>. Accessed 11 Aug 2020

Chang LY, Lu CY, Shao PL, Lee PI, Lin MT, Fan TY, Cheng AL, Lee WL, Hu JJ, Yeh SJ, Chang CC, Chiang BL, Wu MH, Huang LM. Viral infections associated with Kawasaki disease. Volume 113, Issue 3, March 2014, Pages 148-154.

Chen L, Long X, Xu Q et al. Elevated serum levels of S100A8/A9 and HMGB1 at hospital admission are correlated with inferior clinical outcomes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020; 17: 992–994. (b)

Chen R, Huang Y, Quan J et al. HMGB1 as a potential biomarker and therapeutic target for severe COVID-19. *Heliyon* 2020; 6: e05672. (a)

Cherqaoui B., Koné-Paut I., Yager H., et al. Delineating phenotypes of Kawasaki disease and SARS-CoV-2-related inflammatory multisystem syndrome: a French study and literature review. *Rheumatology*. 2021;60(10):4530–4537.

Chou J, Platt CD, Habiballah S, Nguyen AA, Elkins M, et al. Taking on COVID-19 Together Study Investigators. Mechanisms underlying genetic susceptibility to multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Sep;148(3):732-738.e1. Epub 2021 Jul 2.

Consiglio CR, Cotugno N, Sardh F et al. The immunology of multisystem inflammatory syndrome in children with COVID-19. *Cell* 2020; 183: 968–981.e7

Curtis N, Zheng R, Lamb JR, Levin M. Evidence for a superantigen mediated process in Kawasaki disease. *Arch. Dis. Child*. 1995;72:308–311. doi: 10.1136/adc.72.4.308.

Dajani AS, Taubert KA, Gerber MA, Shulman ST et al. Diagnosis and Therapy of Kawasaki Disease in Children, AHA Scientific Council; Vol 87, No S Maio 1993, Pages 1776-1780.

Dietz SM, van Stijn D, Burgner D, Levin M, Kuipers IM, Hutten BA, et al. Dissecting Kawasaki disease: a state-of-the-art review. *Eur J Pediatr*. 2017; 176:995-1009.

Dolezalová P, Telekesová P, Nemcová D, Hoza J. Incidence of vasculitis in children in the Czech Republic: 2-year prospective epidemiology survey. *J Rheumatol*. 2004;31(11):2295–9

Dong Y., Mo X., Hu Y., et al. Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics*. 2020;145

Egami K, Muta H, Ishii M, Suda K, Sugahara Y, Iemura M, et al. Prediction of resistance to intravenous immunoglobulin treatment in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr*. 2006;149(2):237-40.

Faulkner L, Cooper A, Fantino C, Altmann DM, Sriskandan S. The mechanism of superantigen-mediated toxic shock: not a simple Th1 cytokine storm. *J. Immunol*. 2005;175:6870–6877. doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6870

Feeney CC, Ajagbe OA, Suryadevara M. *Yersinia enterocolitica* infection presenting as incomplete Kawasaki disease: 2 cases and a review of the literature. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2020; p1aa016.

Feldstein LR, Rose EB, Horwitz SM, Collins JP, Newhams MM, Son MBF, et al. Multisystem inflammatory syndrome in US Children and adolescents. *N Engl J Med*. 2020;383(4):334–346.

Foell D, Ichida F, Vogl T et al. S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *Lancet* 2003; 361: 1270–1272.

Fury W, et al. Transcript abundance patterns in Kawasaki disease patients with intravenous immunoglobulin resistance. *Hum. Immunol*. 2010;71:865–873.

Godfred-Cato S, Bryant B, Leung J et al. COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in children - United States, March-July 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020; 69: 1074–1080.

Gordon JB, Kahn AM, Burns JC. When children with Kawasaki disease grow up: myocardial and vascular complications in adulthood. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2009;54:1911–1920.

Hara T, Nakashima Y, Sakai Y, Nishio H, Motomura Y, Yamasaki S. Kawasaki disease: a matter of innate immunity. *Clin Exp Immunol* 2016; 186: 134–143

Henderson LA, et al. American College of Rheumatology Clinical Guidance for Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated with SARS-CoV-2 and Hyper inflammation in Pediatric COVID-19: Version 2. *Arthritis & Rheumatol*, 2021; 73(4): 13-29

Heuclin T, Dubos F, Hue V, Godart F, Francart C, Vincent P, Hospital Network for Evaluating the Management of Common Childhood Diseases. Martinot A. Increased detection rate of Kawasaki disease using new diagnostic algorithm, including early use of echocardiography. *J Pediatr*. 2009;155(5):695–9.e1.

Hoang LT, Shimizu C, Ling L et al. Global gene expression profiling identifies new therapeutic targets in acute Kawasaki disease. *Genome Med* 2014; 6: 541

Hoang LT, Shimizu C, Ling L et al. Global gene expression profiling identifies new therapeutic targets in acute Kawasaki disease. *Genome Med* 2014; 6: 541

Hoshina T, Kusahara K, Ikeda K, Mizuno Y, Saito M, Hara T. High mobility group box 1 (HMGB1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol* 2008; 37: 445–449.

Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T et al. Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 246–255.

Jayaraman T, Ondriasova E, Ondrias K, Harnick DJ, Marks AR. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1995;92:6007–6011.

Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 1–11.

Jia C, Zhang J, Chen H et al. Endothelial cell pyroptosis plays an important role in Kawasaki disease via HMGB1/RAGE/cathepsin B signaling pathway and NLRP3 inflammasome activation. *Cell Death Dis* 2019; 10: 778.

Jia S, Li C, Wang G, Yang J, Zu Y. The T helper type 17/regulatory T cell imbalance in patients with acute Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 162: 131–137.

Johnson JL, Dwivedi A, Somerville M, George SJ, Newby AC. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31:e35–e44

Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S, et al. A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan. *Pediatrics* 1974;54:271–6

Khor CC, et al. Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease. *Nat. Genet.* 2011;43:1241–1246.

Kim GB, Han JW, Park YW, Song MS, Hong YM, Cha SH, et al.. Epidemiologic features of Kawasaki disease in South Korea: data from nationwide survey, 2009-2011. *Pediatr Infect Dis J.* (2014) 33:24–7. 10.1097/INF.000000000000010.

Kobayashi T, Inoue Y, Takeuchi K, Okada Y, Tamura K, Tomomasa T, et al. Prediction of intravenous immunoglobulin unresponsiveness in patients with Kawasaki disease. *Circulation.* 2006;113(22):2606-12.

Krensky AM, Grady S, Shanley KM, Berenberg W, Yunis EJ (1983) Epidemic and endemic HLA-B and DR associations in mucocutaneous lymph node syndrome. *Hum Immunol* 6:75–77

Kuijpers TW, Wiegman A, van Lier RA et al. Kawasaki disease: a maturational defect in immune responsiveness. *J Infect Dis* 1999; 180: 1869–1877.

Kuo H-C, et al. CD40 gene polymorphisms associated with susceptibility and coronary artery lesions of Kawasaki disease in the Taiwanese population. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:520865.

Kuo HC, et al. ITPKC single nucleotide polymorphism associated with the Kawasaki disease in a Taiwanese population. *PLoS One*. 2011;6:e17370. doi: 10.1371/journal.pone.0017370.

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K et al. Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms. *PLoS One* 2014; 9: e113054.

Lech M, et al. Circulating markers of inflammation persist in children and adults with giant aneurysms after Kawasaki disease. *Circ. Genom. Precis. Med*. 2019;12:e002433.

Lee S, Channappanavar R, Kanneganti TD. Coronaviruses: innate immunity, inflammasome activation, inflammatory cell death, and cytokines. *Trends Immunol* 2020; 41: 1083–1099.

Leung DY, et al. Endothelial cell activation and high interleukin-1 secretion in the pathogenesis of acute Kawasaki disease. *Lancet*. 1989;2:1298–1302.

Leung DY, et al. Endothelial cell activation and high interleukin-1 secretion in the pathogenesis of acute Kawasaki disease. *Lancet*. 1989;2:1298–1302. doi: 10.1016/S0140-6736(89)91910-7.

Lin MC, Lai MS, Jan SL, Fu YC. Epidemiologic features of Kawasaki disease in acute stages in Taiwan, 1997-2010: effect of different case definitions in claims data analysis. *J Chin Med Assoc*. (2015) 78:121–6. 10.1016/j.jcma.2014.03.009

Lin MC, Lai MS, Jan SL, Fu YC. Epidemiologic features of Kawasaki disease in acute stages in Taiwan, 1997-2010: effect of different case definitions in claims data analysis. *J Chin Med Assoc*. (2015) 78:121–6. 10.1016/j.jcma.2014.03.009

Ling XB, Lau K, Kanegaye JT et al. A diagnostic algorithm combining clinical and molecular data distinguishes Kawasaki disease from other febrile illnesses. *BMC Med* 2011; 9: 130.

Liu PP, Blet A, Smyth D, Li H. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. *Circulation* 2020; 142: 68–78.

Liu PP, Blet A, Smyth D, Li H. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. *Circulation* 2020; 142: 68–78.

Lynch M, Holman RC, Mulligan A, Belay ED, Schonberger LB. Kawasaki syndrome hospitalizations in Ireland, 1996 through 2000. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(11):959–63

Makino N, Nakamura Y, Yashiro M, Kosami K, et al. The Nationwide epidemiologic survey of Kawasaki disease in Japan, 2015-2016. *Pediatr Int.* 2019;61(4):397–403.

Makino N, Nakamura Y, Yashiro M, Sano T, Ae R, Kosami K, et al.. Epidemiological observations of Kawasaki disease in Japan, 2013-2014. *Pediatr Int.* (2018) 60:581–7. 10.1111/ped.13544

Mancia L, et al. Characterization of the T-cell receptor V-beta repertoire in Kawasaki disease. *Scand. J. Immunol.* 1998;48:443–449. doi: 10.1046/j.1365-3083.1998.00415.x

Manger K, et al. Fcγ receptor IIa polymorphism in Caucasian patients with systemic lupus erythematosus: association with clinical symptoms. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1181–1189.

Marriott DJ, Taylor S, Dorman DC. *Yersinia enterocolitica* infection in children. *Med J Aust* 1985; 143: 489–492.

Matsubara K, Fukaya T, Miwa K, Shibayama N, Nigami H, Harigaya H, et al.. Development of serum IgM antibodies against superantigens of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* (2006) 143:427–34. 10.1111/j.1365-2249.2006.03015.x

Matsuda I, Hattori S, Nagata N, Fruse A, Nambu H (1977) HLA antigens in mucocutaneous lymph node syndrome. *Am J Dis Child* 131:1417–1418

Mattiuzzi C, Lippi G. Which lessons shall we learn from the 2019 novel coronavirus outbreak? *Ann Transl Med* 2020; 8:48.

McCrindle B. W. Circulation. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Scientific Statement for Health Professionals From the American Heart Association, Volume: 135, Issue: 17, Pages: e927-e999.

Milani G.P., Bottino I., Rocchi A., et al. Frequency of children vs adults carrying severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 asymptomatically. *JAMA Pediatr.* 2021;175(2):193–194.

Minich LL, Sleeper LA, Atz AM, McCrindle BW, Lu M, Colan SD, Printz BF, Klein GL, Sundel RP, Takahashi M, Li JS, Vetter VL, Newburger JW; Pediatric Heart Network Investigators. Delayed diagnosis of Kawasaki disease: what are the risk factors? *Pediatrics.* 2007; 120:e1434–e1440.

Nakashima Y, Sakai Y, Mizuno Y et al. Lipidomics links oxidized phosphatidylcholines and coronary arteritis in Kawasaki disease. *Cardiovasc Res* 2019; 117: 96–108.

Nikolopoulou GB, Maltezou HC. COVID-19 in Children: Where do we Stand? *Arch Med Res.* 2022 Jan;53(1):1-8. doi: 10.1016/j.arcmed.2021.07.002. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34311990; PMCID: PMC8257427.

Normann F, Nääs J, Gnärpe J, Bäckman H, Gnärpe H. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular tissue from children with Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J.* (1999) 18:72–3.

Okuzaki D, Ota K, Takatsuki SI et al. FCN1 (M-ficolin), which directly associates with immunoglobulin G1, is a molecular target of intravenous immunoglobulin therapy for Kawasaki disease. *Sci Rep* 2017; 7: 11334.



Onder G., Rezza G., Brusaferro S. Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy. *JAMA*. 2020 ; Mar 23:

Onouchi Y, et al. CD40 ligand gene and Kawasaki disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 2004;12:1062–1068.

Onouchi Y, et al. ITPKC functional polymorphism associated with Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery aneurysms. *Nat. Genet.* 2008;40:35–42.

Onouchi Y, et al. Variations in ORAI1 gene associated with Kawasaki disease. *PLoS One.* 2016;11:e0145486.

Orenstein JM, et al. Three linked vasculopathic processes characterize Kawasaki disease: a light and transmission electron microscopic study. *PLoS One.* 2012;7:e38998.

Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T et al (2003) Polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease. *J Infect Dis* 187:326–329

Pietra BA, De Inocencio J, Giannini EH, Hirsch R. TCR V beta family repertoire and T cell activation markers in Kawasaki disease. *J. Immunol.* 1994;153:1881–1888

Popper SJ, et al. Gene-expression patterns reveal underlying biological processes in Kawasaki disease. *Genome Biol.* 2007;8:R261.

Quasney MW, Bronstein DE, Cantor RM et al (2001) Increased frequency of alleles associated with elevated tumor necrosis factor-alpha levels in children with Kawasaki disease. *Pediatr Res* 49:686–690

Ramaswamy A, Brodsky NN, Sumida TS et al. Post-infectious inflammatory disease in MIS-C features elevated cytotoxicity signatures and autoreactivity that correlates with severity. *medRxiv [Preprint]* 2020.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, et al. Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.

Rossi FS, Silva MF, Kozu KT, Camargo LF, Rossi FF, Silva CA, et al. Extensive cervical lymphadenitis mimicking bacterial adenitis as the first presentation of Kawasaki disease. *Einstein (São Paulo)*. 2015; 13(3):426-9.

Rowley AH, et al. IgA plasma cell infiltration of proximal respiratory tract, pancreas, kidney, and coronary artery in acute Kawasaki disease. *J. Infect. Dis*. 2000;182:1183–1191.

Sano T, Kurotobi S, Matsuzaki K, Yamamoto T, Maki I, Miki K, et al. Prediction of non-responsiveness to standard high-dose gamma-globulin therapy in patients with acute Kawasaki disease before starting initial treatment. *Eur J Pediatr*. 2007;166(2):131-7.

Sato S, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with Kawasaki disease in the Japanese. *Int. J. Rheum. Dis*. 2009;12:307–310.

Shimizu C, et al. Matrix metalloproteinase haplotypes associated with coronary artery aneurysm formation in patients with Kawasaki disease. *J. Hum. Genet*. 2010;55:779–784.

Shimizu C, Jain S, Davila S, Hibberd ML, Lin KO, Molkara D, et al. Transforming growth factor-beta signaling pathway in patients with Kawasaki disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:16–25.

Siefert SA, Sarkar R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular*. 2012;20:210–216.

Sole A E, Anton J, Ramirez R M P, Manubens J S, et al. Similarities and differences between the immunopathogenesis of COVID-19–related pediatric multisystem inflammatory syndrome and Kawasaki disease. *J Clin Invest*. 2021;131(6):e144554.

Tacke CE, Breunis WB, Pereira RR, Breur JM, Kuipers IM, Kuijpers TW. Five years of Kawasaki disease in the Netherlands: a national surveillance study. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(8):793–7.

Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S, Wakayama M, Yokouchi Y. Neutrophilic involvement in the damage to coronary arteries in acute stage of Kawasaki disease. *Pediatr Int* 2005; 47: 305–310.

Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y. Histopathological aspects of cardiovascular lesions in Kawasaki disease. *Int. J. Rheum. Dis*. 2017;21:31–35.

Tang D, Comish P, Kang R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog* 2020; 16: e1008536.

Terreri MT, Clemente G. Developments in large and midsize vasculitis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013; 39(4):855-75.

Truong DML, Lin E. Next generation sequencing in kawasaki disease: a pilot study. *Circulation* 2019; 140: A15274.

Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol. Immunol*. 2003;40:423–429.

Uehara R, Belay ED. Epidemiology of Kawasaki disease in Asia, Europe, and the United States. *J Epidemiol*. 2012;22(2):79–85.

Varga Z, Flammer AJ, Steiger P et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 2020; 395: 1417–1418

Varga Z, Flammer AJ, Steiger P et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 2020; 395: 1417–1418

Verdoni L, Mazza A, Gervasoni A et al. An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. *Lancet* 2020; 395: 1771–1778

Wang JN, Wang SM, Liu CC, Wu JM. *Mycoplasma pneumoniae* infection associated with Kawasaki disease. *Acta Paediatr.* (2001) 90:594–5. 10.1111/j.1651-2227.2001.tb00810.x

Wardle AJ, Connolly GM, Seager MJ, Tulloh RM. Corticosteroids for the treatment of Kawasaki disease in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;1:CD011188.

Whittaker E., Bamford A., Kenny J., et al. Clinical characteristics of 58 children with a pediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020;324(3):259–269.

WHO. Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents with COVID-19: Scientific brief. 2020 WHO reference number: WHO/2019-nCoV/Sci\_Brief/Multisystem\_Syndrome\_Children/2020.1. <https://www.who.int/publications-detail/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>.

Zeng C, Wang R, Tan H. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications. *Int J Biol Sci* 2019; 15: 1345–1357.



## 7. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

### DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA

#### Resumo

**Introdução:** Doença de Kawasaki (DK) é uma vasculite de vasos de médio calibre, cuja principal complicação é o aneurisma das artérias coronárias. Diversos estudos buscam elucidar a etiologia da DK, de tal forma que, algumas mutações já foram comprovadamente relacionadas ao seu desenvolvimento, além disso, acredita-se que infecções virais, principalmente aquelas que afetam o trato respiratório, também estejam relacionada ao seu desenvolvimento. O aumento significativo na incidência de DK após o estabelecimento da pandemia de COVID-19 ressalta a importância dessa associação. **Objetivos:** Este estudo tem como objetivo realizar análise genética de pacientes pediátricos diagnosticados com DK após o início de pandemia por SARS-CoV-2. **Materiais e métodos:** Foram incluídos no estudo pacientes de até 20 anos de idade com diagnóstico de DK completa ou incompleta de acordo com os critérios da *American Heart Association*, no período da pandemia da COVID-19. Foi realizada coleta de sangue dos pacientes, em seguida realizada extração de DNA e as amostras foram armazenadas em temperatura de -80 °C no Laboratório de Pesquisas da Disciplina de Infectologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo. O DNA genômico extraído sofreu uma fragmentação seguida de indexação, captura e enriquecimento com sondas desenhadas para o genoma humano. O sequenciamento de nova geração (NGS) das sequências-alvo foi realizado utilizando a plataforma NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, EUA). Após revisão de literatura, genes de interesse relacionados à DK e desenvolvimento de MIS-C e DK associado à COVID-19 foram selecionados. As variantes encontradas foram analisadas nas principais bases de dados genéticos e classificadas em ‘patogênicas’, ‘provavelmente patogênicas’,

'significado incerto', 'provavelmente benignas', e 'benignas'. **Resultados:** Foram selecionados 25 pacientes com diagnóstico de DK, dos quais 15 (60%) preencheram critérios para DK completo e 10 (40%), para incompleto. Além disso, 8 (32%) pacientes foram classificados como COVID+, pois apresentavam RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 e/ou sorologia (IgM, IgG ou IgA) positiva. Foram encontradas duas mutações, no gene ABCA4 e no gene ABCC6, classificadas como provavelmente patogênicas, em dois pacientes, respectivamente, e 12 variantes de significado incerto (VUS) em 11 pacientes. Nos restantes 14 pacientes não foram encontradas mutações significativas. **Conclusão:** Dessa forma, no presente estudo, realizamos extração de DNA com realização de exoma e posterior análise de genes de interesse de 25 pacientes com diagnóstico de DK. Relatamos também suas características clínicas e laboratoriais. Foram encontradas duas mutações classificadas como provavelmente patogênicas em dois pacientes e 12 VUS em 11 pacientes. Estudos posteriores se fazem necessários para que possamos evidenciar características genéticas próprias da população brasileira que possam influenciar no surgimento da DK.

## **Abstract**

**Background:** Kawasaki disease (KD) is a vasculitis of medium-sized vessels and coronary artery aneurysms are the main complication of the disease. Several studies seek to elucidate the etiology of KD, such that some mutations have already been proven to be related to its development, in addition, it is believed that it is also related to viral infections, especially those that affect the respiratory tract. The significant increase in the incidence of KD after the establishment of the COVID-19 pandemic highlights the importance of this association. **Objectives:** This study aims to perform a genetic analysis of pediatric patients diagnosed with KD after the beginning of the SARS-CoV-2 pandemic. **Methodology:** Patients up to 20 years of age diagnosed with complete or incomplete KD according to the American Heart Association criteria during the COVID-19 pandemic were included in the study. Blood was collected from the patients, followed by DNA extraction and stored at a temperature of -80 °C in the Research Laboratory of the Pediatric Infectious Diseases Discipline at the Federal University of São Paulo. The extracted genomic DNA underwent fragmentation followed by indexing,

capture and enrichment with probes designed for the human genome. Next-generation sequencing (NGS) of target sequences was performed using the NextSeq 550 platform (Illumina, San Diego, CA, USA). After reviewing the literature, genes of interest related to KD and the development of MIS-C and KD associated with COVID-19 were selected. The variants found were analyzed in the main genetic databases and classified as 'pathogenic', 'probably pathogenic', 'uncertain significance', 'probably benign', and 'benign'. **Results:** 25 patients diagnosed with KD were selected, of which 15 (60%) patients met criteria for complete KD and 10 (40%) for incomplete KD. Furthermore, 8 (32%) patients were classified as COVID+, as they had a positive RT-PCR for SARS-CoV-2 and/or positive serology (IgM, IgG or IgA). Two mutations were found, in the ABCA4 gene and the ABCC6 gene, classified as probably pathogenic, in two patients, respectively, and 12 variants of uncertain significance (VUS) in 11 patients. In the remaining 14 patients, no significant mutations were found. **Conclusion:** Therefore, in the present study, we performed DNA extraction with exome analysis and subsequent analysis of genes of interest from 25 patients diagnosed with KD. We also report their clinical and laboratory characteristics. Two mutations classified as probably pathogenic were found in two patients and 12 VUS in 11 patients. Further studies are necessary so that we can highlight genetic characteristics specific to the Brazilian population that may influence the emergence of KD.

## Introdução

Doença de Kawasaki (DK) é uma síndrome febril inflamatória aguda, autolimitada, classificada como vasculite de vasos de médio calibre de acordo com a nomenclatura da Conferência de Chapel Hill <sup>1</sup>. O aneurisma das artérias coronárias é a principal complicação da doença, com morbidade significativa e potencial para óbito <sup>2</sup>.

A DK é caracterizada por febre elevada, de difícil controle, por pelo menos cinco dias de duração. Na prática clínica, os critérios de diagnóstico são utilizados de acordo com Dajani et al 1993 <sup>3</sup>.



Diversos estudos buscam elucidar a etiologia da DK, a hipótese mais provável se trata do envolvimento de um agente infeccioso, que muitas vezes gera infecção assintomática, naqueles pacientes geneticamente predispostos, surgindo então a DK <sup>4</sup>. Tal hipótese é aceita devido às características epidemiológicas da DK, com variação significativa de fenótipo e de frequência de acordo com grupos populacionais e sua sazonalidade <sup>5,6,7,8</sup>. De tal forma que, variações genéticas, como polimorfismo de nucleotídeo único (*Single-Nucleotide Polymorphism - SNP*), têm sido estudadas por diversos autores, e algumas mutações já foram comprovadamente relacionadas com o desenvolvimento da DK <sup>9,10,11,12,13</sup>.

Adicionalmente, acredita-se que a DK esteja relacionada a infecções virais, principalmente aquelas que afetam o trato respiratório. O aumento significativo na incidência de DK após o estabelecimento da pandemia de COVID-19 ressalta a importância dessa associação <sup>14</sup>.

Em virtude da pandemia de COVID-19, houve aumento expressivo na incidência de DK em crianças, que apresentaram quadros mais graves, refletindo em aumento de morbidade e de mortalidade em algumas regiões. É de grande relevância caracterizarmos o perfil genético dos pacientes no nosso meio e avaliarmos os grupos com potencial de maior gravidade de doença, podendo no futuro direcionar melhores opções de diagnóstico e de terapêutica. Portanto, este estudo busca realizar análise genética de pacientes pediátricos diagnosticados com DK após o início de pandemia por SARS-CoV-2, através de extração de DNA, sequenciamento e análise de regiões de interesse do exoma.

## **Metodologia**

### **Casuística**

Foram incluídos no estudo pacientes até 20 anos de idade com diagnóstico de DK completa ou incompleta de acordo com os critérios do *American Heart Association* <sup>3</sup> no período da pandemia da COVID-19. A coleta foi realizada entre março de 2020 e dezembro de 2022, sendo coletados dados clínicos através de análise de prontuário.

Os pacientes foram considerados positivos para COVID-19 quando apresentaram PCR para SARS-CoV-2 positivo e/ou sorologia IgG, IgM ou IgA positivas para SARS-CoV-2. No período do estudo a vacinação para faixa etária pediátrica não tinha sido aprovada. Além disso, analisamos os pacientes de acordo com a definição de caso da OMS para MIS-C<sup>15</sup>.

### **Análise genética**

Foram coletadas amostras de sangue para análise genética. A extração de DNA foi realizada com o Kit Qiagen, segundo as instruções do fabricante Kit QIAmp DNA blood Mini Kit (Qiagen, Alemanha); após extração, amostras foram armazenadas em temperatura de -80 °C no Laboratório de Pesquisas da nossa Instituição.

O DNA genômico já extraído sofreu uma fragmentação seguida de indexação, captura e enriquecimento com sondas desenhadas para o genoma humano com kit de preparo de biblioteca Nextera DNA Flex (Nextera DNA Library Preparation Kit). O sequenciamento de nova geração (NGS) das sequências-alvo foi realizado utilizando a plataforma NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, EUA). A interpretação das variantes foi realizada de acordo com as diretrizes do Guia American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)<sup>16</sup>.

### **Resultados**

Foram selecionados para o estudo 25 pacientes com diagnóstico de DK, dos quais 15 (60%) pacientes preencheram critérios para DK completa e 10 (40%), para incompleto. Além disso, 8 (32%) pacientes foram classificados como COVID+, pois apresentavam RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 e/ou sorologia (IgM, IgG ou IgA) positiva. A mediana de idade desses pacientes foi de 3,0 (de 0,16 a 12 anos), com 14 (56%) pacientes do sexo masculino.

Vinte (80%) pacientes apresentaram boa evolução clínica, porém 5 desenvolveram choque, dos quais 3 necessitaram de intubação orotraqueal. Adicionalmente, 9 (36%) evoluíram com aneurisma coronariano mesmo com a

instituição do tratamento com imunoglobulina endovenosa nos primeiros 10 dias de início da doença e 11 (44%) pacientes preenchem critérios para MIS-C, de acordo com a definição de caso da OMS <sup>15</sup>. Todos os pacientes com linfopenia (20%) e plaquetopenia (24%) também apresentaram MIS-C, enquanto a plaquetose ocorreu em 10 pacientes, sendo presente em 2 pacientes com MIS-C.

O quadro 1 mostra os principais dados laboratoriais e de ecocardiograma apresentados pelos pacientes com DK, de acordo com a presença ou não de COVID-19.

**Quadro 1** - Principais achados laboratoriais e de ecocardiograma dos pacientes de acordo com a presença ou não de COVID.

	<b>N PACIENTES N = 25</b>	<b>COVID +</b>	<b>COVID -</b>	<b>Valor de P</b>	<b>MIS-C</b>
<b>Anemia</b>	23	11	12	0.0641	10
<b>Linfopenia</b>	5	5	0	<b>0.0007</b>	5
<b>Plaquetopenia</b>	6	6	0	<b>0.0002</b>	6
<b>Plaquetose</b>	10	1	9	<b>0.0002</b>	2
<b>Elevação de provas de fase aguda</b>	24	11	13	0.6114	10
<b>Elevação transaminases</b>	15	7	8	0.3691	7
<b>Injúria miocárdica</b>	15/20	9	6	0.1412	11
<b>Alteração coagulograma</b>	8/23	6	2	0.3069	5
<b>Aneurisma de coronária ao ECO</b>	9	4	5	0.8190	6
<b>Achados atípicos ECO</b>	5	4	1	0.2658	5

Descrição: Dados expressos em número absoluto e porcentagem; considerado anemia hemoglobina < 12m/dL, linfopenia contagem de linfócitos < 1000 /mcL (< 1 × 10<sup>9</sup>/L), plaquetopenia plaquetas < 150.000

células/mm<sup>3</sup>, plaquetose > 450.000 células/mm<sup>3</sup>, elevação de provas de fase aguda equivale a PCR > 3 mg/dL e VHS > 25mm/h, elevação das transaminases considerada se TGO > 40 U/L e/ou TGP > 56 U/L e/ou GGT > 73 U/L, injúria miocárdica elevação de troponina e/ou BNP e/ou pró-BNP de acordo com a referência de cada laboratório, alteração coagulograma se TP > 14 segundos, e/ou INR 0,8 a 1,2 e/ou TTPA 24 a 40 segundos. Aneurisma de coronária considerado score z > 2,5; achados atípicos em ECO incluem pericardite, valvulite e fração de ejeção < 60%. Valor de p considerado < 0,05, Teste U de Mann-Whitney.

### Análise de exoma

Foi realizada a extração e análise de exoma dos 25 pacientes incluídos no estudo e selecionadas zonas de interesse para análise de acordo com mutações identificadas em estudos anteriores. Foram encontradas duas mutações, no gene ABCA4 e no gene ABCC6, classificadas como provavelmente patogênicas, nos pacientes P3 e P13, respectivamente. No total, 12 variantes de significado incerto (VUS) foram encontradas em 11 pacientes. Nos 14 pacientes restantes foram encontradas mutações classificadas como benignas, com evidência forte para benignidade ou em favor da benignidade.

O paciente P3 apresentou PCR para SARS-CoV-2 negativo e o paciente P13 apresentou PCR para SARS-CoV-2 negativo e sorologia positiva IgG, não tendo sido vacinado até o momento do estudo.

As mutações encontradas e os resultados relevantes relacionados a essas mutações estão descritos nos quadros 2, 3, 4 e 5.

**Quadro 2** - Mutações encontradas nos pacientes do estudo, contendo o gene no qual ocorreu a mutação, o cromossomo e o gene transcrito.

Identificação	Gene	Cromossomo	Gene transcrito
P9	ABCA4	chr1	ABCA4,NM_000350.3:c.5908C>T,NP_000341.2:p.Leu1970Phe
P13	ABCC6	chr16	ABCC6,NM_001171.6:c.3713A>T,NP_001162.5:p.Asp1238Val
P13	NLRP12	chr19	NLRP12,NM_144687.4:c.2960G>A,NP_653288.1:p.Cys987Tyr
P14	NLRP12	chr19	NLRP12,NM_144687.4:c.3046C>T,NP_653288.1:p.Arg1016Ter
P3	ABCA4	chr1	ABCA4,NM_000350.3:c.1928T>G,NP_000341.2:p.Val643Gly
K10	NLRP12	chr19	NLRP12,NM_144687.4:c.3046C>T,NP_653288.1:p.Arg1016Ter
P5	FREM1	chr9	FREM1,NM_144966.7:c.4651C>G,NP_659403.4:p.Gln1551Glu
P17	C6	chr5	C6,NM_000065.5:c.1843A>T,NP_000056.2:p.Ile615Phe
P17	ABCA4	chr1	ABCA4,NM_000350.3:c.1049G>T,NP_000341.2:p.Gly350Val
P17	TGFBR2	chr3	TGFBR2,NM_001024847.2:c.169+3A>G,
P1	ABCC6	chr16	ABCC6,NM_001171.6:c.3802C>T,NP_001162.5:p.Arg1268Trp
P7	ZFH3	chr16	ZFH3,NM_006885.4:c.10583C>G,NP_008816.3:p.Ser3528Trp
K11	ITPR3	chr6	ITPR3,NM_002224.4:c.613G>A,NP_002215.2:p.Ala205Thr
K12	FCGR2B	chr1	FCGR2B,NM_004001.5:c.761-10C>T,

**Quadro 3** - Mutações encontradas nos pacientes do estudo contendo o gene no qual ocorreu o gene, posição no cromossomo, efeito, tipo de herança, código que foi modificado e proteína resultante da mutação.

Identificação	Gene	Posição	Efeito	Herança	Código modificado	Proteína modificada
P9	ABCA4	94473287	missense variant	HET	c.5908C>T	p.Leu1970Phe
P13	ABCC6	16253361	missense variant	HET	c.3713A>T	p.Asp1238Val
P13	NLRP12	54299251	missense variant	HET	c.2960G>A	p.Cys987Tyr
P14	NLRP12	54299165	stop gained	HET	c.3046C>T	p.Arg1016Ter
P3	ABCA4	94528142	missense variant	HET	c.1928T>G	p.Val643Gly
K10	NLRP12	54299165	stop gained	HET	c.3046C>T	p.Arg1016Ter
P5	FREM1	14775993	missense variant	HET	c.4651C>G	p.Gln1551Glu
P17	C6	41159197	missense variant	HET	c.1843A>T	p.Ile615Phe
P17	ABCA4	94546084	missense variant	HET	c.1049G>T	p.Gly350Val
P17	TGFBR2	30664768	splice donor region variant + intron variant	HET	c.169+3A>G	
P1	ABCC6	16251600	missense variant	HET	c.3802C>T	p.Arg1268Trp
P7	ZFHX3	72821592	missense variant	HET	c.10583C>G	p.Ser3528Trp
K11	ITPR3	33626882	missense variant	HET	c.613G>A	p.Ala205Thr
K12	FCGR2B	162000000	splice polypyrimidine tract variant + intron variant	HET	c.761-10C>T	

'Missense variant': variante não sinônima; 'stop gain': parada de ganho; 'splice donor region variant': variante em sítio montador de gene; 'intron variant': variante intrônica; 'splice polypyrimidine tract variant': variante da região formadora trato de polipirimidina; HET: heterozigótica.

**Quadro 4** - Mutações encontradas nos pacientes do estudo contendo o gene no qual ocorreu a mutação e sua classificação em nível de patogenicidade até o momento atual do conhecimento de acordo com desfechos clínicos.

Identificação	Gene	Patogenicidade	COVID +	MIS-C	Aneurisma de coronária	Disfunção miocárdica
P9	ABCA4	VUS	+	+	-	+
P13	ABCC6	provavelmente patogênica	+	-	-	-
P13	NLRP12	VUS	+	-	-	-
P14	NLRP12	VUS	-	-	-	-
P3	ABCA4	provavelmente patogênica	-	-	+	-
K10	NLRP12	VUS	-	-	-	-
P5	FREM1	VUS	+	+	-	-
P17	C6	VUS	-	-	+	-
P17	ABCA4	VUS	-	-	+	-
P17	TGFBR2	VUS	-	-	+	-
P1	ABCC6	VUS	+	+	+	+
P7	ZFHX3	VUS	-	+	+	-
K11	ITPR3	VUS	+	+	-	-
K12	FCGR2B	VUS	-	-	+	-

Indicado na tabela pelo símbolo '+' presença ou positividade para COVID, critérios diagnósticos de MIS-C, presença de aneurismas de coronárias e diagnóstico clínico ou ecocardiográfico de disfunção miocárdica, adicionalmente indicado com o símbolo '-' pacientes com ausência ou negativos para os itens detalhados acima. VUS: variante de significado incerto.

**Quadro 5** - Mutações encontradas nos pacientes do estudo contendo o gene no qual ocorreu a mutação e sua classificação a nível de patogenicidade até o momento atual do conhecimento.

Identificação	Gene	Patogenicidade	Predição <i>in silico</i>	Predição base populacional	Predição funcional	Efeito na proteína
P9	ABCA4	VUS	patogênica moderada	benigna	patogênica moderada	patogênica moderada
P13	ABCC6	provavelmente patogênica	patogênica moderada	patogênica moderada	sem dados	patogênica moderada
P13	NLRP12	VUS	sem dados	patogênica moderada	sem dados	sem dados
P14	NLRP12	VUS	sem dados	provavelmente benigna	sem dados	patogênica forte
P3	ABCA4	provavelmente patogênica	patogênica forte	sem dados	patogênica moderada	patogênica moderada
K10	NLRP12	VUS	sem dados	sem dados	sem dados	patogênica forte
P5	FREM1	VUS	benigna possível	Patogênica moderada	sem dados	sem dados
P17	C6	VUS	sem dados	patogênica moderada	sem dados	benigna possível
P17	ABCA4	VUS	patogênica possível	patogênica moderada	patogênica possível	sem dados
P17	TGFBR2	VUS	patogênica possível	patogênica moderada	sem dados	sem dados
P1	ABCC6	VUS	patogênica possível	patogênica moderada	sem dados	sem dados
P7	ZFH3	VUS	sem dados	patogênica moderada	sem dados	sem dados
K11	ITPR3	VUS	sem dados	patogênica moderada	patogênica possível	sem dados
K12	FCGR2B	VUS	patogênica possível	patogênica moderada	sem dados	sem dados



De acordo com as principais bases de dados mutações analisadas em predição *in silico*, sua frequência em bases genéticas populacionais e a predição funcional de cada mutação.

## Discussão

A DK apresenta variações em frequência e gravidade de acordo com grupos populacionais, o que reforça a hipótese da susceptibilidade genética no surgimento e gravidade da doença. Além disso, sua variação de acordo com a sazonalidade e a semelhança das manifestações clínicas com doenças infecciosas sugerem a influência de agentes infecciosos na patogenia da DK. Reforçando essa hipótese, após surgimento do vírus SARS-CoV-2 observou-se um aumento considerável de casos de DK em todo o mundo <sup>14</sup>.

Diversos estudos demonstraram variantes possivelmente associadas à DK e, após o surgimento da COVID-19, alguns autores realizaram análise de exoma de pacientes com *DK-like* e MIS-C buscando mutações que pudessem predispor a tais patologias <sup>17, 18</sup>.

Dessa forma, no presente estudo, realizamos extração de DNA com realização de exoma e posterior análise de genes de interesse de 25 pacientes com diagnóstico de DK. Relatamos também suas características clínicas e laboratoriais. Foram encontradas duas mutações classificadas como provavelmente patogênicas em dois pacientes e no total 12 VUS em 10 pacientes.

O paciente P13 apresentou variante provavelmente patogênica no gene *ABCC6* (*ATP-binding cassette sub-family C member 6*) indicando predição *in silico* e efeito na proteína com evidência de patogenicidade moderada nas principais bases de dados e baixa frequência da SNP, que encontramos, na população. Santos-Rebouças et al <sup>18</sup> encontraram variantes raras na família ABC em pacientes com MIS-C, nos genes *ABCC6* e *ABCA4*. No presente estudo, um quinto dos pacientes apresentaram SNP nos genes mencionados acima, sendo duas provavelmente patogênicas e três VUS.

A superfamília ABC forma proteínas de membrana que atuam no transporte de substratos via membrana celular. O gene *ABCC6* faz parte de uma subfamília deste

grupo, estando expresso a nível de RNA mensageiro no fígado, vesícula biliar, rim, bexiga, pâncreas e trato gastrointestinal <sup>19</sup>.

Por outro lado, ABCA4, um membro da família ABC, é predominantemente expresso a nível de RNA mensageiro no cérebro e nos olhos. Em nível da proteína, a maior expressão ocorre nos olhos, rins e bexiga <sup>19</sup>. O gene ABCA4 está entre os 500 genes regulados negativamente pelo SARS-CoV-2 em organismos humanos de GSE154613 (conjuntos de genes relacionados à COVID-19 2021, Enrich<sup>R</sup>). Além disso, a rede global de proteínas humanas interagindo com ACE2 recuperada do banco de dados Human Base COVID-19 (<https://hb.flatironinstitute.org/covid19>) foi agrupada em 10 módulos funcionais, dos quais a proteína ABCC6 está presente na coexpressão módulo 6.

O presente estudo encontrou uma VUS no gene TGFBR2. O paciente P17 apresentou três SNP relevantes para análise. Clinicamente, apresentou aneurismas de coronária, sendo negativo para COVID-19 e não apresentando critérios clínicos para MIS-C. A relação entre variantes no gene TGFBR2 e DK já foi estabelecida por alguns autores <sup>20, 21</sup>. Porém, a variante de nosso paciente, apesar de apresentar predição *in silico* patogênica possível e uma predição em base populacional patogênica moderada, não apresentou dados quanto à predição funcional e efeito na proteína. Por este motivo, esta variante foi classificada como VUS.

O gene TGFBR2 é um supressor tumoral que tem sido relacionado a doenças oncológicas <sup>22</sup>. Sua função envolve bloquear o crescimento celular descontrolado e desempenha um papel na formação da matriz extracelular. Além disso, participa da diferenciação das células musculares estriadas e da remodelação das artérias coronárias. O TGF- $\beta$  pode induzir neoangiogênese, hipertrofia de cardiomiócitos, calcificação e fibrose <sup>23, 24</sup>. Este remodelamento cardiovascular, bem como a ativação do gene TGF- $\beta$  pelas células T, sugerem que o gene TGF- $\beta$  pode estar relacionado à patogênese e à lesão da artéria coronária da DK. Choi et al <sup>20</sup> encontraram SNPs no gene TGFBR2 associados ao desenvolvimento da DK e surgimento de aneurisma de coronária.

Já o paciente P7 apresentou VUS no gene ZFX3 (*Zinc Finger Homeobox 3*), proteína que atua como um fator de transcrição, envolvida na diferenciação miogênica

e neuronal. Estudos de associação genômica ampla (GWAS) identificaram associações entre SNPs nesta região e fibrilação atrial <sup>25, 26</sup>, DK <sup>27</sup> e acidente vascular cerebral cardioembólico <sup>28</sup>. Esta variante apresentou uma predição em base populacional como patogênica moderada, embora não haja descrições dos outros parâmetros de avaliação de patogenicidade.

Outros SNPs já sabidamente associados à DK encontram-se no gene ITPKC (*inositol-triphosphate 3-kinase C*) e suas vias relacionadas <sup>9</sup>. No presente estudo, o paciente K11 apresentou VUS no gene ITPR3 (*Inositol 1,4,5-trifosfato receptor tipo 3*), que faz parte da via do ITPKC, está presente na sinalização de diversas células e tem sido associado ao aumento no risco de lesões coronarianas em pacientes de Taiwan <sup>29</sup>, e japoneses e americanos com DK <sup>9</sup>.

Dessa forma, o presente estudo evidenciou dois SNP provavelmente patogênicos nos genes ABCA4 e ABCC6, anteriormente descritos como relacionados à MIS-C e DK-*like*. Além disso, observamos 12 VUS em 11 pacientes, incluindo ZFHX3, TGFBR2 e o ITPR3. Outros SNPs classificados como VUS ocorreram nos genes NLRP12, FREM1, C6 e também foram relacionadas a COVID-19 e desenvolvimento de DK-*like*, bem como SNPs nos genes TGFBR2, ZFHX3, ITPR3, FCGR2B, anteriormente relacionadas à DK <sup>9, 21, 30</sup>.

O estudo apresenta algumas limitações, como o tamanho da amostra não possibilitando análise estatística, ausência de grupo controle para análise genética devido ao custo elevado para realizar extração e análise do exoma. Outra limitação foi a inexistência de avaliação do perfil genético dos pacientes com DK no período pré pandemia de COVID-19 para comparação. Estudos posteriores se fazem necessários para que possamos evidenciar características genéticas próprias da população brasileira que possam influenciar no surgimento da DK.

Concluindo, no presente estudo, realizamos extração de DNA com realização de exoma e posterior análise de genes de interesse de 25 pacientes com diagnóstico de DK. Relatamos também suas características clínicas e laboratoriais. Foram encontradas duas mutações classificadas como provavelmente patogênicas em dois pacientes e 12 VUS em 11 pacientes. Estudos posteriores se fazem necessários para

que possamos evidenciar características genéticas próprias da população brasileira que possam influenciar no surgimento da DK.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 1–11.
2. Amano S 1980, Hazama F, Kubagawa H, Tasaka K, Haebara H, Hamashima Y. General pathology of Kawasaki disease: on the morphological alterations corresponding to the clinical manifestations. *Acta Pathol Jpn.* 1980; 30:681–694.
3. Dajani AS, Taubert KA, Gerber MA, Shulman ST et al. *Diagnosis and Therapy of Kawasaki Disease in Children*, AHA Scientific Council; Vol 87, No S Maio 1993, Pages 1776-1780.
4. Chang LY, Lu CY, Shao PL, Lee PI, Lin MT, Fan TY, Cheng AL, Lee WL, Hu JJ, Yeh SJ, Chang CC, Chiang BL, Wu MH, Huang LM. Viral infections associated with Kawasaki disease. *Volume 113, Issue 3, March 2014, Pages 148-154.*
5. Lin MC, Lai MS, Jan SL, Fu YC. Epidemiologic features of Kawasaki disease in acute stages in Taiwan, 1997-2010: effect of different case definitions in claims data analysis. *J Chin Med Assoc.* (2015) 78:121–6. 10.1016/j.jcma.2014.03.009.
6. Uehara R, Belay ED. Epidemiology of Kawasaki disease in Asia, Europe, and the United States. *J Epidemiol.* 2012;22(2):79–85.
7. Kim GB, Han JW, Park YW, Song MS, Hong YM, Cha SH, et al.. Epidemiologic features of Kawasaki disease in South Korea: data from nationwide survey, 2009-2011. *Pediatr Infect Dis J.* (2014) 33:24–7. 10.1097/INF.0000000000000010.
8. Makino N, Nakamura Y, Yashiro M, Sano T, Ae R, Kosami K, et al.. Epidemiological observations of Kawasaki disease in Japan, 2013-2014. *Pediatr Int.* (2018) 60:581–7. 10.1111/ped.13544.

9. Onouchi Y, et al. ITPKC functional polymorphism associated with Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery aneurysms. *Nat. Genet.* 2008;40:35–42.
10. Alphonse MP, et al. Inositol-triphosphate 3-kinase C mediates inflammasome activation and treatment response in Kawasaki disease. *J. Immunol.* 2016;197:3481–3489.
11. Onouchi Y, et al. Variations in ORAI1 gene associated with Kawasaki disease. *PLoS One.* 2016;11:e0145486.
12. Shimizu C, et al. Genetic variation in the SLC8A1 calcium signaling pathway is associated with susceptibility to Kawasaki disease and coronary artery abnormalities. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2016;9:559–568.
13. Burgner D, Davila S, Breunis WB et al (2009) A genome-wide association study identifies novel and functionally related susceptibility loci for Kawasaki disease. *PLoS Genet* 5:e1.
14. Verdoni L, Mazza A, Gervasoni A et al. An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. *Lancet* 2020; 395: 1771–1778.
15. WHO. Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents with COVID-19: Scientific brief. 2020 WHO reference number: WHO/2019-nCoV/Sci\_Brief/Multisystem\_Syndrome\_Children/2020.1. <https://www.who.int/publications-detail/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>.
16. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, et al. Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24.

17. Chou J, Platt CD, Habiballah S, Nguyen AA, Elkins M, et al. Taking on COVID-19 Together Study Investigators. Mechanisms underlying genetic susceptibility to multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Sep;148(3):732-738.e1. Epub 2021 Jul 2.
18. Santos-Rebouças CB, Piergiorgio RM, Dos Santos Ferreira C, Seixas Zeitel R, Gerber AL, et al. Host genetic susceptibility underlying SARS-CoV-2-associated Multisystem Inflammatory Syndrome in Brazilian Children. *Mol Med*. 2022 Dec 12;28(1):153. doi: 10.1186/s10020-022-00583-5. PMID: 36510129; PMCID: PMC9742658.
19. The Human Protein Atlas, 2024, <https://www.proteinatlas.org/>
20. Choi YM, Shim KS, Yoon KL, Han MY, Cha SH, Kim SK, Jung JH. Transforming growth factor beta receptor II polymorphisms are associated with Kawasaki disease. *Korean J Pediatr*. 2012 Jan;55(1):18-23. doi: 10.3345/kjp.2012.55.1.18. Epub 2012 Jan 31. PMID: 22359526; PMCID: PMC3282214.
21. Shimizu C, Jain S, Davila S, Hibberd ML, Lin KO, Molkara D, et al. Transforming growth factor-beta signaling pathway in patients with Kawasaki disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:16–25.
22. Numata S, Ueno S, Iga J, Yamauchi K, Hongwei S, Hashimoto R, et al. TGFBR2 gene expression and genetic association with schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2008;42:425–432.
23. Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2007;74:196–206.
24. Clark-Greuel JN, Connolly JM, Sorichillo E, Narula NR, Rapoport HS, Mohler ER, 3rd, et al. Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. *Ann Thorac Surg*. 2007;83:946–953.

25. Benjamin EJ, Rice KM, Arking DE, Pfeufer A, van Noord C, et al. Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nat Genet.* 2009;41(8):879–881.
26. Ellinor PT, Lunetta KL, Albert CM, Glazer NL, et al. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nat Genet.* 2012;44(6):670–675.
27. Burgner D, Davila S, Breunis WB et al (2009) A genome-wide association study identifies novel and functionally related susceptibility loci for Kawasaki disease. *PLoS Genet* 5:e1.
28. Traylor M, Farrall M, Holliday EG, Sudlow C, et al. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2012;11(11):951–962.
29. Kuo HC, et al. ITPKC single nucleotide polymorphism associated with the Kawasaki disease in a Taiwanese population. *PLoS One.* 2011;6:e17370. doi: 10.1371/journal.pone.0017370.
30. Sato S, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with Kawasaki disease in the Japanese. *Int. J. Rheum. Dis.* 2009;12:307–310.

#### Websites de apoio

ClinVar, 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

EnrichR, 2024, <https://maayanlab.cloud/Enrichr/>

Online Mendelian Inheritance in Man—OMIM, 2024, <http://www.omim.org/>

The Human Protein Atlas, 2024, <https://www.proteinatlas.org/>

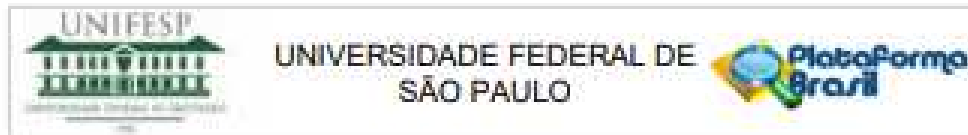
Varsome, 2024, <https://varsome.com/>

Franklin by Genoox, 2024, <https://franklin.genoox.com/>



## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Aprovação da ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOFENOTÍPICA, DO PERFIL DE CITOCINAS E DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ESPECÍFICOS

**Pesquisador:** Maria Isabel de Moraes Pinto

**Área Temática:** Genética Humana

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

**Versão:** 4

**CAAE:** 33575120.7.1001.5505

**Instituição Proponente:** Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.268.877

##### Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP: 0665/2020.

Trata-se de emenda (E2) ao projeto

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1627814\_E2.pdf, de 09/09/2020).

##### BREVE APRESENTAÇÃO DO PROJETO:

**Introdução:** A doença causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2, denominada COVID-19, foi observada inicialmente com graves manifestações clínicas principalmente em indivíduos acima de 60 anos e em portadores de comorbidades. Recentemente foram diagnosticados casos em crianças, que antes se pensava estarem livres das formas com comprometimento clínico importante. Detectaram-se a transmissão vertical da infecção, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica e também a associação de formas de doença de Kawasaki em crianças em associação com o isolamento de SARS-CoV-2. Nesse contexto, é fundamental investigar os aspectos imunológicos associados a essas manifestações na faixa etária pediátrica. **Objetivos:** Descrever as

Endereço: Rua Etelvânia, 740  
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-900  
UF: SP Município: SÃO PAULO  
Telefone: (11)5571-1052 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO



Continuação do Formulário E-02/07

manifestações clínicas, o perfil imunofenotípico de linfócitos e de células mieloides supressoras, o perfil de citocinas e de anticorpos neutralizantes específicos para SARS-CoV-2 em crianças diagnosticadas com doença de Kawasaki durante a pandemia por COVID-19 no Brasil. **Casualística e Métodos:** Trata-se de estudo prospectivo, multicêntrico observacional realizado no Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo em parceria com 13 SERVIÇOS (14 CENTROS AO TOTAL) DE REUMATOLOGIA PEDIÁTRICA BRASILEIROS. SERÃO AVALIADAS 30 CRIANÇAS E ADOLESCENTES DIAGNOSTICADOS COM DOENÇA DE KAWASAKI COMPLETA OU INCOMPLETA NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE SINTOMAS DE INFECÇÃO POR SARS-COV-2 E 10 ADULTOS COM DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR SARS-COV-2. Será realizada coleta de 8 mL de sangue em frasco de EDTA para imunofenotipagem de linfócitos e de células mieloides supressoras através de citometria de fluxo, perfil de citocinas ex vivo por X-MAP e dosagem de anticorpos neutralizantes específicos para SARS-CoV-2 através de soroneutralização por redução de placa (PRNT). De uma fração do sangue coletado serão separadas células mononucleares do sangue periférico para posterior produção de hibridomas e estudo de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2. Decorridos 14 a 21 dias da primeira coleta de sangue será feita nova coleta de 4 mL visando a produção de hibridomas e estudo de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 na fase de convalescença, bem como armazenamento de DNA para avaliação de marcadores genéticos associados a produção de anticorpos neutralizantes. **Análise dos resultados:** Os resultados desta pesquisa fornecerão subsídios que poderão contribuir para o entendimento dos fatores associados a diferentes apresentações e desfechos clínicos e sua associação com a produção de anticorpos neutralizantes.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Avaliar o perfil imunofenotípico de linfócitos e de células mieloides supressoras, bem como perfil de citocinas e de anticorpos neutralizantes específicos de crianças com doença de Kawasaki e adultos infectados por SARS-CoV-2 com quadro moderado/grave da doença.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

sem alteração em decorrência da emenda

Mantidos em relação ao projeto original.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de emenda (E2) ao projeto.

Endereço: Rua Botucatu, 740  
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-860  
UF: SP Município: SÃO PAULO  
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO



Contribuição do Pesquisador: 4.289,877

**Justificativa para a emenda:**

Segunda emenda do projeto com o objetivo de modificar o centro participante da responsável Dra. Simone Appenzeller.

O CNPJ da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP foi substituído pelo CNPJ do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

-Documentos apresentados para a emenda:

1- carta justificativa da emenda (SegundaEmenda\_ProjetoKAW.docx);

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Emenda aprovada

**Considerações Finais e critério do CEP:**

Transição prioritária por solicitação da Conep - SARS-CoV-2/Covid-19

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES_BASICAS_162781_4_E2.pdf	09/09/2020 12:14:08		Aceito
Outros	SegundaEmenda_ProjetoKAW.docx	09/09/2020 12:13:07	Gleice Clemente Souza Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_Kawasaki_COVID_emenda.docx	16/07/2020 22:22:24	Gleice Clemente Souza Silva	Aceito
Outros	Emenda_KAW.docx	16/07/2020 22:21:06	Gleice Clemente Souza Silva	Aceito
Outros	Termo_ambulatorio_Reumato.pdf	03/07/2020 21:38:19	Gleice Clemente Souza Silva	Aceito
Outros	CartaLaboratorio_Atonia.pdf	03/07/2020 21:32:36	Gleice Clemente Souza Silva	Aceito

Endereço: Rua Boicatos, 740  
Bairro: WLA CLEMENTINO CEP: 04.023-900  
UF: SP Município: SÃO PAULO  
Telefone: (11)3571-1002 Fax: (11)3539-7162 E-mail: cep@unifesp.br

Continuação do Parecer 4.200.077

Outros	Carta_MicrobiologiaProMarioJanini.pdf	03/07/2020 21:32:10	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
Outros	Carta_LaboratorioInfectologiaPed.pdf	03/07/2020 21:31:36	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
Outros	carta_doacao_SARS_COV_2_Unifesp.pdf	03/07/2020 21:30:39	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
Outros	carta_etica_final.docx	03/07/2020 21:27:14	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
Outros	ListaEquipeAtualizada.docx	03/07/2020 21:23:49	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
Cronograma	Cronograma.docx	03/07/2020 21:20:58	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_12a18anos.docx	03/07/2020 21:20:43	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_7a11anos.docx	03/07/2020 21:20:29	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_cuidadores.docx	03/07/2020 21:20:16	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adultos.docx	03/07/2020 21:20:01	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
Orçamento	Orçamento.pdf	15/06/2020 15:11:24	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
Solicitação registrada pelo CEP	Cadastro_CEP.pdf	15/06/2020 14:10:32	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto
Folha de Rosto	FolhadeRosto_KawCOVID.pdf	12/06/2020 10:21:07	Gleice Clemente Souza Silva	Acerto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rua Solicada, 740  
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-900  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)5571-1082 Fax: (11)5539-7160 E-mail: cep@unifesp.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO



Contribuição do Pesssoal: R\$ 288.877

SÃO PAULO, 10 de Setembro de 2020

---

Assinado por:  
Miguel Roberto Jorge  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Botucatu, 740  
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-900  
UF: SP Município: SÃO PAULO  
Telefone: (11)5575-1000 Fax: (11)5530-7162 E-mail: [cap@unifesp.br](mailto:cap@unifesp.br)

Página 03 de 03

## **Anexo 2. Termos de Consentimento -Representante legal**

UNIFESP – Hospital São Paulo

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Representante legal**

**Título da pesquisa – DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA.**

**Pesquisador principal** – Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto

**Departamento/Ambulatório** – Departamento de Pediatria/ Laboratório de Infectologia

Essas informações estão sendo fornecidas para a participação voluntária do seu filho(a) neste estudo que visa descrever as manifestações clínicas, e avaliar as células do sistema imunológico e as substâncias que essas células produzem, além dos anticorpos contra o novo coronavírus em crianças diagnosticadas com doença de Kawasaki durante a pandemia por COVID-19 no Brasil. Participarão do estudo 20 crianças e adolescentes diagnosticados com doença de Kawasaki e 10 adultos com diagnóstico de COVID-19 e necessidade de internação.

A doença de Kawasaki é uma doença inflamatória com febre elevada, de difícil controle, por pelo menos cinco dias de duração, podendo estar associada a lesões avermelhadas na pele, alterações em lábios e boca, vermelhidão nos olhos, inchaço doloroso ou vermelhidão em mãos e pés e inchaço de gânglios em região do pescoço. Quando não tratado adequadamente, o paciente evolui com aneurisma (dilatação dos vasos) de artérias coronárias em aproximadamente 30% dos casos.

Entre os meses de fevereiro e abril deste ano (2020), foi observado um aumento significativo de pacientes com o diagnóstico de doença de Kawasaki, coincidindo com o período em que está ocorrendo a pandemia da COVID-19. Não se sabe ainda porque houve esse aumento da doença de Kawasaki, mas acha-se que a relação entre essas duas doenças está no fato do vírus causar hiperinflamação, que está presente nos pacientes com doença de Kawasaki.

Com o objetivo de elucidar a relação da doença de Kawasaki e COVID-19, vamos avaliar as células do sistema imunológico e as substâncias que essas células produzem, além dos anticorpos contra o vírus. na população pediátrica. Esses resultados serão comparados aos de pacientes adultos com quadro moderado/grave desta infecção. Os resultados dessa pesquisa podem ajudar a entender a

infecção pelo novo coronavírus em diferentes faixas etárias. A investigação de marcadores genéticos associados à evolução clínica favorável ou desfavorável pode também ajudar a compreender esta pandemia.

A pesquisa será feita no hospital são paulo, onde serão coletados 8 ml de sangue de veia do braço dos participantes da pesquisa, para os exames laboratoriais. Após 14 a 21 dias da primeira coleta de sangue será feita nova coleta de 4 ml para nova avaliação imunológica e marcadores genéticos. O procedimento de coleta de sangue será realizada por profissional capacitado e não traz riscos para o paciente. Poderá haver algum desconforto durante a coleta ou uma pequena mancha roxa no local de coleta do sangue.

Adicionalmente, será coletado swab de nasofaringe para verificar a presença ou não do vírus sars-cov-2. Para coleta, será introduzido cotonete estéril nas duas narinas, que será armazenado em frasco apropriado e será encaminhado para o laboratório central do hospital são paulo. O procedimento de coleta de swab de nasofaringe não traz riscos para o paciente, porém poderá haver algum desconforto no momento da colocação do cotonete, como ardência em narinas.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum indivíduo. As amostras de sangue serão analisadas no laboratório de pesquisas da disciplina de infectologia pediátrica da universidade federal de são paulo. Uma parte das amostras de cada participante será analisada assim que chegar ao laboratório, outra parte será armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 2 anos (tempo de duração da pesquisa). Após término do estudo todas as amostras serão descartadas em embalagem para material biológico e encaminhadas para incineração.

Adicionalmente, as amostras de secreção nasofaríngea serão encaminhadas para o laboratório central do hospital são paulo e serão processadas conforme a rotina de diagnóstico de sars-cov-2. Após a liberação do resultado, as amostras de secreção nasofaríngea serão descartadas de acordo com as normas do laboratório central.

Os participantes terão o direito de serem atualizados quanto a resultados que forem do conhecimento dos pesquisadores. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Os participantes têm plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem que haja qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Se ocorrer qualquer problema ou dano pessoal durante ou após os procedimentos aos quais os participantes serão submetidos, lhes será garantido o direito a tratamento imediato e gratuito na

instituição, mesmo que ainda não se tenha comprovado que o dano seja decorrente da pesquisa. e se o dano for decorrente da pesquisa, os participantes terão direito a indenização determinada por lei.

### Consentimento do Participante

Acredito ter sido adequadamente informado (a) sobre o estudo **DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA.**

. Eu discuti com a médica Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto, pesquisadora responsável sobre a minha decisão em permitir a participação do meu (minha) filho(a) neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do meu (minha) filho(a) é isenta de despesas.

### Contatos telefônicos:

1. Pesquisadora responsável: Dra. Maria Isabel de M. Pinto (11-993714585 e 5576-4848 ramal 3044) e Dra Maria Teresa Terreri (email: teterreri@terra.com.br)

2. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP – Rua Botucatu, n: 740, Vila Clementino, 04023-062, tel: (011)-5571-1062; (011)-5539-7162. email: cep@unifesp.br.; horário de atendimento telefônico e presencial: segundas, terças, quintas e sextas, das 09:00 às 12:00hs.)

Concordo voluntariamente que meu (minha) filho(a) participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que meu (minha) filho(a) possa ter adquirido.

Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do  
Representante legal

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Assinatura

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária, o consentimento livre e esclarecido para a participação neste estudo. declaro ainda que me comprometo a cumprir todos os termos aqui descritos



\_\_\_\_\_  
Nome por extenso da pessoa que obteve  
o consentimento

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura

### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : .....SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

## **Termos de Consentimento - TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR (12-18 anos)**

UNIFESP – Hospital São Paulo

### **TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR (12-18 anos)**

**Título da pesquisa – DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA.**

**Pesquisador principal** – Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto

**Departamento/Ambulatório** – Departamento de Pediatria/ Laboratório de Infectologia

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa onde vamos estudar pacientes com doença de Kawasaki durante a pandemia do novo coronavírus no Brasil. Participarão do estudo 20 crianças e adolescentes diagnosticados com doença de Kawasaki e 10 adultos com a doença pelo novo coronavírus. Seus pais permitiram que você participasse desse estudo, mas você tem o direito de não participar, caso não queira.

A doença de Kawasaki é uma doença que causa muita inflamação. Os pacientes apresentam febre elevada, de pelo menos cinco dias de duração, podendo estar associada a lesões avermelhadas na pele, alterações em lábios e boca, vermelhidão nos olhos, inchaço doloroso ou vermelhidão em mãos e pés e inchaço de gânglios em região do pescoço. Quando não tratado, o paciente pode evoluir com aneurisma (dilatação dos vasos) das artérias do coração.

Entre os meses de fevereiro e abril deste ano (2020), foi observado um aumento do número de pacientes com o diagnóstico de doença de Kawasaki em alguns países, coincidindo com o período em que está ocorrendo a pandemia da COVID-19. Não se sabe ainda porque houve esse aumento da doença de Kawasaki, mas acha-se que a relação entre essas duas doenças está no fato do vírus causar hiperinflamação, que está presente nos pacientes com doença de Kawasaki.

Com o objetivo de entender a relação da doença de Kawasaki com a doença causada pelo novo coronavírus, vamos avaliar as células do sistema de defesa, as substâncias que essas células produzem e os anticorpos contra o coronavírus nos pacientes com doença de Kawasaki. Esses resultados serão comparados aos de pacientes adultos com quadro moderado/grave da infecção pelo novo coronavírus. Os resultados dessa pesquisa podem ajudar a entender a infecção pelo novo coronavírus em diferentes idades.

A pesquisa será feita no hospital são paulo, onde serão coletados 8 ml (1 colher de sopa) de sangue de veia do braço dos participantes, e para retirar o sangue será necessário uma picada de agulha

no braço. A coleta de sangue não traz riscos para você, você pode sentir uma dor leve durante a retirada do sangue e uma pequena mancha roxa pode aparecer no local da coleta. após 14 a 21 dias da primeira coleta de sangue será feita nova coleta de 4 ml para realização de novos exames

Também será realizada coleta de secreção do nariz, para verificar a presença ou não do coronavírus. para coleta, será colocado um cotonete nas duas narinas. O procedimento de coleta de secreção do nariz não traz riscos para você, porém você pode sentir ardência na hora de colocar o cotonete.

As informações obtidas são sigilosas e serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante. Quando terminarmos a pesquisa informaremos a você e a seus pais o resultado encontrado. Não haverá gastos financeiros para o participante em qualquer fase do estudo. Também não haverá recompensa financeira pela sua participação. Se existir qualquer gasto adicional, este entrará no orçamento da pesquisa.

#### Consentimento do Participante

Acredito ter sido adequadamente informado (a) sobre o estudo **“DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOFENOTÍPICA, DO PERFIL DE CITOCINAS E DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ESPECÍFICOS”**. Eu discuti com a médica Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto, pesquisadora responsável sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas.

Contatos telefônicos:

1. Pesquisadora responsável: Dra. Maria Isabel de M. Pinto (11-993714585 ou 5576-4848 ramal 3044) e Dra Maria Teresa Terreri (email: teterreri@terra.com.br)
2. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP – Rua Botucatu, n: 740, Vila Clementino, 04023-062, tel: (011)-5571-1062; (011)-5539-7162. e-mail: cep@unifesp.br.; horário de atendimento telefônico e presencial: segundas, terças, quintas e sextas, das 09:00 às 12:00hs.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir, sem nenhum problema. Os

pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Nome por extenso do Assinatura  
menor

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária, o consentimento livre e esclarecido para a participação neste estudo. declaro ainda que me comprometo a cumprir todos os termos aqui descritos

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Nome por extenso da pessoa que obteve Assinatura  
o consentimento

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : .....SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

## **Termos de Consentimento -TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR (7-11 anos)**

UNIFESP – Hospital São Paulo

### **TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR (7-11 anos)**

**Título da pesquisa – DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA.**

**Pesquisador principal** – Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto

**Departamento/Ambulatório** – Departamento de Pediatria/ Laboratório de Infectologia

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa onde vamos estudar pacientes com doença de Kawasaki durante a pandemia do novo coronavírus no Brasil. Participarão do estudo 20 crianças e adolescentes diagnosticados com doença de Kawasaki e 10 adultos com a doença causada pelo novo coronavírus que estejam no hospital. Seus pais permitiram que você participe desse estudo, mas você tem o direito de não participar, caso não queira.

A doença de Kawasaki é uma doença que causa muita inflamação. Os pacientes apresentam febre alta por vários dias, podem ter manchas avermelhadas na pele, feridas na boca, vermelhidão nos olhos, inchaço ou vermelhidão em mãos e pés e inchaço de gânglios do pescoço. O paciente pode ter dilatação das artérias do coração, quando não faz o tratamento.

Durante pandemia da COVID-19 deste ano, foi observado um aumento do número de pacientes com o diagnóstico de doença de Kawasaki em alguns países. Não se sabe ainda porque houve esse aumento da doença de Kawasaki, mas acha-se que a relação entre essas duas doenças está no fato do vírus causar muita inflamação, que está presente nos pacientes com doença de Kawasaki.

Estamos realizando esse estudo para entender o porquê estamos observando mais crianças com doença de Kawasaki durante a pandemia. Vamos estudar o sistema de defesa desses pacientes e de pacientes adultos com infecção pelo novo coronavírus. Os resultados dessa pesquisa podem ajudar a entender a infecção pelo novo coronavírus em diferentes idades.

A pesquisa será feita no hospital São Paulo, onde vamos coletar sangue do braço dos participantes para fazer os exames. Vamos retirar 8 ml (1 colher de sopa) de sangue de veia do seu braço, e para retirar o sangue será necessário uma picada de agulha no braço. Isso não vai fazer mal, você pode sentir uma dor leve durante a retirada do sangue e uma pequena mancha roxa pode aparecer no local da coleta. Após 14 a 21 dias da primeira coleta de sangue será feita nova coleta para fazer novos exames.

Também será realizada coleta de secreção do nariz, para verificar a presença ou não do coronavírus. Para coleta, será colocado um cotonete no nariz, dos dois lados. Esse exame não traz risco para você, mas você pode sentir ardência na hora de colocar o cotonete no nariz.

As suas informações ficarão em segredo e irão ser estudadas junto com a dos outros participantes. Quando a pesquisa terminar, falaremos o resultado para você e seus pais. Vocês não terão que pagar por transporte e não terão qualquer outro gasto para a sua participação na pesquisa. Também não receberão dinheiro pela sua participação. Se existir qualquer gasto adicional, este será pago pela pesquisa.

Se você tiver alguma dúvida, pode me perguntar. Gostaríamos de saber se você quer participar deste estudo.

Contatos telefônicos:

1. Pesquisadora responsável: Dra. Maria Isabel de M. Pinto (11-993714585 ou 5576-4848 ramal 3044) e Dra. Maria Teresa Terreri (email: teterreri@terra.com.br)
2. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP – Rua Botucatu, n: 740, Vila Clementino, 04023-062, tel: (011)-5571-1062; (011)-5539-7162. e-mail: cep@unifesp.br.; horário de atendimento telefônico e presencial: segundas, terças, quintas e sextas, das 09:00 às 12:00hs.

#### Consentimento do Participante

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa **“DOENÇA DE KAWASAKI E INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM CRIANÇAS: AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOFENOTÍPICA, DO PERFIL DE CITOCINAS E DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ESPECÍFICOS”**. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir, sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com meus responsáveis. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Nome por extenso do  
menor

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Assinatura

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária, o consentimento livre e esclarecido para a participação neste estudo. declaro ainda que me comprometo a cumprir todos os termos aqui descritos

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso da pessoa que obteve  
o consentimento

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura