

Paolo Ruggero Errante

Departamento de imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil.

*Artigo recebido em janeiro de 2016 e
aprovado em abril de 2016.*

ESTUDO GENÉTICO MENDELIANO E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ALTERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

RESUMO

Descrevemos os achados clínicos e imunológicos de 13 pacientes pediátricos com deficiência na produção de anticorpos, através do estudo do histórico familiar, e consulta de ficha clínica dos pacientes. Foi verificada que a deficiência genética na produção de anticorpos se trata de uma herança autossômica recessiva que levou ao surgimento de infecções crônicas e recorrentes causadas por patógenos oportunistas, afetando predominantemente o trato respiratório superior e inferior, seguido do gastrointestinal e gênito-urinário. O tratamento das infecções foi realizado através de antibioticoterapia e aplicação periódica de imunoglobulinas para uso endovenoso (IVIG). Dessa forma, concluímos que o diagnóstico genético é fundamental para a realização de um diagnóstico clínico preciso, tratamento precoce, aconselhamento genético e rastreamento de futuros novos casos.

Palavras-Chave: Herança autossômica recessiva. Deficiência de anticorpos. imunodeficiência primária. genética Mendeliana. anticorpos.

GENETIC MENDELIAN AND IMMUNOLOGICAL STUDY OF PEDIATRIC PATIENTS WITH ALTERATION IN ANTIBODIES PRODUCTION

ABSTRACT

We describe the clinical and immunological findings of 13 pediatric patients with deficiency in the production of antibodies through the family history of the study, and medical records of patients. It has been verified that genetic deficiency in the production of antibodies is an autosomal recessive inheritance has led to the development of chronic and recurrent infections caused by opportunistic pathogens, predominantly affecting the upper and lower respiratory tract, followed by gastrointestinal and genitourinary. Treatment of infections was conducted by antibiotic therapy and periodic application of immunoglobulin for intravenous administration (IVIG). Thus, we conclude that genetic diagnosis is essential for carrying out an accurate clinical diagnosis, early treatment, genetic counseling and screening of new cases future.

Keywords: Autosomal recessive inheritance. Antibody deficiency. Primary immunodeficiency. Mendelian genetic. Antibodies.

INTRODUÇÃO

As doenças humanas determinadas geneticamente influenciam a resposta imune e a susceptibilidade destes indivíduos a infecções microbianas. Estes distúrbios por definição, são derivados de um dos progenitores, sendo transmitidos pelos gametas através de gerações. Estes distúrbios, denominados mendelianos (doenças causadas por defeitos monogênicos) seguem padrões conhecidos como heranças, responsáveis por 6 a 8% de todas as internações hospitalares pediátricas (PICARD & CASANOVA, 2003; CHONG et al., 2015).

Estas doenças humanas causadas por defeitos genéticos hereditários que afetam o desenvolvimento do sistema imune são denominados imunodeficiências primárias (CONLEY et al., 1999). As imunodeficiências primárias podem afetar a imunidade adquirida (celular ou humoral), ou os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, como as proteínas do Sistema Complemento, células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e células natural killer (NK) (CASANOVA, 2015).

Do ponto de vista clínico, os pacientes com imunodeficiências primárias apresentam maior susceptibilidade a infecções; aqueles com defeitos na produção de anticorpos, componentes do Sistema Complemento ou fagócitos apresentam infecções recorrentes por bactérias piogênicas, ao passo que a deficiência na imunidade celular favorece o surgimento de infecções por bactérias intracelulares, fungos e vírus (RAJE & DINAKAR, 2015).

As alterações no desenvolvimento e função dos linfócitos B resultam em deficiência na produção de anticorpos e maior susceptibilidade a infecções por microrganismos extracelulares (CONLEY et al., 1999). As deficiências de anticorpos são diagnosticadas pela presença de níveis séricos reduzidos de imunoglobulinas, ausência ou número reduzido de linfócitos B na circulação sanguínea e/ou tecidos linfóides (ERRANTE et al., 2015).

Existe uma grande dificuldade na interpretação dos sinais e sintomas clínicos, diagnóstico e confirmação do defeito genético, uma vez que existe uma grande heterogeneidade fenotípica e genotípica associada as imunodeficiências primárias (OCHS & HAGIN, 2014).

Dessa forma, realizamos o estudo de 13 pacientes pediátricos e avaliamos a árvore genealógica de suas famílias, para a determinação do padrão de herança envolvida e prováveis doenças que levaram a uma baixa produção de anticorpos e surgimento de infecções microbianas crônicas e recorrentes.

MATERIAL E MÉTODOS

PACIENTES

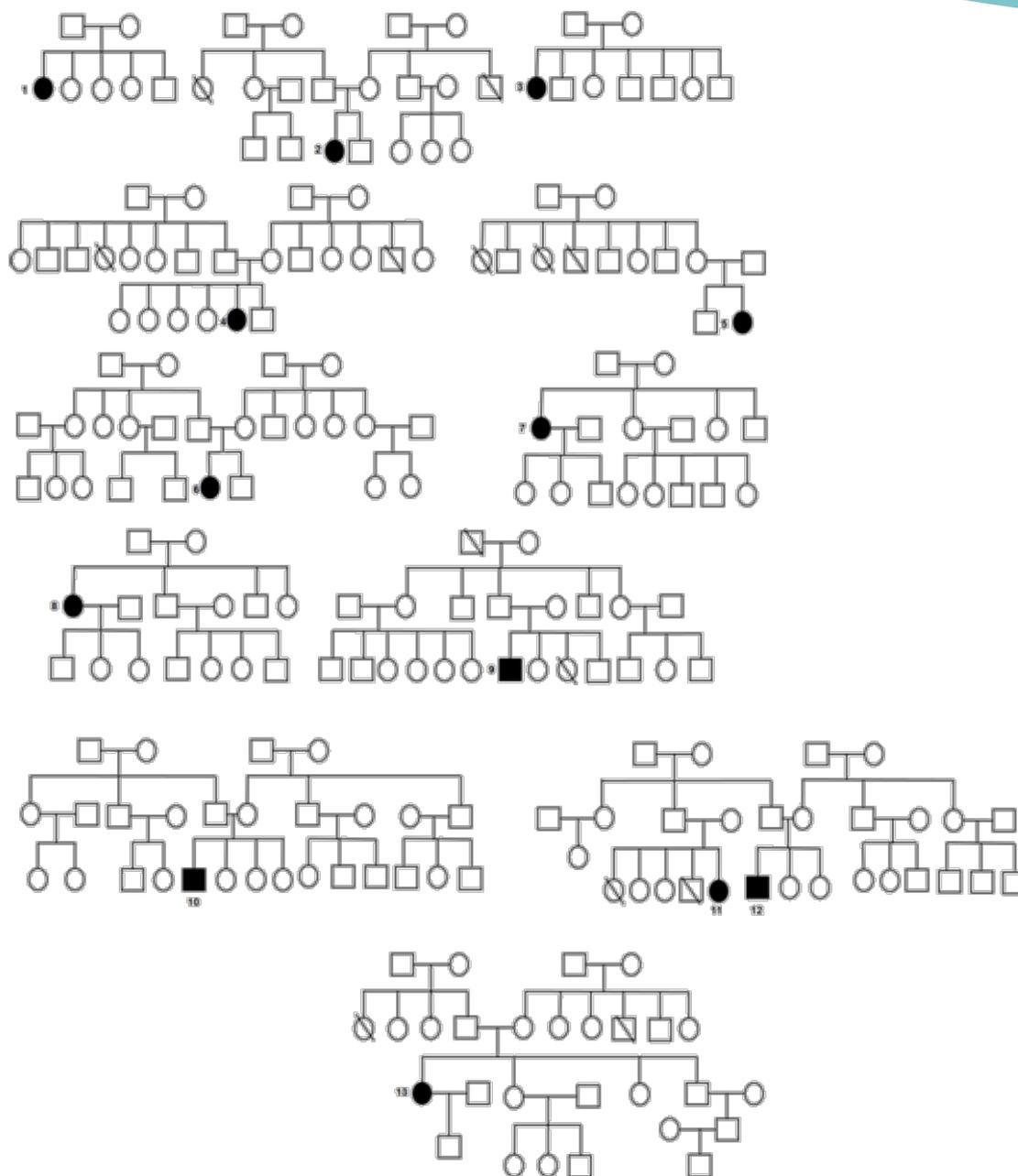
Foram avaliados os prontuários clínicos de 13 pacientes pediátricos oriundos de diferentes famílias com diagnóstico de defeito na produção de anticorpos, baseado no histórico familiar, achados clínicos e imunológicos durante o período de 2010 a 2015. Os pacientes estiveram em acompanhamento na Divisão de Alergia e Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e diagnosticados como portadores de imunodeficiência primária de acordo com critérios estabelecidos pelo Grupo Pan-Americano de imunodeficiências/PAGID, Sociedade Européia para imunodeficiências/ESID (CONLEY et al., 1999) e Grupo Latino-Americano de imunodeficiências/LAGID (LEIVA et al., 2007). Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados e supervisionados pelo comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com as diretrizes propostas pela Conferência Internacional sobre Harmonização de Boas Práticas Clínicas e da Declaração de Helsinque.

RESULTADOS

PEDIGREE DAS FAMÍLIAS

A partir da construção do pedigree das famílias dos pacientes, foi verificado que a imunodeficiência primária causadora da baixa produção de anticorpos corresponde a uma herança autossômica recessiva. Das famílias 2, 4, 5, 9, 11 e 13, pelo menos um membro da família morreu por complicações decorrentes de infecções crônicas de repetição (Figura 1).

Figura 1. Pedigree dos pacientes pediátricos.

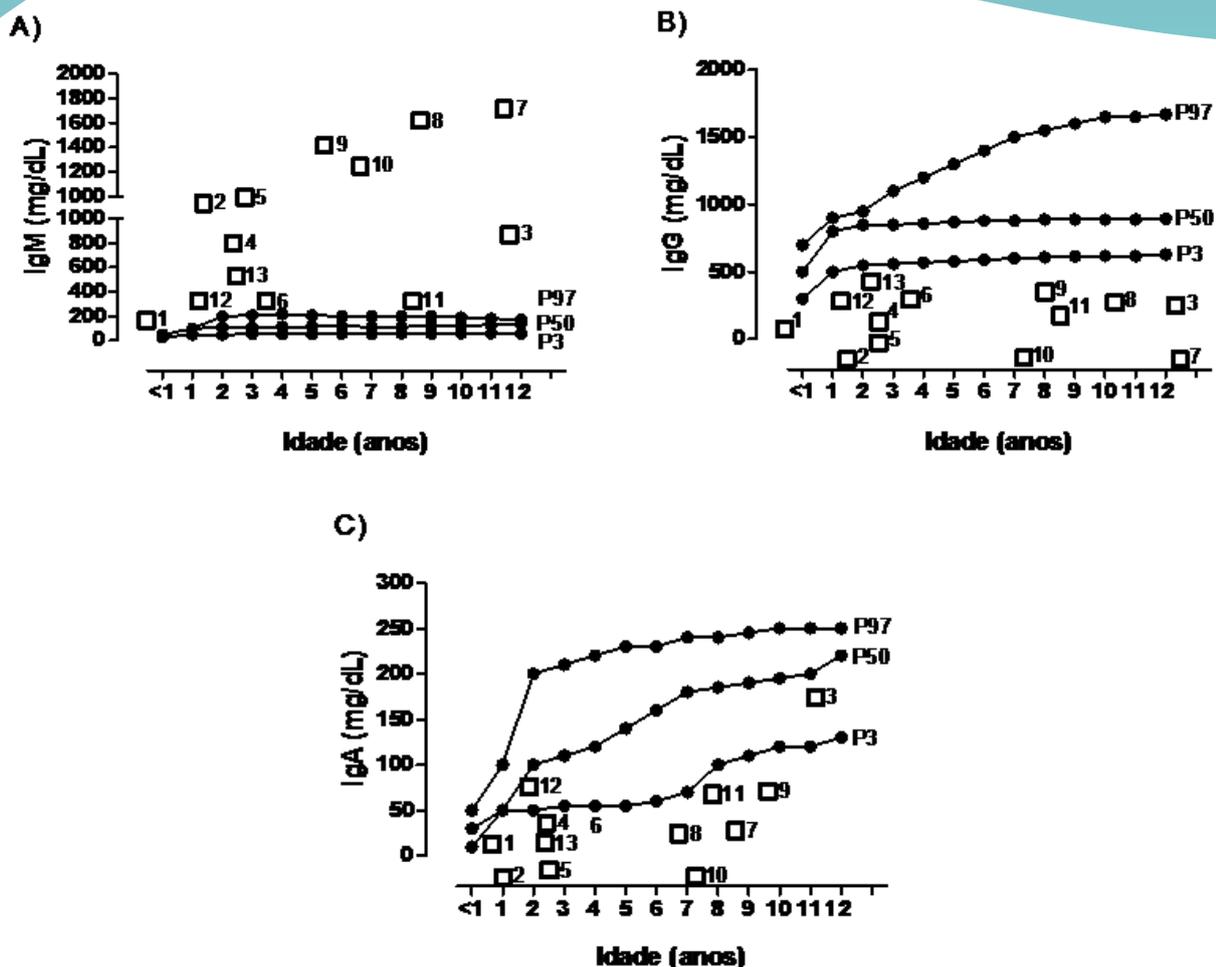


Legenda: Os círculos (sexo feminino) e quadrados (sexo masculino) pintados de negro correspondem aos pacientes acometidos, e os com risco vertical aos parentes falecidos.

NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINAS

De acordo com o percentil 3 (P3), percentil 50 (P50) e percentil 97(P97) (FUGIMURA, 1990), todos os pacientes apresentaram aumento dos níveis séricos de IgM (acima do percentil 97) (Figura 2A). Os 13 pacientes apresentaram baixos níveis séricos de IgG (abaixo do percentil 3) (Figura 2B), e 11 baixos níveis séricos de IgA (abaixo do percentil 3) (Figura 2C).

Figura 2. Valores absolutos de imunoglobulinas séricas nos pacientes pediátricos.



Legenda: Os níveis séricos de imunoglobulinas dos 13 pacientes foram comparados com valores de referência obtidos a partir de indivíduos normais, demonstrados na forma de percentil 3 (P3), percentil 50 (P50) e percentil 97 (P97) (Curvas de referência de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA na população brasileira pediátrica adaptado de Fujimura, 1990).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Foram investigados 11 pacientes do sexo feminino e 3 do sexo masculino. A média de idade para o início das manifestações clínicas foi de 2,7 anos (mínimo 1 mês, máximo 15 anos) (Tabela 1). Todos os pacientes durante o período de estudo desenvolveram pneumonia, seguido de otite (69,23%), diarreia (61,53%), amigdalite, estomatite e sinusite (38,46%). Hiperplasia dos linfonodos (46,15%), tonsilas (23%) e hepatoesplenomegalia (23%) foram observados nestes pacientes em menor proporção (Figura 3). Apenas um paciente apresentou enfermidade autoimune, na forma de trombocitopenia e anemia hemolítica e infecção viral por varicella-zoster (paciente 4). Os principais patógenos isolados dos pacientes em estudo foram *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Após a aplicação de imunoglobulinas para uso endovenoso (IVIG), todos os pacientes apresentaram melhora significativa na redução do tempo e número de infecções.

Figura 3. Porcentagem de infecções observadas nos pacientes pediátricos.

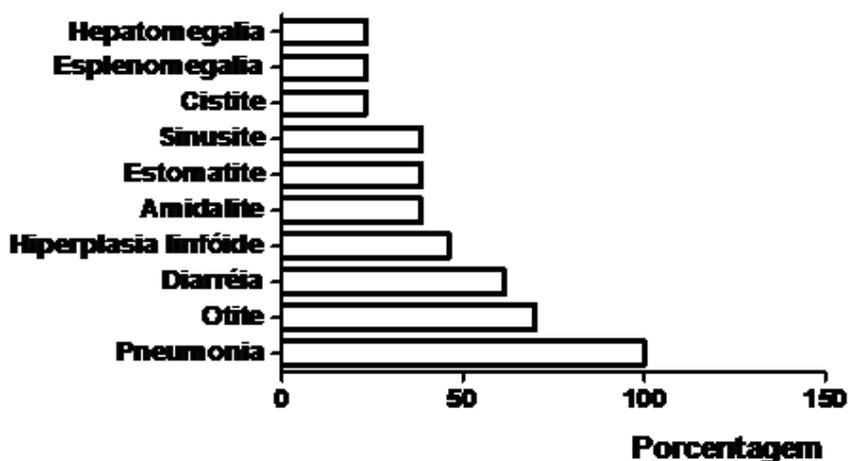


Tabela 1. Características clínicas observadas nos pacientes pediátricos.

Paciente	Sexo	Idade inicial dos sintomas	Infecção do trato respiratório	Infecção do trato urinário	Infecção do trato digestório	Hiperplasia
1	M	6 meses	Pneumonia	-	Estomatite, Diarréia	-
2	F	5 anos	Otite, Pneumonia	Cistite	Estomatite, Diarréia,	-
3	F	10 meses	Amidalite, Otite, Sinusite, Pneumonia	Cistite	Estomatite, Diarréia	Adenóides
4	F	2 meses	Amidalite, Otite, Sinusite, Pneumonia		Estomatite, Diarréia	Tonsilas, Linfonodos, Baço, Fígado
5	F	9 meses	Otite, Sinusite, Pneumonia	Cistite	Diarréia	Tonsilas
6	M	6 meses	Pneumonia	-	Estomatite	Baço, Fígado
7	F	5 anos	Amidalite, Pneumonia	-	Diarréia	-
8	M	1 mês	Amidalite, Otite, Pneumonia	-	-	Tonsilas, Linfonodos
9	M	4 anos	Amidalite, Otite, Pneumonia	-	Diarréia	Linfonodos
10	F	2 meses	Sinusite, Pneumonia	-	-	-
11	F	2 meses	Otite, Pneumonia	-	-	Linfonodos
12	F	2 meses	Otite, Pneumonia	-	Diarréia	Linfonodos
13	F	15 anos	Otite, Sinusite, Pneumonia	-	-	Linfonodos, Baço, Fígado

Legenda: M=masculino; F=feminino.

DISCUSSÃO

Descrevemos o padrão de herança mendeliana nos pacientes em estudo como sendo autossômico recessivo e o diagnóstico clínico da doença como síndrome de hiper IgM, baseado na árvore genealógica dos pacientes e níveis séricos de imunoglobulinas, respectivamente.

Os defeitos monogênicos (mutações) seguem padrões mendelianos conhecidos como heranças, cujas condições que eles produzem são denominados distúrbios mendelianos. Os distúrbios mendelianos, embora sejam raros, constituem 6 a 8% de todas as internações pediátricas (PICARD & CASANOVA, 2003).

Fazem parte desse padrão de herança, a forma autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao cromossomo X (KUMAR, 2008).

Na herança autossômica recessiva, os alelos que compõem um determinado locus gênico são mutantes, e tal herança é caracterizada pelos seguintes aspectos; a enfermidade em geral não acomete os progenitores, mas os irmãos podem apresentar a doença; os irmãos tem 25% de chance de serem acometidos; caso o gene mutante ocorra em uma baixa frequência na população, existe uma forte probabilidade do probando ser o produto de um casamento consanguíneo. Como o indivíduo acometido pode ser um heterozigoto assintomático, inúmeras gerações podem passar antes que os descendentes desta pessoa casem-se com outros heterozigotos e produzam uma prole acometida (TEARE & SANTIBÁÑEZ KOREF, 2014). Em nosso trabalho, estes aspectos foram confirmados através do estudo da árvore genealógica dos pacientes.

As imunodeficiências primárias que levam a deficiência na produção de anticorpos podem ser exemplificadas pelas agamaglobulinemias, hipogamaglobulinemias/defeitos da síntese de isótipos de imunoglobulinas e síndromes de hiper-IgM (CONLEY et al., 1999).

As agamaglobulinemias podem ser ligadas ao cromossomo X, ou serem uma herança autossômica recessiva. Na agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X, a concentração de todos os isótipos de imunoglobulinas se encontram diminuídos (BEHNIAFARD et al., 2012), o que nos possibilitou a exclusão desta doença.

Nas hipogamaglobulinemias/defeitos na troca de isótipos de imunoglobulinas, somente os níveis de IgA se encontram diminuídos (Deficiência seletiva de IgA/IgAD) (MERTIN & THOMSON, 2014); podendo também apenas os níveis de IgG2 estarem reduzidos (Deficiência seletiva de IgG2/IgG2D) (GARG et al., 2012); ou todos os isótipos de imunoglobulinas (IgM, IgG, IgA) se encontram reduzidos (Imunodeficiência comum variável/CVID) (ABBOTT & GELFAND, 2015). Os nossos pacientes em estudo apresentaram apenas redução dos níveis de IgG e IgA, excluindo a possibilidade de IgAD, IgG2D ou CVID.

Nas síndromes de hiper-IgM (HlgM), a principal característica imunológica são níveis elevados de IgM, associado com baixos níveis de IgG e IgA. A HlgM pode ser ligada ao cromossomo X, com mutação no gene que codifica CD40L onde ocorre defeito na ativação dos linfócitos B, macrófagos e células dendríticas, defeito no processo de mutação somática, troca de isótipo de cadeia pesada de imunoglobulina e formação dos centros germinativos, apresentando imunidade celular defeituosa (DAVIES & THRASHER, 2010).

Por se tratar de uma herança ligada ao cromossomo X, a doença é transmitida por portadores heterozigotos do sexo feminino apenas para filhos do sexo masculino. Seu padrão de herança é caracterizado pela transmissão da doença para 50% dos filhos e filhas de uma mulher heterozigota acometida (TEARE & SANTIBÁÑEZ KOREF, 2014).

A HlgM pode ser uma doença autossômica recessiva, com mutações nos genes que codificam CD40 ou NEMO, e o espectro imunológico é igual ao da HlgM ligada ao cromossomo X, onde os pacientes também apresentam comprometimento da imunidade celular (QAMAR & FULEIHAN, 2010).

A HlgM pode ser uma doença autossômica recessiva com apenas defeito na imunidade humoral, onde os pacientes apresentam aumento dos níveis de IgM e diminuição de IgG e IgA, o que leva ao surgimento de infecções por bactérias extracelulares, como verificado em nosso estudo.

Esta HlgM é causada por mutação dos genes que codificam as enzimas desaminase induzida pela ativação (AID) e uracil N-glicosilase (UNG). Como todos os pacientes em nosso estudo apresentaram uma herança mendeliana autossômica recessiva, altos níveis de IgM e baixos níveis de IgG e IgA, consideramos a possibilidade do defeito na produção de anticorpos ser uma síndrome de HlgM causada por mutação nos genes que codificam as enzimas AID e UNG (KARACA et al., 2011).

A AID é uma desaminase de DNA que desamina citosinas em moldes de DNA unifilamentares, convertendo resíduos de citosina (C) em uracil (U). Os transcritos de mudança tendem a formar híbridos DNA-RNA estáveis envolvendo o filamento codificante do DNA, liberando o filamento não-molde, que forma uma alça aberta de

DNA unifilamentar. Neste local ocorre a conversão dos resíduos C da sequência do DNA em resíduos U pela enzima AID (OUADANI et al., 2016).

A seguir, a enzima UNG remove os resíduos U, deixando sítios abásicos, que depois são clivados pela endonuclease Ape I, promovendo a quebra bifilamentar na região $S\mu$ e no locus de mudança envolvido na troca de isotipo de imunoglobulina. O resultado final desse processo é a capacidade dos linfócitos B secretarem não apenas IgM, mas também IgG e IgA (KIMBER et al., 2015).

Defeitos genéticos envolvendo estas duas enzimas levam a baixa produção de IgG e IgA e surgimento de infecções crônicas e recorrentes dos tratos respiratório, digestivo e gênito-urinário (DAVIES & THRASHER, 2010), fato observado nos pacientes em nosso estudo. Verificamos em nosso estudo que os pacientes apresentaram infecções por bactérias extracelulares, confirmando o não comprometimento da imunidade celular.

Concluimos que os pacientes em estudo apresentaram uma herança autossômica recessiva, que associada com altos níveis de IgM e baixos níveis de IgG e IgA, apresentam HlgM causada por mutação nos genes AID e UNG. Portanto, é fundamental o estabelecimento do diagnóstico clínico precoce para a instalação de IVIG, prevenindo complicações decorrentes das infecções, além de ser importante para o aconselhamento genético e rastreamento de futuros novos casos.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, J.K.; GELFAND, E.W. Common Variable Immunodeficiency: Diagnosis, Management, and Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am.* n.35, v.4, p.637-658, 2015.
- BEHNIAFARD, N.; AGHAMOHAMMADI, A.; ABOLHASSANI, H.; et al., Autoimmunity in X-linked agammaglobulinemia: Kawasaki disease and review of the literature. *Expert Rev Clin Immunol.* n.8, v.2, p.155-159, 2012.
- CASANOVA, J.L. Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* n.112, v.51, p.E7118-127, 2015.
- Conley, M.E.; Notarangelo, L.D.; Etzioni, A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol.* n.93, v.3, p.190-197, 1999.
- CHONG, J.X.; BUCKINGHAM, K.J.; JHANGIANI, S.N.; et al., The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet.* n.97, v.2, p.199-215, 2015.
- DAVIES, E.G.; THRASHER, A.J. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *Br J Haematol.* n.149, v.2, p.167-180, 2010.
- ERRANTE, P.R.; PERAZZIO, S.F.; FRAZÃO, J.B.; et al., Primary immunodeficiency association with systemic lupus erythematosus: review of literature and lessons learned by the Rheumatology Division of a tertiary University Hospital at São Paulo. *Rev Bras Reumatol.* 2015 Jul 16. pii: S0482-5004(15)00067-4. doi: 10.1016/j.rbr.2015.03.002. [Epub ahead of print]
- FUJIMURA, M.D. Níveis séricos das subclasses de imunoglobulina G em crianças normais e nefróticas. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1990.
- GARG, V.; LIPKA, S.; RIZVON, K.; et al., Diffuse nodular lymphoid hyperplasia of intestine in selective IgG 2 subclass deficiency, autoimmune thyroiditis, and autoimmune hemolytic anemia: case report and literature review. *J Gastrointest Liver Dis.* n.21, v.4, p.431-434, 2012.
- KARACA, N.E.; DURANDY, A.; GULEZ, N.; et al., Study of patients with Hyper-IgM type IV phenotype who recovered spontaneously during late childhood and review of the literature. *Eur J Pediatr.* n.170, v.8, p.1039-1047, 2011.
- KIMBER, S.T.; BROWN, T.; FOX, K.R. The effect of sequence context on the activity of cytosine DNA glycosylases. *Mol Biosyst.* n.11, v.12, p.3273-3278, 2015.
- KUMAR, D. Disorders of the genome architecture: a review. *Genomic Med.* n.2, v.3-4, p.69-76, 2008.
- LEIVA, L.E.; ZELAZCO, M.; OLEASTRO, M.; ET al., Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol.* n.27, v.1, p.101-108, 2007.

MERTIN, S.; THOMSON, I. What you need to know about IgA deficiency: a case study. *J Am Assoc Nurse Pract.* n.26, v.5, p.268-272, 2014.

OCHS, H.D.; HAGIN, D. Primary immunodeficiency disorders: general classification, new molecular insights, and practical approach to diagnosis and treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol.* n.112, v.6, p.489-495, 2014.

OUADANI, H.; BEN-MUSTAPHA, I.; BEN-ALI, M.; et al., Novel and recurrent AID mutations underlie prevalent autosomal recessive form of HIGM in consanguineous patients. *Immunogenetics.* n.68, v.1, p.19-28, 2016.

PICARD, C.; CASANOVA, J.L. New hereditary immunodeficiencies and genetic predisposition to infective diseases in children. *Arch Pediatr.* n.10 Suppl 4, p.513s-516s, 2003.

QAMAR, N.; FULEIHAN, R.L. The hyper IgM syndromes. *Clin Rev Allergy Immunol.* n.46, v.2, p.120-130, 2014.

RAJE, N.; DINAKAR, C. Overview of Immunodeficiency Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am.* n.35, v.4, p.599-623, 2015.

TEARE, M.D.; SANTIBAÑEZ KOREF, M.F. Linkage analysis and the study of Mendelian disease in the era of whole exome and genome sequencing. *Brief Funct Genomics.* n.13, v.5, p.378-383, 2014.