

Imunodeficiência Combinada Severa por Défice da Proteína RAG2

SÍLVIA SEQUEIRA, MARIA JOÃO LAGE, MARGARIDA ABRANCHES, GLÓRIA BARROCO

Hospital de Dona Estefânia

Resumo

O défice da proteína do gene activador da recombinase resulta numa incapacidade de formação de receptores de antígenos por deficiente recombinação, o que se traduz por uma ausência quase completa de marcadores T e B nas populações linfocitárias com aumento relativo de marcadores NK. Clinicamente esta alteração revela-se como uma Imunodeficiência Combinada Severa de particular gravidade. Sem a realização precoce de um transplante medular de um dador compatível a mortalidade é de 100% aos 2 anos de idade.

Descrevemos um caso de um lactente, filho de pais consanguíneos, internado no nosso hospital, aos 6 meses de vida por síndrome hemolítico-urémico na sequência de pneumonia pneumocócica com derrame. Após terapia intensiva verifica-se recuperação total da função renal mas desnutrição importante. A evolução posterior é caracterizada por infecções recorrentes, escaras cutâneas e agravamento da desnutrição.

Laboratorialmente apresenta leucopénia e linfopénia persistente com valores muito baixos das imunoglobulinas séricas e ausência quase total das populações B. O estudo genético revela a existência de um défice proteico do gene activador da recombinase (RAG) 2. Foi possível a exclusão da mesma patologia num irmão, nascido posteriormente, por análise precoce do sangue do cordão.

Julgamos tratar-se do primeiro caso confirmado desta situação diagnosticada num doente em Portugal.

Palavras-chave: Imunodeficiência primária, Imunodeficiência Combinada Severa, SCID, gene activador da recombinase, RAG

Summary

Severe Combined Immunodeficiency from Deficiency of the RAG 2 protein

The deficiency of the recombinase activating gene results in an inability to form antigen receptors through genetic recombination. This causes a lack of both T and B lymphocytes with a relative increase in NK cells. The clinical presentation is that of a Severe Combined Immunodeficiency with a high mortality. Without a transplant performed within the first months of life with an HLA-identical donor the mortality rate at the age of 2 years is a 100%

We describe an infant, born to related parents, hospitalised at the age of six months with an hemolytic-uremic syndrome post a pneumococcal pneumonia with pleural effusion

After intensive care, he recovered his renal function completely but presented an important malnutrition. Further on, he had recurrent infections, scars and worsening of his malnutrition.

His laboratory evaluation showed leucopenia and persistent lymphopenia with low serum immunoglobulins and almost complete absence of the T and B populations. The genetic study revealed a deficiency of the recombinase activating gene protein (RAG) 2. It permitted, by analysis of the cord blood, the exclusion of the same disorder in a brother born later on.

We believe it is the first proved case of this disorder diagnosed in Portugal.

Key-Words: Immunodeficiency, Severe Combined Immunodeficiency, SCID recombinase activating gene, RAG

Introdução

O sistema imunitário é responsável pela defesa geral do organismo, isto é, pela capacidade de resistência às diferentes lesões externas. As causas mais frequentes de alterações da capacidade imunitária – imunodeficiências – são adquiridas. Incluem a malnutrição, a imunossupressão resultante de infecções víricas como o VIH, sarampo ou citomegalovírus; nos países desenvolvidos - a terapia antineoplásica, o transplante de órgãos e a administração prolongada de corticóides.¹

As imunodeficiências primárias (IDP), consequência de defeito inato do sistema imunitário, têm sido cada vez mais reconhecidas devido aos avanços nos conhecimentos do sistema imunitário e ao progresso nas técnicas imunológicas e genéticas. Podem dividir-se em quatro grupos: defeitos da fagocitose, do complemento, da imunidade humoral e/ou celular.^{1,2,3,4,5}

Há mais de setenta IDP reconhecidas cuja transmissão pode ser autosómica recessiva ou ligada ao cromossoma X.

Caracterizam-se por maior susceptibilidade às infecções. O tipo predominante de infecções, isto é, consoante os tecidos ou agentes mais frequentemente envolvidos, pode sugerir, não só, a presença de uma imunodeficiência como do defeito em causa. As IDP podem estar também associadas a doenças autoimunes ou síndromas vários. Assim os síndromes de Wiskott-Aldrich, Chédiak-Higashi, ataxia telangiectasia, di George, etc. sugerem a presença de uma IDP.^{1,2,3,4,5}

As formas predominantes de IDP resultam de defeitos da imunidade humoral como o défice de IgA e a imunodeficiência comum variável.^{6,7,8}

O Síndrome de Imunodeficiência Combinada Severa (SCID) compreende um grupo heterogéneo de doenças caracterizadas por deficiência grave da imunidade celular e humoral. É caracterizado por um defeito hereditário nas células T, com ou sem diferenciação das células B, resultando em duas formas: ausência de linfócitos T com linfócitos B (formas T-B+) e ausência de linfócitos T e B (forma T-B). Os linfócitos B, quando presentes, são disfuncionais. Aos diferentes genótipos de SCID parecem corresponder alterações linfocitárias distintas e, por vezes, quadros clínicos distintos que procurámos resumir. Inclui várias entidades: deficiências dos receptores da cadeia γ (γ_c) da interleucina-2, da proteína associada à cadeia zeta (ZAP 70), dos antígenos do complexo major de histocompatibilidade (MHCII), janus tirosina quinase-3 (Jak-3), do gene activador da recombinase (RAG) 1 e 2, assim como, outras que resultam em doenças metabólicas como as deficiências da adenosina deaminase cada e da purina-sucleósido fosforilase. (Quadro I)^{2,3,4,5,9}

O gene activador da recombinase (RAG) é responsável pela recombinação, fase de produção dos linfócitos, essencial para gerar a diversidade das ligações antigénicas. A recombinação V(D)J é um processo que conduz ao rearranjo somático de segmentos de Variabilidade, Diversidade e união (Joining em língua inglesa), mecanismo responsável pela diversidade dos receptores dos linfócitos T e por genes que codificam regiões variáveis das imunoglobulinas. A deficiência do RAG manifesta-se como ausência tanto dos linfócitos T como dos B (forma T-B) com aumento relativo dos natural killer (NK).^{2,3,4,10,11,12,13,14,15}

O tratamento das imunodeficiências primárias inclui a

S C I D	T-B+	LINF.T	LINOC. B	CÉLULAS NK	OUTRAS CARACTERÍSTICAS	
		LIGADO AO CROMOS. X	↓↓↓	N↑	↓↓	42% dos SCID
70%	DÉFICE DE JAK-3	↓↓↓	N↑	↓↓	10-20% dos SCID	
		DÉFICE DE RAG 1 E 2	↓↓↓	Ausentes	↑↑%	10-20% dos SCID
		DÉFICE DE ADA	↓↓	↓	N/↓	Alt. ósseas 15 % dos SCID
		DISGENÉSIA RETICULAR	↓↓	↓↓	↓↓	Trombocitopenia Granulocitopenia
30%	DÉFICE DE PNP	↓	N/↓	↓↓	Alt. neurológicas Anemia hemolítica autoimune	
		progressiva	N/↓	↓↓	Alt. neurológicas Anemia hemolítica autoimune	
OUTRAS IDP	SÍNDROME HPER IGM (Ligado X)	Só células IGM e IGD	N	N	Trombocitopenia Neutropenia Anemia hemolítica Alt. GI e hepáticas	
	DÉFICE DE MHC-II	N ↓↓ CD ₄	N	N	Inversão CD ₄ /CD ₈	
COMBINADAS	DÉFICE DE ZAP-70 E DE TAP-2	N ↓↓ CD ₈	N	N	↓ IgG	
	S. DI GEORGE	↓↓ CD ₃ CD ₄ N CD ₈ N	N	N	Hipoplasia timo Cardiopatía Hipocalcémia	
	S. WISKOTT ALDRICH (Ligado X)	↓/N	N	N	Trombocitopenia Eczema ↓ Ig M	
	ATAXIA TELANGIECTASIA	↓↓ CD ₂ ↓↓ CD ₄ CD ₈ N	N	N	Telangiectasias Ataxia ↓↓ IgA e ↓ IgG ₂	

Quadro 1 – Classificação dos SCID e outras IDP Combinadas de acordo com a presença ou não de linfócitos B

T-B+: presença de linfócitos; **T-B-**: com linfócitos B muito diminuídos; **N**: normal **JAK-3** -janus tirosina quinase-3 ; **RAG**: gene activador da recombinase; **ADA**.: adenosina deaminase; **PNP**: purina nucleótido fosforilase; **MHC**: complexo major de histocompatibilidade; **ZAP-70**: proteína associada à cadeia zeta; **TAP**: transportador do péptido antigénico; **N**: normal; ↓: diminuído; ↑: aumentado; % :percentualmente

substituição da proteína deficiente, da linha celular ou do gene anormal ou deficiente. A imunoglobulina por via endovenosa representa uma terapêutica de escolha nos doentes com défice grave de anticorpos. A terapêutica enzimática e a terapia génica têm dado uma valiosa contribuição nos doentes com SCID secundário à deficiência de ADA.^{9,16,17}

Contudo, a pedra chave na terapêutica de muitas imunodeficiências primárias consiste na substituição completa da linha celular deficiente ou anormal, isto é, a realização de um transplante medular.^{3,9,18}

Caso clínico

PAMG, sexo masculino, nascido no Funchal a 10/4/97, é admitido numa enfermaria de primeira infância aos 9 meses de idade, com o diagnóstico de status pós pneumonia pneumocócica associada a síndrome hemolítico urémico.

É o segundo filho de pais jovens e primos em primeiro grau. A irmã de 3 anos é saudável e não há doenças heredofamiliares a registar.

A gravidez foi vigiada, sem intercorrências, tendo nascido por cesariana no Hospital do Funchal, às 41 semanas de gestação, com o índice de Apgar 9 ao 1º minuto e 10 ao 5º minuto. A somatometria ao nascer revela

o peso de 3645g (percentil 50-75), comprimento de 50 cm (percentil 25) e perímetro cefálico de 36,5 cm (percentil 75-90).

Recebe a imunização da BCG ao nascer e duas doses da DTP, VAP e Hibtiter aos 2 e 4 meses de idade.

A evolução ponderal corresponde ao percentil 90 ao mês de vida, percentil 75 aos 3 meses e percentil 50 aos 4 meses.

Não tem qualquer sintomatologia relevante até aos 6 meses de vida altura em que é internado no Centro Hospitalar do Funchal com o diagnóstico de pneumonia pneumocócica associada a derrame pleural. Ao 8º dia de doença é transferido para a Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do Hospital de Dona Estefânia em Lisboa por surgir um quadro de síndrome hemolítico urémico. É submetido a ventilação mecânica, diálise peritoneal, terapêutica com derivados do sangue e antibioterapia múltipla verificando-se recuperação total da função renal mas perda ponderal significativa (2 Kg), dificuldades na alimentação e escaras na região glútea e nas asas do nariz.

Transferido para a nossa enfermaria aos 9 meses de idade, apresenta, nessa altura, bom contacto social, desnutrição marcada, palidez das mucosas e escaras nas regiões referidas. Não tem gânglios palpáveis, a auscultação pulmonar é rude, o fígado palpável a 4,5 cm do rebordo costal na linha médio-clavicular e o baço é palpável a 2,5 cm do rebordo costal.

Apesar de permanecer hemodinamicamente estável, surgem quadros infecciosos sucessivos com localização predominantemente pulmonar: são isolados na expectoração *Pseudomonas aeruginosa*, *Estafilococos aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

A desnutrição marcada e a frequente intolerância oral, assim como, as escaras e a grande friabilidade da pele das asas do nariz que impedem a utilização das sondas nasogástricas, levam à colocação de uma gastrostomia e ainda à utilização de alimentação parentérica, sem que a criança consiga ultrapassar os 5 Kg de peso.

	6 meses	9 meses	14 meses
Eritrocitos	3 760 000	3 930 000	3 230 000
Hemoglobina	9.9 g/dl*	10.9 g/dl	8.7 g/dl
Hematócrito	29%	35.4 %	26.1%
Leucocitos	5270	11 540	1850
Neutrófilos	3392	5493	1290
Linfocitos	875 (16.6%)	1130 (9,8%)	90 (4.7%)
Plaquetas	19 000	364 000	83 000

Quadro 2 – Exames laboratoriais do nosso doente aos 6, 9 e 14 meses de idade demonstrando a extrema linfopenia e seu agravamento.

* = após transfusão

Os exames complementares realizados revelam leucopénia e linfopénia persistentes (numa fase final entre 90 a 700 linfócitos/cm³) e, por vezes, também neutropénia. (Ver quadro 2)

A desnutrição marcada, as infecções recorrentes e a linfopénia sugerem a existência de uma imunodeficiência pelo que são efectuados exames no sentido da sua investigação .

As imunoglobulinas séricas mostram valores muito baixos. Não há alterações do complemento ou da fagocitose. O estudo da população linfocitária demonstra uma ausência quase total de marcadores T e B e aumento relativo das células NK (Quadro 3), situação compatível com o diagnóstico de Imunodeficiência Combinada Severa SCID do tipo T - B -. O défice da adenosina deaminase é

		Valores de Referência ²⁰
Linfocitos T		
CD3/CD8	2 %	12-28 %
CD3/CD4	0 %	31-54 %
Memória	1 %	14-30 %
Linfocito B		
CD19	1 %	15-39 %
Células NK	75 %	3-17 %

Quadro 3 – Citometria de fluxo (versão resumida) do nosso doente. Note-se a significativa redução das células T e B e o aumento relativo das células Natural Killer(NK) indicativo de um SCID por défice da proteína RAG

excluída por determinação enzimática no soro. O estudo genético revela um défice da proteína RAG 2 (recombinase activating gene) por mutação do respectivo gene.

A possibilidade de um transplante medular é afastada quando os estudos de histocompatibilidade mostram uma compatibilidade apenas parcial com os pais e a irmã e quando surge uma infecção respiratória a *Aspergillus fumigatus* com deterioração progressiva da função pulmonar.

Apesar da antibioterapia múltipla, anfotericina E, imunoglobulina, alimentação entérica e parentérica não há melhoria significativa quer da desnutrição quer do estado geral. A linfopénia agrava-se progressivamente.

Aos 14 meses de idade é transferido novamente para o Centro Hospitalar do Funchal onde vem a falecer cerca de um mês depois.

O facto de possuímos o diagnóstico etiológico da situação permite a exclusão precoce do mesmo diagnóstico num irmão nascido 3 meses depois.

Discussão

Indicações absolutas para a investigação de uma imunodeficiência incluem a presença de infecções persistentes ou recorrentes que não respondem à terapêutica habitual e a presença de infecções por agentes oportunistas. Indicações de uma IDP incluem os lactentes com familiares com IDP, a presença de um irmão falecido com suspeita da mesma e lactentes com síndromas habitualmente associadas a imunodeficiências.^{2,4}

A existência de linfopénia num lactente sugere sempre uma ID. A contagem normal dos linfócitos no sangue do cordão geralmente varia entre os 2000 e os 11000/mm³ e, entre os 6-7 meses, altura em que a maioria dos SCID são diagnosticadas, é geralmente superior a 4000. A linfopénia é caracterizada por valores inferiores a estes.^{2,19,20}

A desnutrição grave do nosso doente, após o internamento, poderia, por si só, explicar o aumento da susceptibilidade às infecções nosocomiais as quais, por sua vez, iriam agravar ainda mais essa desnutrição num ciclo que se perpetuaria. Sabe-se efectivamente que a desnutrição representa uma relevante causa de imunodeficiência a nível mundial.⁴

A presença de factores como as infecções recorrentes, a existência de linfopénia, e a extrema desnutrição indicam, no nosso caso, a necessidade de excluir uma possível imunodeficiência.^{1,2,4}

As IDP traduzem-se clinicamente por infecções bacterianas, víricas e fungicas graves surgindo nos primeiros meses de vida. Geralmente as crianças recebem alguma protecção nos primeiros três a seis meses de vida devido às imunoglobulinas adquiridas por via transplacentária e, conseqüentemente, só nessa idade é que surgem as manifestações clínicas de uma IDP.^{1,2,4}

No caso do SCID, IDP de extrema gravidade, estas manifestações podem surgir mais precocemente. Um estudo multicêntrico abrangendo 41 doentes com défice do RAG, recentemente publicado, mostra que, na maioria dos doentes, as manifestações ocorrem antes dos dois meses e, em todos, até aos quatro meses de idade, ao contrário do nosso doente, aparentemente saudável até aos seis meses.²¹

Embora não seja seguro afirmá-lo, é possível que a descida dos percentis de peso, ainda antes dos 6 meses de idade, tivesse alguma relação com a imunodeficiência, uma vez que, a má progressão ponderal e a diarreia são manifestações comuns de IDP.

O predomínio de SCID nos indivíduos do sexo masculino sugeria, até há alguns anos, um defeito genético ligada ao cromossoma X. O facto do nosso doente ser do sexo masculino levou-nos a considerar, como possível, essa forma de transmissão. Os avanços nos conhecimentos genéticos permitiram contudo demonstrar formas transmitidas por herança autosómica recessiva como é a

deficiência do gene RAG. Permitiram, igualmente, estabelecer o defeito molecular nas formas ligada aos cromossoma X relacionando-as com os receptores da cadeia γ da interleucina-2 (IL2RG- γ c) ou outros receptores de outras citocinas, nomeadamente do IL-4, IL-7, IL-9 e IL-19.^{23,4}

A correlação genotípica com o fenotipo linfocitário permitiu demonstrar que os doentes com SCID associado ao cromossoma X, ao contrário do nosso doente, têm linfócitos B presentes na circulação, ainda que estes possam ser disfuncionais. Os doentes com deficiência do gene RAG têm habitualmente ausência quase total dos linfócitos tanto T como B e um aumento relativo das células natural killer. (Ver Quadro 1)^{2,3,4}

Embora o SCID seja um síndrome raro, o seu reconhecimento é importante porque a suspeita diagnóstica atempada pode conduzir a um tratamento eficaz e permitir um aconselhamento genético adequado.

O diagnóstico pré-natal é de facto possível a partir do estudo da população linfocitária em sangue colhido da veia umbilical a partir da vigésima semana de gestação ou, mais precocemente, por estudo das vilosidades coriônicas ou amniócitos.⁴

Por recusa dos pais do nosso doente em efectuar o diagnóstico pré-natal, a deficiência do RAG 2 no irmão é excluída por análise no sangue do cordão logo após o nascimento. Caso a criança fosse afectada, o diagnóstico precoce permitiria uma intervenção atempada reduzindo a gravidade da situação.

Efectivamente, excepto se tratada nos primeiros meses de vida com transplante medular, o SCID conduz à morte, geralmente, antes do ano de idade e, invariavelmente, antes dos dois. Contudo, um transplante efectuado nos primeiros três meses de vida oferece uma possibilidade de sobrevivência superior a 93%.¹⁸

Os estudos da histocompatibilidade no nosso doente e sua irmã revelando que partilhavam apenas um antigénio HLA-DR e o aparecimento de uma infecção pulmonar a *Aspergillus* são factores decisivos para a não realização do transplante medular. De facto, diversos estudos demonstram que tanto o transplante com um dador HLA-não idêntico, isto é, apenas parcialmente compatível, como a presença de uma infecção pulmonar antes do transplante agravam substancialmente a possibilidade de êxito nestes doentes.¹⁸

Lembramos que o diagnóstico de um SCID constitui, pela sua gravidade, uma emergência pediátrica. O nosso objectivo ao publicar este caso é de tentar ajudar a estabelecer o diagnóstico etiológico dos diferentes SCID. Salientamos a importância desse diagnóstico no sentido de um tratamento precoce visando melhorar a morbidade e mortalidade, assim como, permitir um eventual futuro diagnóstico pré-natal.²²

Pensamos também tratar-se do primeiro caso português, comprovado, de défice do gene ativador da recombinase, assim como, o primeiro caso de SCID publicado nesta revista, com etiologia definida.

Sugerimos a colheita de uma amostra de sangue em EDTA para análise posterior do genótipo nos casos de SCID em que prevê uma evolução rápida e fatal.

Agradecimentos:

Endereçamos os nossos agradecimentos à equipa do Prof. Dr. Alain Fisher do Laboratoire d'Immunologie Pédiatrique do Hôpital Necker -Entants Malades, que gratuitamente, nos deu a sua colaboração no diagnóstico deste doente e na exclusão precoce da mesma situação no irmão.

Agradecemos, igualmente, ao Dr. Manuel Abecassis do Instituto Português de Oncologia de Lisboa pela sua pronta disponibilidade em efectuar o transplante medular no nosso doente muito embora, por circunstâncias várias, este não tenha sido possível.

Bibliografia:

1. Stiehm ER. Immunological Disorders in Infants and Children 4th-ed 1996 Philadelphia WB Saunders
2. World Health Organization Scientific Group Primary Immunodeficiency Diseases 1997;109 (suppl 1):1-28
3. Buckley RH Primary Immunodeficiency Diseases In: Allergy - Principles and Practice 1998, 5a ed-; Mosby-Year Book, Inc:713-34
4. Buckley RH, Schiff RI, Markert ML, Williams L W et als. Human Severe Combined Immunodeficiency: genetic, phenotypic and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr* 1997; 130(3):378-86
5. Puck JM Primary immunodeficiency diseases. *JAMA* 1997; 278:1835- 41
6. Flori NM, Llambi JM, Boren TE, Borja SR, Casariego GF. Primary immunodeficiency syndrome in Spain: first report of the national registry in children and adults. *J Clinical Immunology* 1997; 17(4):333-9
7. Baumgart KW, Britton WJ, Kemp A, French M, Robertson D The spectrum of primary immunodeficiency disorders in Australia. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(3): 415-23
8. Spickett GP, Farrant J, North M, Zhang J et als Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunology Today* 1997; 18(7):325-8
9. Smart BA, OCHS HD. The molecular basis and treatment of primary immunodeficiency disorders. *Cur Opin Pediatr* 1997; 9:570-6
10. Sleckman BP, Bassing CH, Hughes MM, Okada A et als Mechanisms that direct ordered assembly of T cell receptor β locus V, D, and J gene segments. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(14):7975-80
11. Schwarz K, Gauss GH, Ludwi L, Pannicke U et als. RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* 1996; 274(5284):97-9
12. Hagmann M. RAGged repair what's new in V(D)J recombination *Biol Chem* 1997; 378(8):815-9
13. Notarangelo LD, Villa A, Schwarz K. RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11(4):435-42
14. Corneo B, Moshous D, Callebaut I, Chasevall R et als Three-dimensional clustering of human RAG 2 gene mutations in severe combined immune deficiency. *J Biol Chem* 2000; 275(17): 12672-5
15. Notarangelo LD, Santagata S, Villa. Recombinase activating gene enzymes of lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 2001; 8(1):41-6
16. Haeney M Intravenous immune globuline in primary immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1994; 97 (Suppls):11-5
17. Candotti F, Bleas RM. Gene therapy of primary immunodeficiencies. *Springer Semin Immunopathol.* 1988; 19:493-508
18. Fischer A. .HLA-identical sibling and haploidentical, T -cell depleted bone marrow transplantation for immunodeficiency. *Immunology Allergy Clin North Ame* 1996; 16(2):361-175
19. Bonilla F A, Oettgen HC Normal ranges for lymphocyte subsets in children. *Pediatr.* 1997; 130 (3):347-9
20. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R et als. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood -Reference values for lymphocyte subpopulations *J Pediatr.* 1997; 130 (3):388-93
21. Villa A, Sobacchi C, Notarangelo LD, Bozzi F et als. V(D)J recombination defects J in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. *Blood.* 2001; 97(1).81-8
22. Rosen FS. Severe combined immunodeficiency. a pediatric emergency. *J Pediatr.* 1997; 130 (3):345-6