

VANESSA DOMINGUES RAMALHO

**MUTAÇÕES NO GENE DA TIROSINA QUINASE DE BRUTON (Btk) DE
PACIENTES BRASILEIROS COM AGAMAGLOBULINEMIA LIGADA
AO X (XLA)**

CAMPINAS

Unicamp

2010

VANESSA DOMINGUES RAMALHO

**MUTAÇÕES NO GENE DA TIROSINA QUINASE DE BRUTON (Btk) DE
PACIENTES BRASILEIROS COM AGAMAGLOBULINEMIA LIGADA
AO X (XLA)**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós -
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Saúde da Criança e do
Adolescente, área de concentração em Saúde da
Criança e do Adolescente.

ORIENTADOR: MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

CAMPINAS

Unicamp

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R141m Ramalho, Vanessa Domingues
Mutações no gene da tirosina quinase de Bruton (Btk) de pacientes brasileiros com agamaglobulinemia ligada ao X (XLA) / Vanessa Domingues Ramalho. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Maria Marluce dos Santos Vilela
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Linfócitos B. 2. Agamaglobulinemia. 3. Análise mutacional de DNA. I. Vilela, Maria Marluce dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Mutations of Bruton's tyrosine kinase gene (BTK) in brazilian patients with X - linked agammaglobulinemia (XLA)

Keywords: • Lymphocytes B
• Agammaglobulinemia
• DNA mutational analysis

Titulação: Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela
Prof^a. Dr^a. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li
Prof^a. Dr^a. Anete Sevciovic Grumach

Data da defesa: 24-02-2010

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Aluno(a) Vanessa Domingues Ramalho

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Marluce dos Santos Vilela

Membros:
Professor (a) Doutor (a) Anete Sevciovic Grumach
Professor (a) Doutor (a) Lilia Freire Rodrigues de Souza Li

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/02/2010

Dedicatória

Aos meus pais, João e Maria.

Meus Mestres na sabedoria de viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela alegria que é viver.

Às minhas santas de devoção, Santa Ana e Santa Terezinha.

Aos meus pais, João e Maria, pelo amor incondicional e por tudo que fazem por mim e por meus sonhos.

Minha irmã, Márcia, que é a alegria feita pessoa e sempre tem um sorriso para me dar.

Meu sobrinho, Vitor, que me faz ver todos os dias a beleza da vida e acreditar no futuro.

Meu marido, Fábio, por todo amor, carinho, dedicação e força mesmo nas horas mais difíceis.

Profa. Dra. Marluce Vilela pela confiança, orientação, incentivo e carinho.

Amigos e amigas do Laboratório de Imunologia Pediátrica pela convivência e amizade.

Edgar por me ensinar as técnicas de biologia molecular, por toda paciência e disponibilidade em ajudar.

Mateo por resolver minhas dúvidas e indicar o caminho a seguir.

Profa. Dra. Lília Li pela disponibilidade em ensinar, e a seus alunos Vinícius e Paula por toda a ajuda.

Prof. Dr. Pérsio pela colaboração no encaminhamento de pacientes.

Milton, Simone, Renan e Tathiane por toda ajuda e paciência.

Enfermeiras do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do HC-Unicamp pelas coletas de sangue.

Silvana, enfermeira do CIPED, pelas coletas de sangue e por seu precioso DNA.

Beatriz Abramczuk e Vanessa Oya por dividirem comigo as alegrias e dificuldades.

Em especial aos pacientes e familiares, meu muito obrigado.

A FAPESP pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa de estudos.

*Sejam quais forem os resultados com êxito ou não,
o importante é que no final cada um possa dizer: 'fiz o que pude'.*

Louis Pasteur

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 - INTRODUÇÃO	17
2 - OBJETIVOS	33
3 - MATERIAL E MÉTODOS	35
4 - RESULTADOS	47
5 - DISCUSSÃO	61
6 - CONCLUSÕES	69
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

BCR	B cell receptor
bp	base pair
Btk	Bruton's tyrosine kinase
cDNA	DNA complementar
dL	decilitro
DNA	ácido desoxirribonucleico
DEPC	diethylpirocarbonato
ESID	European Society for Immunodeficiencies
gDNA	DNA genômico
IDP	Imunodeficiência Primária
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IVIG	intravenous immunoglobulin
Kb	kilobase
LAGID	Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro

mRNA	RNA mensageiro
PAGID	Pan American Group for Immunodeficiency
pb	pares de base
PH	pleckstrin homology domain
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reverse transcriptase – polymerase chain reaction
SH1	Src homology 1
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
SSCP	single strand conformation polymorphism
TH	Tec homology domain
μL	microlitro
μM	micromolar
XLA	X-linked agammaglobulinemia

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Descrição dos primers utilizados nos ensaios de PCR	41
Tabela 2- Descrição dos primers utilizados nos ensaios de RT-PCR	43
Tabela 3- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com XLA	49
Tabela 4- Caracterização das mutações detectadas	53
Tabela 5- Expressão de Btk nos pacientes e mães analisadas	60

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Distribuição das imunodeficiências primárias entre 3.321 pacientes reportados no Registro do LAGID	19
Figura 2- Distribuição das imunodeficiências primárias entre 10.747 pacientes reportados no Registro do ESID.....	20
Figura 3- Número de casos de IDPs, em 1998 e em 2004, notificados por 8 países participantes do LAGID	21
Figura 4- Estágios de desenvolvimento dos linfócitos B	23
Figura 5- Distribuição dos defeitos genéticos em pacientes com doenças hereditárias no desenvolvimento inicial de linfócitos B	24
Figura 6- Estrutura multimodular das quinases citoplasmáticas da família Tec	28
Figura 7- Modelo esquemático de Btk mostrando os diferentes domínios e suas interações moleculares <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	30
Figura 8- Alteração na corrida eletroforética encontrada no éxon 7 do paciente P1	50
Figura 9- Alterações na corrida eletroforética encontradas no éxon 12 dos pacientes P2 e P3	51
Figura 10- Alteração na corrida eletroforética encontrada na região D (éxons de 8 a 14) para a mãe de P5	52
Figura 11- Mutações identificadas na análise de seqüenciamento de P1 na posição c.718C>T e de P4 na posição c.1453G>T	54
Figura 12- Mutação identificada na análise de seqüenciamento de P3 na posição c.1227T>C	55
Figura 13- Gel de agarose mostrando a digestão com enzima de restrição <i>BtsCI</i> dos produtos de PCR do éxon 11/12 do paciente 3 e de controles sadios	55
Figura 14- Mutações identificadas na análise de seqüenciamento de P2 na posição c.1204delT e de P5 na posição c.1135insT	56
Figura 15- Análise de seqüenciamento das mães de P1, P2 e P5 mostrando a presença de alelos em heterozigose para mutação.....	57

Figura 16-	Análise de seqüenciamento da avó de P1 mostrando a presença de alelos em heterozigose para mutação.....	58
Figura 17-	Heredogramas das famílias dos pacientes 1, 2 e 5	59

RESUMO

A agamaglobulinemia ligada ao X (XLA; OMIM#300755) é uma imunodeficiência primária humoral caracterizada por um bloqueio na diferenciação dos linfócitos B na medula óssea, levando à profunda hipogamaglobulinemia e reduzido número ou ausência de células B periféricas. Os pacientes com XLA são susceptíveis a infecções recorrentes por bactérias encapsuladas e enterovírus devido à deficiência de anticorpos. Mutações no gene codificante da tirosina quinase de Bruton (Btk) são responsáveis pela doença. Btk é uma tirosina quinase citoplasmática da família Tec importante no desenvolvimento, na diferenciação e na sinalização dos linfócitos B. A detecção de mutações no gene *btk* possibilita o diagnóstico definitivo de XLA. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar mutações em *btk*. Foram incluídos 6 pacientes conforme os critérios do PAGID e ESID: indivíduos do sexo masculino com menos de 2% de linfócitos B periféricos, hipogamaglobulinemia e história de infecções bacterianas de repetição. A triagem de mutações foi realizada com a técnica de SSCP e possíveis mutações foram confirmadas por sequenciamento. A expressão de Btk nos pacientes e mães foi avaliada em monócitos por citometria de fluxo. Dentre os pacientes analisados as principais manifestações clínicas foram as infecções do trato respiratório. Todos tiveram início dos sintomas durante o primeiro ano de vida, linfócitos B periféricos abaixo de 2% e hipogamaglobulinemia anterior ao início da terapia de reposição de imunoglobulinas. Foram identificadas cinco mutações em *btk*, três novas (p.Ala347fsX55, p.I355T e p.Thr324fsX24) e duas já descritas na literatura (p.Q196X e p.E441X). A detecção das mutações nos pacientes permitiu a análise mutacional de mães, avós e tias maternas. Três mães e uma avó foram confirmadas portadoras de XLA. Em adição, os valores de expressão de Btk obtidos mostraram deficiência da proteína (4,5% a 65,2%) nos pacientes e um padrão bimodal de expressão de Btk foi observado nas mães, indicando o estado de portadora de XLA. Em um dos pacientes não foi identificada mutação, entretanto a expressão de Btk mostrou-se reduzida. O uso combinado da análise genética e da avaliação da expressão de Btk por citometria de fluxo possibilitou o diagnóstico definitivo de XLA e a identificação de portadoras da doença.

Palavras-chave: imunodeficiência primária; XLA; agamaglobulinemia ligada ao X; Btk; tirosina quinase de Bruton; análises mutacionais.

ABSTRACT

X-linked agammaglobulinemia (XLA; OMIM# 300755) is a primary humoral immunodeficiency characterized by a block in early B cell differentiation, leading to profound hypogammaglobulinemia and few or no circulating B cells. Patients with XLA are susceptible to recurrent infections by encapsulated bacteria and enteroviruses due to antibody deficiency. Mutations in the Bruton tyrosine kinase (Btk) gene have been identified as responsible for XLA. Btk is a cytoplasmic tyrosine kinase of the Tec family important in B-lymphocyte development, differentiation, and signaling. Detection of a *btk* mutation allows definitive diagnosis of XLA. The aim of this study was to identify and characterize mutations in *btk*. Six patients were included according to the criteria of PAGID and ESID: males with less than 2% of circulating B cells, hypogammaglobulinemia and a history of recurrent bacterial infections. Mutation screening was performed with SSCP technique and possible mutations were confirmed by sequencing. Expression of Btk protein in patients and mothers was assessed in monocytes by flow cytometry. The major clinical manifestations among patients were respiratory tract infections. All had onset of symptoms during the first year of life, circulating B cells below 2% and hypogammaglobulinemia before the start of immunoglobulin replacement therapy. We identified five mutations in *btk*, three novel (p.Ala347fsX55, p.I355T and p.Thr324fsX24) and two recurrent mutations (p.Q196X and p.E441X). The *btk* mutations detection in patients enabled the screening of mothers, grandmothers and maternal aunts. Three mothers and one grandmother were confirmed XLA carriers. In addition, flow cytometric evaluation of Btk expression in monocytes revealed that Btk deficiency (4,5% a 65,2%) was present in patients and a bimodal pattern of Btk expression was observed in mothers, indicating that they were XLA carriers. In one patient no mutation was identified, but his Btk expression was reduced. The combined use of genetic analysis and flow cytometric assay of Btk protein expression allowed the definitive diagnosis of XLA and its carriers detection.

Keywords: primary immunodeficiency; XLA; X-linked agammaglobulinemia; Btk; Bruton's tyrosine kinase; mutational analysis.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Imunodeficiências Primárias

As imunodeficiências primárias (IDPs) são um conjunto de doenças que resultam de defeitos intrínsecos em genes envolvidos no desenvolvimento e manutenção do sistema imune. Os defeitos genéticos que causam as IDPs podem afetar a expressão e função de proteínas que estão envolvidas em múltiplos processos biológicos como no desenvolvimento imunológico, nas funções de células efectoras, nas cascatas de sinalização e na manutenção da homeostase do sistema imune (Maródi e Notarangelo, 2007).

As IDPs representam um desafio em seu diagnóstico e tratamento, devido à sobreposição de sintomas e similaridades entre as doenças. As infecções são marca das imunodeficiências primárias, sendo fundamental ao diagnóstico considerar as infecções recorrentes ou graves, resistentes à terapia padrão ou causadas por microorganismos oportunistas (Riches, 1992; Antachopoulos *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2008). Outras manifestações incluem doenças autoimunes (Arkwright *et al.*, 2002; Carneiro-Sampaio e Coutinho, 2007) e câncer (Salavoura *et al.*, 2008), linfomas (Tran *et al.*, 2008), granulomatose (Assari, 2006), síndrome hemofagocítica (Janka, 2007; Filipovich, 2008), angioedema (Frank, 2008), e autoinflamação (Stojanov e McDermott, 2005; Brydges e Kastner, 2006; Shinkai *et al.*, 2008).

Já foram reportadas descrições clínicas de mais de 200 IDPs e a identificação de 167 etiologias genéticas (Guzman *et al.*, 2007; Maródi e Notarangelo, 2007; Samarghitean *et al.*, 2007). Atualmente as IDPs são reconhecidas como um problema de saúde pública global, afetando pelo menos 1 em cada 250 indivíduos (Casanova e Abel, 2007).

Desde 1970, um comitê de especialistas em imunodeficiências primárias da União Internacional de Sociedades de Imunologia (IUIS) reuni-se a cada 2 anos com o objetivo de definir e classificar essas doenças. A classificação mais recente é do ano de 2009 e apresenta

as imunodeficiências primárias organizadas em 8 categorias: imunodeficiências combinadas de célula B e T; deficiências predominantemente de anticorpos; síndromes bem definidas de imunodeficiência; doenças da desregulação imunológica; defeitos congênitos do número e/ou função de fagócitos; defeitos na imunidade inata; doenças autoinflamatórias; e deficiências do sistema complemento (IUIS *et al.*, 2009).

A forma mais comum de IDP ao longo do mundo são as deficiências predominantemente de anticorpos. As figuras 1 e 2 mostram a frequência das imunodeficiências primárias na América Latina e Europa.

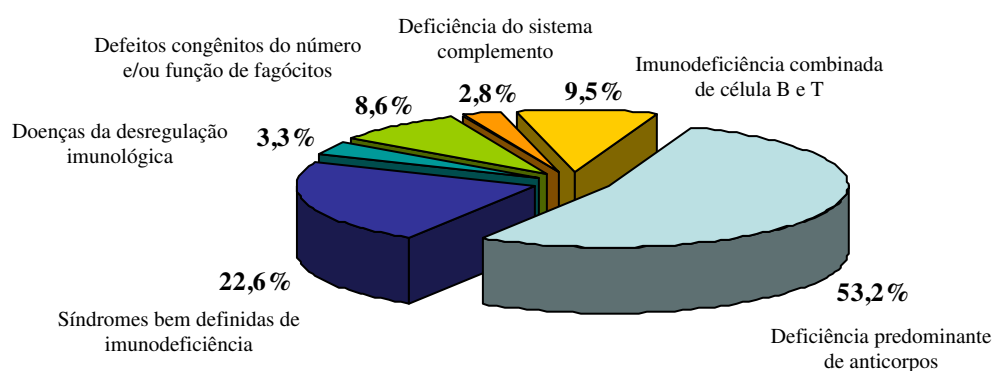


Figura 1- Distribuição das imunodeficiências primárias entre 3.321 pacientes reportados no Registro do LAGID (Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases). Figura modificada de Leiva *et al.*, 2007.

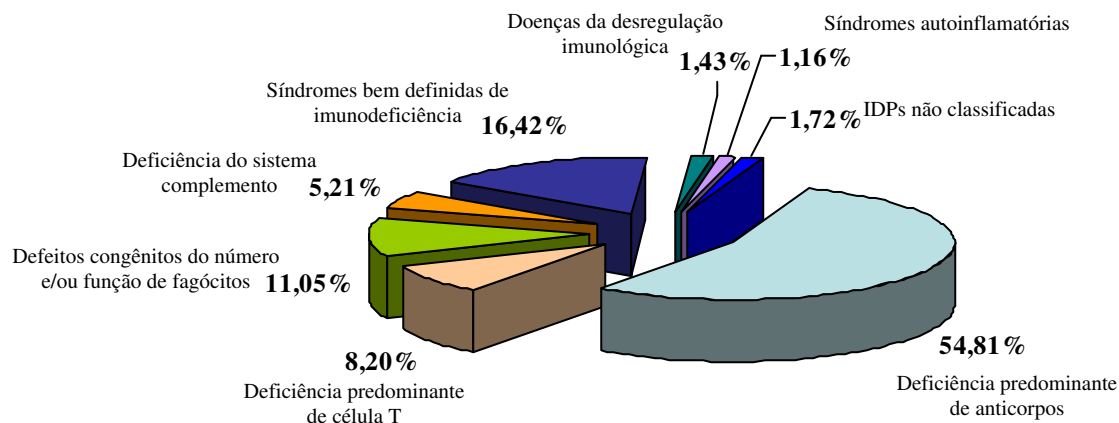


Figura 2- Distribuição das imunodeficiências primárias entre 10.747 pacientes reportados no Registro do ESID (European Society for Immunodeficiencies). Figura modificada de ESID Registry, 2009.

No Brasil, a maior frequência das deficiências predominantemente de anticorpos entre as IDPs também foi observada (Grumach *et al.*, 1997).

O registro das IDPs em diferentes países é importante para o entendimento dessas doenças, visto que possibilita a análise e o intercâmbio de informações detalhadas sobre a incidência das diferentes formas de IDPs, as características dos pacientes, as ferramentas de diagnóstico e as possibilidades de tratamento.

O primeiro relato do número de casos de IDPs registradas na América Latina foi publicado pelo LAGID em 1998, tendo como participantes 8 países: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, México, Paraguai e Uruguai (Zelazko *et al.*, 1998). No segundo relato do LAGID em 2007, todos os países que participaram da primeira publicação reportaram um aumento no número de IDPs registradas variando entre 10 a 80% (Leiva *et al.*, 2007).

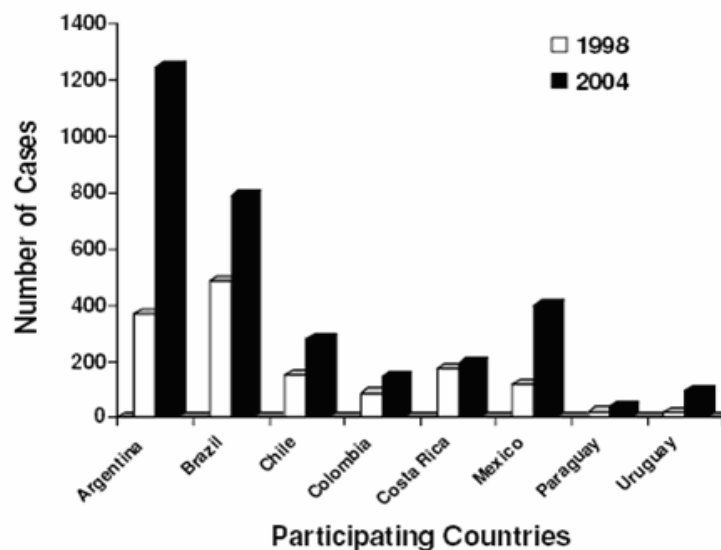


Figura 3- Número de casos de IDPs, em 1998 e em 2004, notificados por 8 países participantes do LAGID. Leiva *et al.*, 2007.

1.2- Imunodeficiências Humorais

As imunodeficiências humorais correspondem a um grupo diversificado de doenças, as quais apresentam em comum uma redução marcante ou ausência de imunoglobulinas séricas.

Os genes anormais que são primariamente responsáveis pelas deficiências de anticorpos podem ser intrínsecos a linhagem de linfócitos B (Tsukada *et al.*, 1993; Yel *et al.*, 1996), codificar moléculas de transdução de sinal de células T (Allen *et al.*, 1993; Grimbacher *et al.*, 2003) ou serem derivados de células mielóides ou células do estroma que possibilitam o microambiente para as células da linhagem B.

A maioria das deficiências de anticorpos está associada com um aumento na susceptibilidade à infecção por bactérias encapsuladas, particularmente *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (Bruton, 1952; Lederman e Winkelstein, 1985;

Hermaszewski e Webster, 1993; Cunningham-Rundles e Bodian, 1999; Oksenhendler *et al.*, 2008).

Bronquites e pneumonias são comuns e, freqüentemente, resultam em doença pulmonar crônica. Nas crianças geralmente se encontram otites recorrentes e nos adultos, sinusites (Conley e Howard, 2002; Howard *et al.*, 2006). Infecções por *Giardia* são comuns em todos os tipos de deficiência de anticorpos (LoGalbo *et al.*, 1982; Levy *et al.*, 1997; Cunningham-Rundles e Bodian, 1999). Outras infecções tendem a ser mais limitadas a um grupo específico de deficiência de anticorpo. Independente do diagnóstico específico, a maioria dos pacientes desse grupo é tratada com reposição de gamaglobulina.

Dentre as deficiências de anticorpos encontram-se as agamaglobulinemias, as quais são causadas por mutações em genes envolvidos no desenvolvimento inicial dos linfócitos B. As agamaglobulinemias podem ser de herança recessiva ligada ao X ou autossômica recessiva e são caracterizadas por infecções bacterianas recorrentes e ausência ou intensa redução de linfócitos B e de todos os isotipos de imunoglobulinas séricas (Cunningham-Rundles e Ponda, 2005; IUIS, 2009).

1.3- Defeitos no desenvolvimento inicial de linfócitos B

Mutações em *btk*, o gene responsável pela agamaglobulinemia ligada ao X (XLA), é a causa de aproximadamente 85% dos defeitos no desenvolvimento inicial de linfócitos B (Conley *et al.*, 1998). Na ausência da proteína Btk, o desenvolvimento de células B é impedido na medula óssea entre os estágios de pré - célula B e célula B imatura, levando a intensa redução do número de linfócitos B maduros (Fig.4).

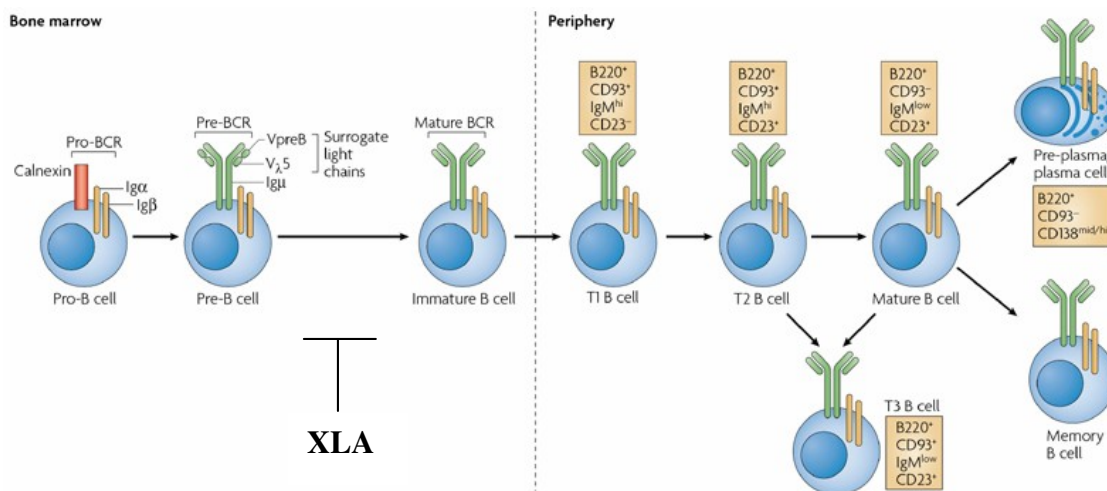


Figura 4- Estágios de desenvolvimento dos linfócitos B. Nos pacientes com XLA, o desenvolvimento dos linfócitos B é interrompido na medula óssea entre os estágios de pré-célula B (*early Pre-B cell*) e célula B imatura (*late Pre-B cell*). Figura modificada de Cambier *et al.* (2007).

Aproximadamente metade dos defeitos restantes é devido à mutações em genes codificadores de componentes do receptor de pré-célula B (pré-BCR) ou BCR, incluindo a cadeia pesada μ (IGHM); as moléculas de transdução de sinal Iga (*CD79A*) e Ig β (*CD79B*); e $\lambda 5$ (*IGLL1*) que forma o substituto de cadeia leve com Vpré-B (Yel *et al.*, 1996; Minegishi *et al.*, 1998; Minegishi *et al.*, 1999a; Schiff *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Dobbs *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2007; van Zelm *et al.*, 2008). Um pequeno número de pacientes com defeitos em BLNK (*B-cell linker protein*), proteína envolvida na transdução de sinal desencadeada pela ativação de BCR, também têm sido descritos (Minegishi *et al.*, 1999b; van Zelm *et al.*, 2008).

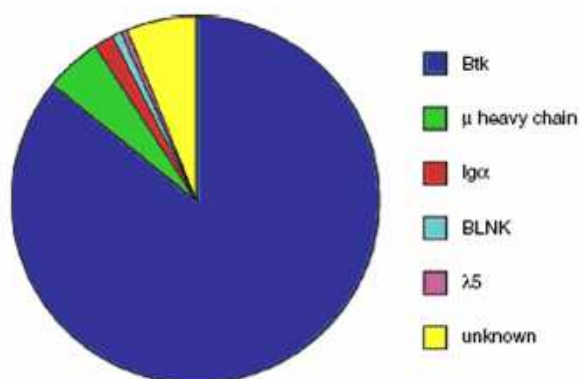


Figura 5- Distribuição dos defeitos genéticos em pacientes com doenças hereditárias no desenvolvimento inicial de linfócitos B. (Conley *et al.*, 2005).

1.4- Agamaglobulinemia Ligada ao X – XLA

Dentre as agamaglobulinemias a forma recessiva ligada ao X (XLA) é a mais freqüente (Conley *et al.*, 2005). A incidência de XLA está estimada em 1/200.000 nascidos vivos (Vihinen *et al.*, 1999). Somente indivíduos do sexo masculino são afetados, embora tenha sido publicado o caso de uma menina com todos os sinais e sintomas da doença (Takada *et al.*, 2004). Esta criança era filha de um homem com diagnóstico de XLA. Nas mulheres portadoras de XLA, a inativação ocorre usualmente no cromossomo X que contém o alelo mutante de *bt*k, entretanto nesta menina foi observada a atividade do cromossomo X de origem paterna em todas as suas linhagens celulares.

Os indivíduos afetados apresentam ausência ou grave redução do número de linfócitos B periféricos e de todos os isotipos de imunoglobulinas. Como consequência, são susceptíveis a infecções por vários tipos de patógenos, incluindo bactérias encapsuladas, enterovírus e *Giardia lamblia*, contra os quais a produção de anticorpos é fundamental (Ochs e Smith, 1996; Plebani *et al.*, 2002). As complicações infecciosas nesses pacientes podem ser prevenidas com

a terapia de reposição de imunoglobulinas, evitando seqüelas duradouras como bronquiectasia, perda auditiva ou cirrose no fígado devido à hepatite crônica (Chun *et al.*, 2008).

A XLA foi uma das primeiras imunodeficiências primárias descritas e é considerada um protótipo de imunodeficiência humoral (Usui *et al.*, 2001). Em 1952, Bruton reportou o caso de um menino de 8 anos de idade com múltiplos episódios de sepse por pneumococos e ausência da fração gama em eletroforese de proteínas do soro (Bruton, 1952). Esta observação foi possível devido ao desenvolvimento da técnica de eletroforese de proteínas do soro, juntamente com a identificação da fração gama como componente dos anticorpos no final de 1930 (Tiselius, 1937; Tiselius e Kabat, 1938), e o uso difundido de antibióticos na década de 40 (Keefer *et al.*, 1943). Outros pacientes foram rapidamente descritos (Janeway *et al.*, 1953; Good, 1954).

Quando a agamaglobulinemia foi vista em crianças, esta ocorria principalmente em meninos e freqüentemente seguia um padrão de herança ligada ao X (Janeway *et al.*, 1953; Good, 1954). Por contraste, em adultos afetados a divisão era igual entre os homens e mulheres e um padrão claro de herança era pouco observado (Grant e Wallace, 1954; Wall e Saslaw, 1955; Citron, 1957; Cooke *et al.*, 1957; Hermans *et al.*, 1976). A doença apresentada por adultos veio a ser conhecida como imunodeficiência comum variável (ICV).

No início da década de 1970, foi demonstrado que pacientes com XLA apresentavam redução marcante no número de células B na circulação periférica, enquanto em pacientes com ICV o número era geralmente normal (Siegal *et al.*, 1971; Cooper e Lawton, 1972; Geha *et al.*, 1973; Preud'Homme *et al.*, 1973). A redução no número de células B periféricas veio a ser explicada por um bloqueio na maturação dos linfócitos B resultante do efeito do gene responsável por XLA, na época ainda não identificado (Campana *et al.*, 1990).

Em 1993, dois grupos reportaram que XLA era resultado de mutações no gene codificador de uma tirosina quinase citoplasmática, a qual denominaram Btk ou tirosina quinase de Bruton (Tsukada *et al.*, 1993; Vetrie *et al.*, 1993). O gene *btk* consiste de 19 éxons e engloba aproximadamente 37.5 kb no cromossomo X humano (Sideras *et al.*, 1994). Atualmente, mais de 800 mutações afetando *btk* já foram reportadas no banco internacional de mutações designado *BTKbase* (<http://bioinf.uta.fi/BTKbase>) (Mohamed *et al.*, 2009). De forma similar a outras doenças genéticas, as mutações incluem missense, nonsense, sítios de splicing e deleções / inserções espalhadas pelo gene inteiro (Vihinen *et al.*, 1994; Vihinen *et al.*, 1997a; Conley *et al.*, 1998; Vihinen *et al.*, 1999; Lindvall *et al.*, 2005; Väliäho *et al.*, 2006; Winkelstein *et al.*, 2006). No entanto, não há descrição até o momento de mutação missense associada à doença no domínio Src homology 3 (SH3). Muitas dessas mutações afetam resíduos conservados funcionalmente significantes e freqüentemente os locais alterados são dinucleotídeos CpG (Ollila *et al.*, 1996; Vihinen *et al.*, 1997b).

Mutações missense (40%) são as mais freqüentes de todas as mutações, enquanto as nonsense correspondem a 17%, deleções 20% e inserções 7%. Mutações envolvendo sítios de splicing somam 16% dos casos. A ocorrência de mutações é proporcional ao comprimento dos domínios. A distribuição dos tipos de mutações é muito semelhante comparada a outras bases de imunodeficiências - IDbases (Piirilä *et al.*, 2006).

As mutações em *btk* têm sido associadas com redução do mRNA, da proteína e da atividade da quinase (Tsukada *et al.*, 1993; Conley *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1996; Gaspar *et al.*, 1998; Lopez-Herrera *et al.*, 2008). No entanto, ainda não é possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo definitiva em XLA (Conley *et al.*, 2005; López-Granados *et al.*, 2005; Teimourian *et al.*, 2008; Basile *et al.*, 2009). Fenótipos discordantes podem surgir da mesma mutação, dando suporte à idéia de que outros fatores genéticos ou epigenéticos podem

influenciar o fenótipo da doença (Bykowsky *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1996; Kornfeld *et al.*, 1996; Kanegane *et al.*, 2000).

Muitos estudos muticêntricos já foram realizados focando a descrição das características clínicas, imunológicas e das mutações nos pacientes com XLA (Kanegane *et al.*, 2001; Plebani *et al.*, 2002; Moin *et al.*, 2004; López-Granados *et al.*, 2005; Winkelstein *et al.*, 2006; Lopez-Herrera *et al.*, 2008; Basile *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Tóth *et al.*, 2009). Entretanto, no Brasil os estudos com esses pacientes são escassos, principalmente em relação à descrição de mutações em *btk* (Tani *et al.*, 2002).

1.5- Tirosina quinase de Bruton - Btk

A tirosina quinase de Bruton é uma quinase citoplasmática que pertence à família das Tec quinases (TFKs) (Smith *et al.*, 2001; Gomez-Rodriguez *et al.*, 2007). A família Tec é a segunda maior família de quinases não receptoras nas células dos mamíferos e inclui Btk, Tec, Itk, Txk (também chamada de Rlk) e Bmx. Todas essas quinases apresentam estrutura multimodular que possibilita a diversidade de interações moleculares e de funções. Com exceção da Txk/Rlk (Debnath *et al.*, 1999), as TFKs apresentam um domínio amino-terminal denominado PH (Pleckstrin Homology) que realiza a translocação da proteína para o lado interno da membrana plasmática. Em todos os membros da família Tec, o domínio amino-terminal é seguido pelos domínios de interação proteína-proteína: Tec Homology (TH), Src Homology 3 (SH3) e SH2. O domínio catalítico ou da quinase, SH1, está localizado na porção carboxi-terminal da molécula.

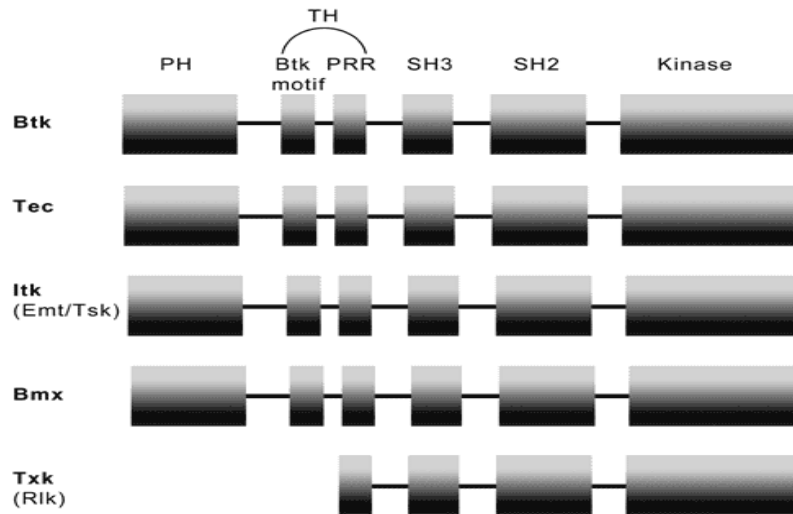


Figura 6- Estrutura multimodular das quinases citoplasmáticas da família Tec. O domínio Tec homology (TH) é dividido em Btk (*Btk motif*) e uma região rica em prolina (PRR; *proline-rich region*). Okoh, 2002.

A maioria das TFKs (Btk, Tec, Itk, Txk) são predominantemente expressas nas células hematopoiéticas, enquanto Bmx é essencialmente restrita às células endoteliais (Hu *et al.*, 1995; Ekman *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2005). Em adição às células hematopoiéticas, a expressão de Tec tem sido detectada em outros tecidos (Mano *et al.*, 1990). Nas células de mamíferos, mais de um membro dessas quinases pode ser expresso em um mesmo tecido ou célula sugerindo a possibilidade de redundância. A expressão de Itk e Btk é muito maior do que de Tec em linfócitos T e B, respectivamente. A função biológica e a sinalização intracelular das quinases da família Tec têm sido descritas em muitos estudos (Lewis *et al.*, 2001; Finkelstein e Schwartzberg, 2004; Schmidt *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005; Felices *et al.*, 2007; Felices e Berg, 2008).

As TFKs estão envolvidas em muitas vias de sinalização provenientes de diversos receptores de membrana celular. Uma resposta celular comum desencadeada pela sinalização

dessas quinases é o remodelamento do citoesqueleto envolvendo a polimerização da actina (Nore *et al.*, 2000).

Btk é crítica para o desenvolvimento, a diferenciação e a sinalização de células B (Vetrie *et al.*, 1993). Além disso, a expressão de Btk é pré-requisito para proliferação de linfócitos B e sobrevivência. Conseqüentemente, linfócitos B deficientes de Btk não atingem o estado de maturação e são presumivelmente condenados à morte prematura. Btk é o único membro das TFKs associado com doença humana. Indivíduos com mutações no gene codificador de Btk possuem reduzido número de linfócitos B circulantes, são incapazes de gerar imunoglobulinas de todas as classes e, portanto, não apresentam resposta imune humoral.

Btk é predominantemente expressa em linfócitos B, mas não em plasmócitos (Smith *et al.*, 1994). A expressão de Btk no desenvolvimento da linhagem de células B é também regulada, com células-tronco hematopoiéticas derivadas da medula, células progenitoras linfóides, células B em desenvolvimento e linhagens mielóides mostrando os mais altos níveis de expressão, enquanto células maduras antes da ativação têm Btk celular reduzido (Nisitani *et al.*, 2000). Além disso, com exceção de linfócitos T, todas as outras linhagens hematopoiéticas expressam Btk.

Nos pacientes XLA a expressão de Btk em monócitos é reduzida, mas as funções dessas células nesta imunodeficiência ainda não foram completamente elucidadas. É reportado que a fagocitose e a quimiotaxia são prejudicadas nos pacientes com XLA, provavelmente devido a defeitos nos mecanismos de transdução citoplasmática (Amoras *et al.*, 2003; Amoras *et al.*, 2007). Também a produção de TNF- α induzida por LPS é reduzida nos monócitos desses pacientes, sendo possível que Btk esteja envolvida na via de sinalização de receptores *toll-like* em monócitos (Horwood *et al.*, 2003; Jefferies *et al.*, 2003).

Cinco diferentes domínios, todos com sua característica própria, formam Btk. A partir da extremidade N-terminal, encontram-se os domínios: Pleckstrin Homology (PH), Tec Homology (TH), Src Homology 3 (SH3), SH2 e SH1, o último também referido como domínio catalítico ou da quinase. A Figura 7 apresenta os diferentes domínios de Btk e suas interações moleculares identificadas *in vitro* e *in vivo*.

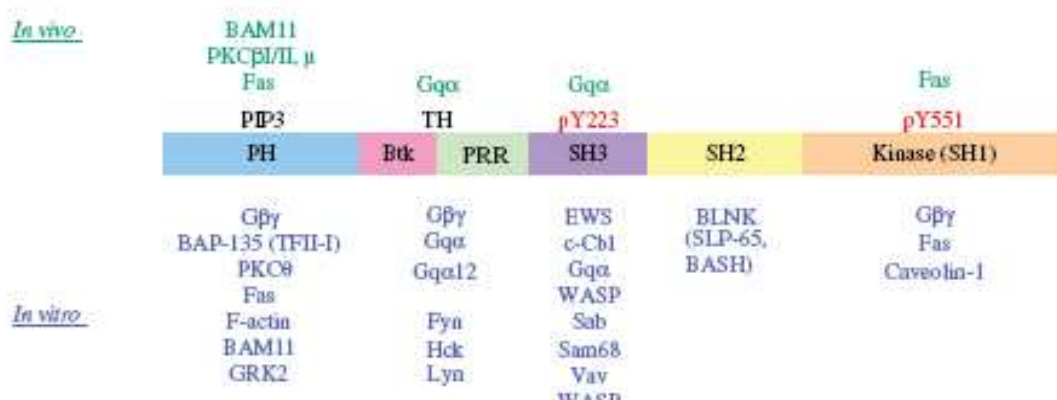


Figura 7- Modelo esquemático de Btk mostrando os diferentes domínios e suas interações moleculares *in vivo* e *in vitro*. O domínio Tec homology (TH) é dividido em Btk (*Btk motif*) e uma região rica em prolina (PRR; *proline-rich region*). PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) liga-se ao domínio PH e ativa Btk. Em vermelho são representados os dois sítios de fosforilação pY223 e pY551. (Lindvall *et al.*, 2005).

As diferentes interações de Btk variam de proteínas citosólicas a fatores de transcrição nuclear, o que possibilita que esta proteína esteja interligada a uma diversidade de funções e seja componente de muitas vias de sinalização, onde a via desencadeada pelo receptor de célula B (BCR) é a mais elucidada. No entanto, o papel preciso de Btk nesta via permanece pouco compreendido (Lindvall *et al.*, 2005).

Após a ligação do antígeno ao BCR, resíduos de tirosina presentes nas caudas citoplasmáticas dos heterodímeros Igα/Igβ são fosforilados por membros da família de quinases Src, criando sítios para tirosinas quinases não-receptoras e proteínas adaptadoras. Em adição, como um resultado da ativação de fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), o nível de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) eleva-se na superfície interna da membrana plasmática, levando a translocação de Btk, pelo domínio PH, para a membrana (Mohamed *et al.*, 1999). A ativação de Btk também pode ocorrer de acordo com a estimulação de uma diversidade de receptores de superfície celular, sendo comum entre as vias a geração de PIP3 (Nore *et al.*, 2000).

O primeiro evento que ocorre na membrana plasmática é a fosforilação de Btk, por membros da família Src, em um resíduo chave de tirosina no *loop* de ativação do domínio da quinase (Y551). Este passo é seguido por um evento de autofosforilação no resíduo Y223 no domínio SH3 (Rawlings *et al.*, 1996). Btk fosforilada recruta a proteína adaptadora BLNK e a fosfolipase C-γ2 (PLC- γ2) para a membrana plasmática, colocando-as em proximidade a Syk onde a fosforilação de ambas as tirosinas ocorre (Rodriguez *et al.*, 2001). A fosforilação e posterior ativação de PLC- γ2 leva a hidrólise de fosfoinositídeo PtdIns(4,5)P2 produzindo Ins(1,4,5)P3 e diacilglicerol (DAG), causando mobilização de cálcio e a ativação da proteína quinase C (PKC), respectivamente (Kurosaki, 1999). As células que apresentam alteração na ativação de Btk perdem a mobilização de cálcio intracelular dependente de BCR (Takata e Kurosaki, 1996). Btk pode ainda se ligar a fosfatidilinositol - 4 - fosfato 5 - quinase na membrana plasmática (PIP5K), contribuindo para um aumento na produção de substratos requeridos para as ativações de PI3K e PLC- γ2 (Saito *et al.*, 2003).

A sinalização de Btk também envolve eventos no citoplasma e no núcleo. A transdução de sinal envolvendo Btk é crítica na ativação do fator nuclear de regulação da transcrição

(NFκB), após engajamento de BCR e estimulação de receptores *toll-like* por LPS (Horwood *et al.*, 2003). Outros fatores de transcrição interagem diretamente com Btk reiterando seu papel na expressão gênica e regulação (Hirano *et al.*, 2004).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Estudo do gene *btk* em pacientes com infecções bacterianas de repetição, ausência ou redução dos isotipos de imunoglobulinas e do número de linfócitos B em sangue periférico.

2.2- Objetivos Específicos

- Identificar e caracterizar possíveis mutações do gene *btk* nos pacientes.
- Descrever as características clínicas e laboratoriais dos pacientes.

3- MATERIAL E MÉTODOS

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, conforme recomendações para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos propostas pela Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo).

3.1- Pacientes do Estudo

Foram avaliados 6 pacientes brasileiros de famílias não relacionadas acompanhados nos serviços do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital das Clínicas da Unicamp e do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Os controles saudáveis foram representados por 50 adultos alunos de pós-graduação do curso de Saúde da Criança e do Adolescente/FCM/Unicamp e funcionários do Centro de Investigação em Pediatria/FCM/Unicamp. Quando possível foram obtidas amostras de sangue das mães dos pacientes, avós e tias maternas.

3.2- Critérios de Inclusão

Os pacientes foram incluídos de acordo com os critérios do Grupo Pan-Americano de Imunodeficiência (PAGID) e Sociedade Européia para Imunodeficiências (ESID) (Conley *et al.*, 1999):

- Meninos com menos de 2% de células CD19⁺ (linfócitos B), início de infecções bacterianas de repetição nos primeiros 5 anos de vida, níveis de IgG, IgA e IgM muito reduzidos e outras causas de hipogamaglobulinemia excluídas.

3.3- Levantamento das características clínicas e laboratoriais

Os prontuários médicos dos pacientes deste estudo foram revisados. As seguintes características clínicas durante o curso da doença foram reportadas: história familiar, idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico, infecções apresentadas. E os dados laboratoriais foram considerados: valores de imunoglobulinas antes do início da terapia de reposição com gamaglobulina intravenosa (IVIG) e a porcentagem de linfócitos B.

3.4- Técnicas utilizadas na triagem de mutações

De acordo com a literatura, aproximadamente 90 a 95% dos indivíduos do sexo masculino com imunodeficiência caracterizada por infecções na infância, hipogamaglobulinemia e linfócitos B menor que 1%, apresentam mutação em *btk*. A maioria dessas mutações pode ser detectada com o uso da técnica de SSCP na triagem de DNA genômico. Já algumas mutações só podem ser identificadas pela análise de cDNA ou Southern blotting (Jin *et al.*, 1995; Conley *et al.*, 1998).

Dessa forma, neste estudo a triagem inicial de mutações em *btk* foi realizada com DNA genômico pela técnica de SSCP. Nos casos onde não foram encontradas mutações, a mesma técnica foi empregada para análise de cDNA.

3.5- Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de sangue periférico utilizando-se de kit de extração comercial (Gentra, Qiagen).

Alíquotas de 3 mL de sangue foram homogeneizadas com 9 mL de solução de lise de hemáceas em tubo de centrifugação de 15 mL, incubadas por 5 em temperatura ambiente (15-25°C) e centrifugadas por 2 minutos a 2.000g. O *pellet* de células foi homogeneizado com 3

mL de solução de lise. A seguir foi adicionado ao tubo 1 mL de solução de precipitação de proteínas. Centrifugou-se por 5 minutos a 2.000g.

O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo de 15 mL contendo 3 mL de isopropanol para a precipitação de DNA. Centrifugou-se por 3 min a 2.000g. O *pellet* resultante foi lavado com 1 mL de solução de etanol 70% e centrifugado por 1 minuto a 2.000g. Descartou-se o sobrenadante e inverteu-se o tubo em papel absorvente limpo para secagem do álcool residual. A seguir, foram adicionados ao *pellet* 250 µL de solução de hidratação de DNA. A amostra foi incubada por 1 hora a 65°C em banho-maria para completa solubilização.

3.6- Determinação do DNA genômico

As amostras de DNA genômico foram quantificadas por espectrofotometria onde as leituras da D₂₆₀ e D₂₈₀ foram obtidas, assim como a razão entre elas D₂₆₀/280.

As amostras usadas nas reações de PCR foram diluídas a 50 ng/µL. Os estoques foram armazenados a -20°C.

3.7- Extração de RNA

Células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através de centrifugação com um gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque 17-1440-02 (Amersham Biosciences, EUA), por 20 minutos a 1800rpm, com posterior lavagem em salina por 10 minutos a 1.200 rpm. Foi ajustada a concentração de células para 5-10x10⁶ cél/mL. Para cada 1mL de células acrescentou-se 1 mL de Trizol[®] (InvitrogenTM). A amostra foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente (15-25°C). Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol[®] usado anteriormente. O microtubo foi agitado manualmente e incubado por 3

minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 1.200g por 15 minutos entre 2-8°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um microtubo limpo. Precipitou-se o RNA da fase aquosa com 0,5mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de Trizol[®] utilizado inicialmente. A amostra foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 1.200g por 10 minutos entre 2-8°C. O sobrenadante foi removido e lavou-se o *pellet* com 1 mL de etanol 75% em água DEPC. Centrifugou-se a 10.000g durante 5 minutos entre 2-8°C. Descartou-se o sobrenadante e inverteu-se o microtubo em papel absorvente limpo para secagem do álcool residual. A seguir, foram adicionados ao *pellet* 20 µL de água DEPC. A amostra foi incubada por 10 minutos a 55-60 °C em banho-maria para completa solubilização.

3.8- Quantificação do RNA

As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria onde as leituras da D₂₆₀ e D₂₈₀ foram obtidas, assim como a razão entre elas D₂₆₀/280. Nas reações de transcriptase reversa (RT) foram utilizados 2 µg de RNA. Os estoques foram armazenados a -80°C.

3.9- Reação em cadeia da polimerase - PCR (*Polymerase chain reaction*)

Os segmentos do gene *btk* foram amplificados a partir de gDNA utilizando-se de um conjunto de pares de primers, franqueadores de cada éxon e da região promotora, baseados na sequência de Vorechovský *et al.* (1995). O ensaio de PCR foi padronizado com gDNA de adulto sadio (controle) para o volume de reação de 25µL contendo 100ng de DNA, 1,0 µL de cada primer, 2,0 µL de dNTPs (InvitrogenTM), 1,5 µL de MgCl₂ e 0,5 µL de *Taq* polimerase (InvitrogenTM) em termociclador (Mastercycler - Eppendorf), sendo a desnaturação inicial realizada por 4 minutos na temperatura de 94°C, a amplificação com 32 ciclos na temperatura

de 94°C por 30 segundos, o anelamento a 57°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 30 segundos. A temperatura ótima de anelamento variou de acordo com cada par de primers (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados para PCR, temperaturas ótimas de anelamento e tamanho dos produtos. O primeiro oligonucleotídeo de cada par é o primer forward.

Segmento amplificado	Sequências dos primers (5'→3')	Ta (°C) ótima	Produto PCR (pb)
Região Promotora	AAATGAAGGGCGGGGACAGTT	57	216
	GACTCGATCGCAGCAGACACT		
Éxon 1	GACTGTCCTTCCTCTCTGGA	57	186
	TTTtaggggtcccaagcaag		
Éxon 2	ATTAATGTCCTGGGTCCTCAG	57	254
	CCTTGGTATCTTGAAACTCAG		
Éxon 3	CCATTTTCTTCCTCATTTCTAC	57	215
	GCATCACCAGTCTATTACAG		
Éxon 4	CATCAACCAATAACCATTTTT	55	145
	ACAGGGGCCTTTCAAGATTT		
Éxon 5	GCTGAAGTCTGTGTTTATCG	55	157
	TCCTTTCCTTCTTTCTTTGGA		
Éxon 6	CTCCTCCATGTCAGATGTGAT	57	225
	AGTGATGGAACAGTCAAAGG		
Éxon 7	CACCTGGCTTCTGTTTTGC	56	112
	AGCACCCAGTTTCCCTGTAT		
Éxon 8	TACCTTTTCTCCTAACTACATA	57	231
	GAAGGGCTGGTGTGGACTCA		
Éxon 9	GGGAGGTGCTGGATGAACTG	57	138
	CCTGGAAGATTGTGGACTGAC		
Éxon 10	ATGACCAGGAGCCACTCAAGC	56	133
	TGCAAGGAGAATGCTGTGTGC		
Éxon 11/12	ACAGCTTCTTTTCGTTGTTTC	57	435
	CTTCTCAGTTGCCCTGGT		
Éxon 13	GAGGCTTTAAGTGAGGATGTGTG	57	180
	CTACCCAGAGAAATAAGGAGTT		
Éxon 14	CCCAAAGAATCACACCAAGACT	57	241
	CAAATAGATTGAGAGTTGAGTTT		
Éxon 15	TCCTCCCCAGCCCCTTTAT	57	314
	TCCTAGGCCAATCCTTCTAAG		
Éxon 16	GTCTTACTGGTCTCTGTTTGC	55	117
	GAAAGATGAAAAAGCCACAC		
Éxon 17	CAAGCCTCCAAATCCTAATG	57	269
	AGAATGAAGCAAGAACAATA		
Éxon 18	GACCCCTGCTATCCAAAAAGAC	56	263
	CAAGTAGATTCAAGGAAATAAT		
Éxon 19	CTTTACTTTTCTTTGGTTTT	55	173
	AGCTTGGGATTCCTCTGAGA		

Tabela modificada de Vorechovský *et al.* (1995).

A fim de se verificar o tamanho e a qualidade dos produtos de PCR, ao final de cada reação uma alíquota de 5 µL da amostra acrescida de 1 µL de corante Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) foi submetida à corrida eletroforética em gel de agarose 2% (LGC Biotecnologia) juntamente com padrão molecular de fragmentos de DNA de tamanho conhecido (100 bp DNA Ladder - LGC Biotecnologia).

3.10- Reação de Transcriptase Reversa – RT- PCR

A reação de RT foi realizada em um volume de 20 µL contendo 2 µg de RNA, 2 µL de dNTPs (InvitrogenTM), 2 µL de random primers (InvitrogenTM), 1 µL de enzima transcriptase reversa (SuperScript III, InvitrogenTM), 1 µL de DTT , 4 µL de 5x First Strand Buffer e água DEPC (diethylpirocarbonato). O gene *btb* foi amplificado do cDNA utilizando-se de 7 pares de primers sobrepostos (Hashimoto *et al.*, 1996) descritos na Tabela 2. A reação de RT-PCR foi realizada no volume de 25µL contendo 2,0 µL de cDNA, 1,0 µL de cada primer, 2,0 µL de dNTPs (InvitrogenTM), 1,5 µL de MgCl₂ e 0,5 µL de *Taq polimerase* (InvitrogenTM) em termociclador (Mastercycler - Eppendorf), sendo a desnaturação inicial realizada por 4 minutos na temperatura de 94°C, a amplificação com 33 ciclos na temperatura de 94°C por 30 segundos, o anelamento a 54°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 40 segundos.

Para se observar a qualidade da amplificação, 5 µL de cada produto de RT-PCR foi acrescido de 1 µL de corante Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) e submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 2% (LGC Biotecnologia) juntamente com padrão molecular de fragmentos de DNA de tamanho conhecido (100 bp DNA Ladder - LGC Biotecnologia).

Tabela 2 - Descrição dos primers (A a G) utilizados para a amplificação do gene *btk* a partir de cDNA.

Pares de Primers	Primer forward	Primer reverse	Posição*
A	AGCTACCTGCATTAAGTCAG	CTTCTCGGAATCTGTCTTTC	76-377
B	CACTTGTGTTGAAACAGTGG	TCCGGTGAGAACTCCCAGGT	315-679
C	ATGCTATGGGCTGCCAAATT	TTTAGCAGTTGCTCAGCCTG	614-1019
D	GTATGAGTGGTATTCCAAAC	GGTCCTTTGGATCAATTTCC	968-1336
E	GCAGGCCTGGGATACGGATC	GGTGAAGGAACTGCTTTGAC	1294-1689
F	ATGGCTGCCTCCTGAACTAC	TGTCAGATTTGCTGCTGAAC	1568-1870
G	CGGAAGTCCTGATGTATAGC	CAAGAAGCTTATTGGCGAGC	1829-2132

Tabela modificada de Hashimoto *et al.* (1996). *A designação da sequência de nucleotídeos do cDNA são de Vetrie *et al.* (1993).

3.11- Polimorfismo conformacional de fita simples – SSCP

(Single Strand Conformation Polymorphism)

A triagem de mutações foi realizada pela técnica de SSCP (Orita *et al.*, 1989), a qual baseia-se no fato de que a conformação tridimensional de fragmentos de DNA fita simples depende da sequência de nucleotídeos, podendo a diferença de um nucleotídeo alterar o padrão de migração eletroforética. Os produtos de PCR foram desnaturados com solução 95% de formamida por 12 minutos em termociclador (Mastercycler - Eppendorf) na temperatura de 94°C e, na sequência, colocados por 10 minutos em gelo. Em seguida, realizou-se a eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida 10% em cuba de eletroforese vertical (Mini Protean Tetra Cell® - BioRad) a 200V. Ao término da corrida o gel foi corado com SYBR®

Gold (InvitrogenTM). Durante os ensaios de SSCP, as amostras dos pacientes para cada éxon e região promotora foram submetidas à corrida eletroforética juntamente com amostras de diferentes controles sadios para comparação do padrão de bandas.

3.12- Seqüenciamento

Devido à heterogeneidade de mutações ao longo de todo o gene *btk*, todos os éxons foram analisados em todos os pacientes e controles. Para os éxons que apresentaram padrão de bandas alterado em relação aos controles foram feitas novas amplificações, seguindo as mesmas condições descritas para PCR e RT-PCR. Estes produtos foram purificados com GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e quantificados em gel de agarose a 2% por comparação com padrão de massa molecular Low DNA Mass Ladder (InvitrogenTM). Após a quantificação as amostras foram seqüenciadas (seqüenciamento automático MegaBACE 1000 - GE Healthcare) utilizando-se dos mesmos pares de primers descritos e o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo SequenaseTM II DNA Polimerase - GE Healthcare) com dideoxinucleotídeo marcado com fluorescência. Estes seqüenciamentos foram realizados pelo Centro de Estudos do Genoma Humano - IB - USP. Todos os éxons com alterações identificadas foram seqüenciados para confirmação ou não de mutação.

A análise dos seqüenciamentos foi realizada confrontando a seqüência obtida com a seqüência referência (DNA genômico gi: 2281904/locusHSU78027; DNA complementar: NM_000061) depositada no banco internacional de genomas - GenBank utilizando o programa Blast (Basic Local Alignment Tool) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o editor de seqüências biológicas BioEdit (Íbis Therapeutics - Carlsbad, CA, EUA).

3.13- Reações de digestão enzimática

Inicialmente o éxon 11/12 foi amplificado por PCR. As reações de digestão foram realizadas em um volume de 30 µL, contendo 5 µL do produto de PCR, 3 µL de 10x tampão (Buffer 4), 0,5 µL da enzima *BtsCI* (New England Biolabs® Inc) e 21,5 µL de água ultra-pura, e incubadas a 50°C por 3 horas em termociclador (Mastercycler - Eppendorf). Em seguida, uma alíquota de 10 µL de cada produto de digestão acrescida de 3 µL de buffer de carga (95% formamida, 10mmol/L EDTA, 0,05% azul bromofenol e 0,05% xileno cianol) foi submetida à eletroforese em gel de agarose 4% por 1 hora a 80-100V. Para se observar a qualidade das reações de digestão, 5 µL do produto inicial de PCR de cada controle foram acrescidos de 3 µL de buffer de carga (95% formamida, 10mmol/L EDTA, 0,05% azul bromofenol e 0,05% xileno cianol) e submetidos à corrida eletroforética juntamente com o produto de digestão correspondente.

3.14- Análise da expressão de Btk e CD19⁺

A expressão da proteína Btk foi analisada por citometria de fluxo nos pacientes e mães, conforme descrito por Futatani e cols. (1998). Células mononucleares separadas de sangue periférico (CMSP) por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, EUA) foram marcadas com anticorpo anti-CD14 PE (IgG2a; Dako Japan) a fim de discriminar os monócitos. Em seguida foram fixadas em paraformaldeído 4%, permeabilizadas em 0,1% de Triton 100-X e incubadas com 2 µg/mL de anti-Btk (48-2H). Após lavagem foram incubadas com anticorpo anti-camundongo IgG1 FITC (Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, AL, EUA) em uma diluição de 1:1000. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo (Epics XL-MCL; Beckman-Coulter, EUA). Os valores de CD19⁺ foram

obtidos por imunofenotipagem a partir de sangue total incubado com anticorpo monoclonal de camundongo anti - CD19 (Beckman-Coulter, EUA).

4- RESULTADOS

4.1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes

Todos os pacientes estudados apresentaram fenótipo típico de XLA, como infecções de repetição, hipogamaglobulinemia e ausência ou redução do número de linfócitos B, conforme mostra a Tabela 3. Os pacientes tiveram início dos sintomas nos primeiros meses de vida (1-12 meses). A distribuição da idade ao diagnóstico variou de 11 meses a 28 anos. As concentrações séricas de IgG variaram de 3,7 a 149 mg/dL e a contagem de linfócitos B variou de 0 a 1%.

Tabela 3- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com XLA.

Paciente No.	Idade Atual (anos)	Início sintomas (meses)	Idade ao diagnóstico ^a	Níveis de Ig (mg/dL) [*]			Linfócitos B (%)	Apresentação clínica	História Familiar ^b
				IgA	IgM	IgG			
P1	3	5	11m	18	31	126	0,1	Pneumonias recorrentes	+
P2	6	3	2a	1	22	149	0	Pneumonias e otites recorrentes	+
P3	7	4	1a	<5,5	19	133	0,2	Pneumonias recorrentes, meningite por pneumococos, sepse, seqüela neurológica	-
P4	8	1	1a	5	4	3,7	0	Celulite, otites recorrentes, artrite, deslocação congênita do quadril	-
P5	10	4	2a	23	26	86	0,15	Pneumonias e sinusites recorrentes	+
P6	31	12	28a	<7	0,4	<33	1	Sarampo após vacina, escarlatina, infecção do trato genito urinário, sinusites e amigdalites recorrentes, psoríase, linfoma de Burkitt	-

^a ano(s), *m* meses.

^a Idade de início da terapia de reposição com gamaglobulina intravenosa.

^{*} Níveis de imunoglobulinas ao diagnóstico.

^b “+” indica que menino(s) da mesma família morreu por causa de infecções recorrentes.

4.2- Detecção de mutações por PCR-SSCP

Amostras de DNA dos pacientes P1, P2, P3, P5 e P6 foram utilizadas para triagem de mutações com a técnica de SSCP. No caso do paciente 4, foi possível a extração de RNA suficiente para realização de seqüenciamento direto da região codificadora de *btk* amplificada por RT-PCR.

A heterogeneidade de mutações ao longo do gene *btk* impossibilita a seleção de pontos *hot spot* para início das análises de SSCP, tendo sido necessário o *screening* de todos os éxons em todos os pacientes. Os éxons com alteração encontrada foram novamente amplificados e seqüenciados a fim de se confirmar ou não mutações.

As figuras abaixo apresentam as alterações eletroforéticas encontradas nos pacientes 1, 2 e 3. Os pacientes 5 e 6 não mostraram alterações nos ensaios de SSCP.

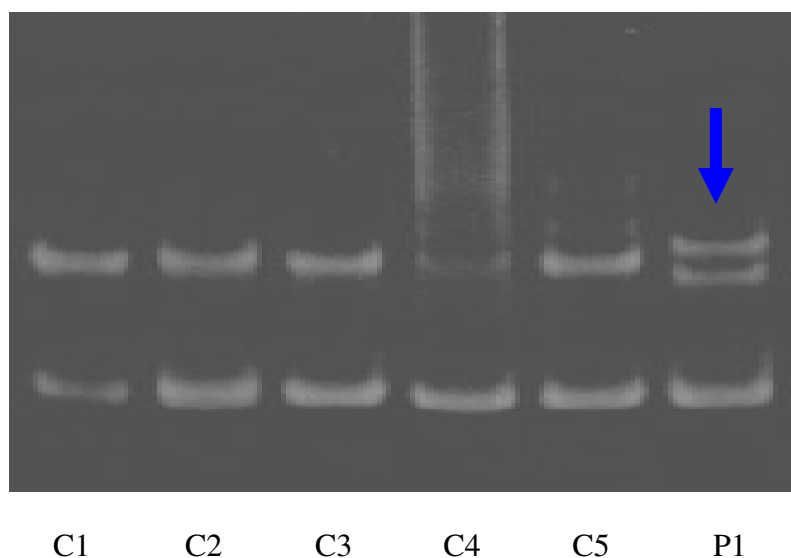


Figura 8- Alteração na corrida eletroforética encontrada no éxon 7 do paciente P1 (seta em azul). C1, C2, C3, C4, C5: amostras controles.

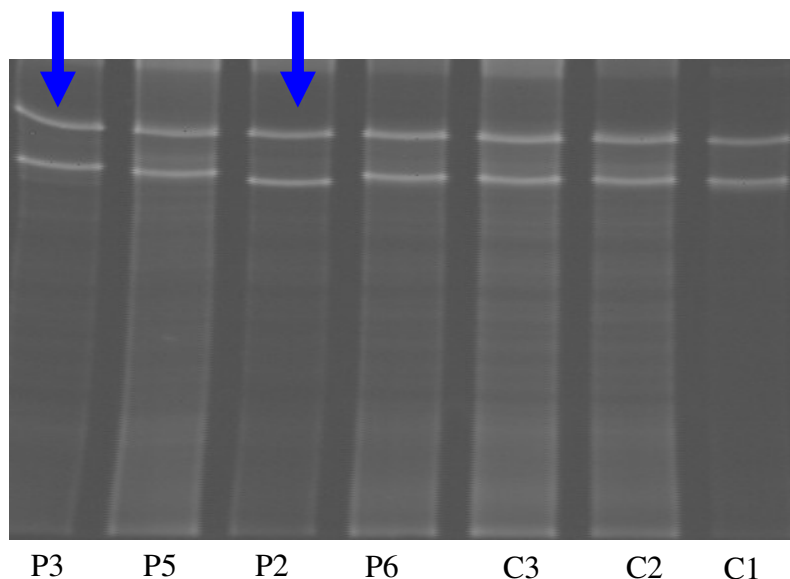


Figura 9- Alterações na corrida eletroforética encontradas no éxon 12 dos pacientes P2 e P3 (setas em azul). C1, C2 e C3: amostras controles.

4.3- Detecção de mutações por RT-PCR - SSCP

Como não foram encontradas alterações nas amostras de P5 e P6, procedeu-se a uma nova triagem por SSCP realizada com produtos de RT-PCR. No caso do paciente 5, os produtos de RT-PCR utilizados foram provenientes de amostras de RNA da mãe, devido à quantidade insuficiente de amostras do paciente. A mãe de P5 apresentou alteração na corrida eletroforética da região amplificada D (Fig.10), já em P6 não foram identificadas alterações.

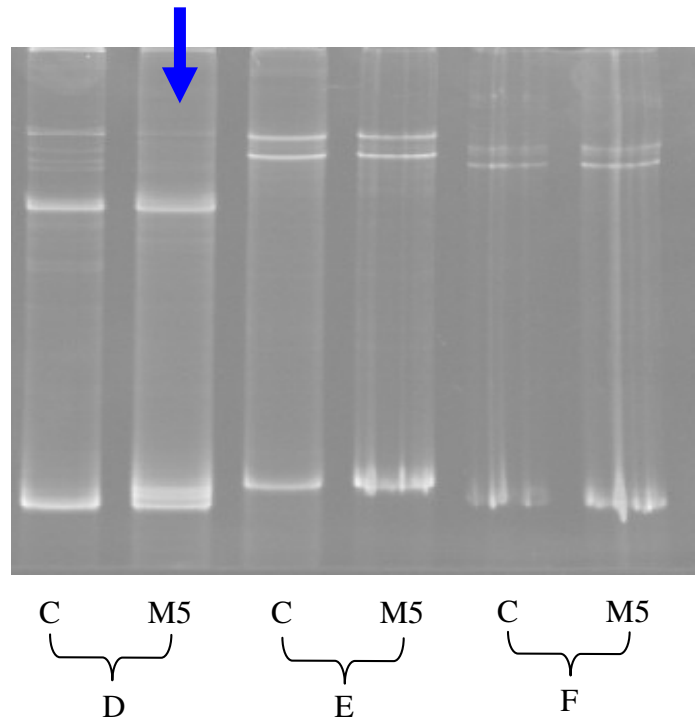


Figura 10- Alteração na corrida eletroforética encontrada na região D (éxons de 8 a 14) para a mãe de P5 (seta em azul). C: amostra controle.

A sensibilidade do SSCP na detecção de mutações é superior a 80% em fragmentos inferiores a 300 pb, mas dependendo da posição da mutação e da sequência que a flanqueia a especificidade do método pode diminuir. No caso de P6, onde não foram encontradas alterações nos ensaios de SSCP, procedeu-se ao sequenciamento direto da região codificadora de *btk* amplificada por RT-PCR. Em adição, a partir de DNA genômico do paciente, foram sequenciados a região promotora do gene e o éxon 1, devido aos achados descritos na literatura de novas mutações nestas regiões (Holinski-Feder *et al.*, 1998; Rohrer e Conley, 1998; Futatani *et al.*, 2001; Jo *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2008). Do mesmo modo, amostras da mãe do paciente foram submetidas ao sequenciamento direto. No entanto, nenhuma mutação foi detectada no paciente ou em sua mãe.

4.4- Resultado da análise dos seqüenciamentos

Foram detectadas mutações em todos os pacientes analisados, exceto em P6. Dentre as mutações identificadas, três ainda não foram descritas na literatura e duas são recorrentes (Tabela 4).

Tabela 4- Caracterização das mutações detectadas.

Paciente	Mutações		Éxon	Domínio	Padrão da Mãe
	Nucleotídeo	Proteína			
P1	c.718C>T	Q196X	Éxon 7	TH	heterozigota
P2	c.1204delT	Ala347fsX55	Éxon 12	SH2	heterozigota
P3	c.1227T>C	I355T	Éxon 12	SH2	NE
P4	c.1453G>T	E441X	Éxon 14	SH1	NE
P5	c.1135insT	Thr324fsX24	Éxon 11	SH2	heterozigota

A posição dos nucleotídeos e aminoácidos refere-se à seqüência de cDNA (GenBank NM_000061). Em negrito as novas mutações. TH Tec homology domain; SH2 Src homology 2 domain; SH1 kinase domain.

Em P1, a substituição no nucleotídeo c.718 C >T gera um stop codon prematuro (p.Q196X), como fez c.1453G>T (p.E441X) em P4 (Fig. 11).

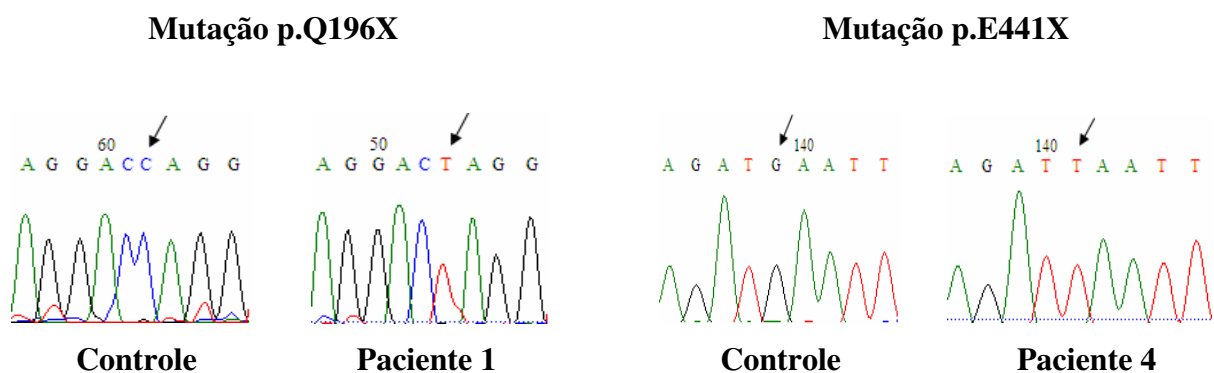


Figura 11- Mutações identificadas na análise de sequenciamento de P1 na posição c.718C>T e de P4 na posição c.1453G>T.

No paciente 3 foi encontrada uma mutação missense no nucleotídeo c.1227T>C resultando em uma mudança de aminoácidos de Isoleucina para Treonina no códon 355 (p.I355T) (Fig.12). Devido à possibilidade de polimorfismos em *btk*, amostras de DNA de 50 indivíduos saudáveis e de famílias não relacionadas foram avaliadas para a substituição c.1227T>C utilizando-se da enzima de restrição *BtsCI* (New England Biolabs, Inc). Como a substituição de aminoácidos c.1227T>C não estava presente nas amostras controles a mutação de P3 foi confirmada (Fig.13).

Mutação p.I355T

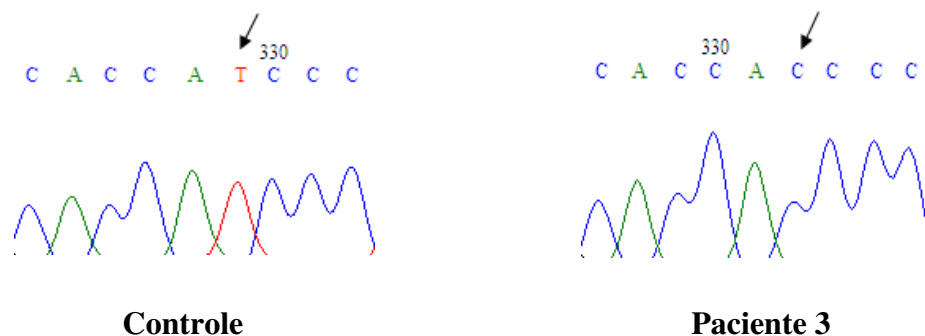


Figura 12- Mutação identificada na análise de sequenciamento de P3 na posição c.1227T>C.

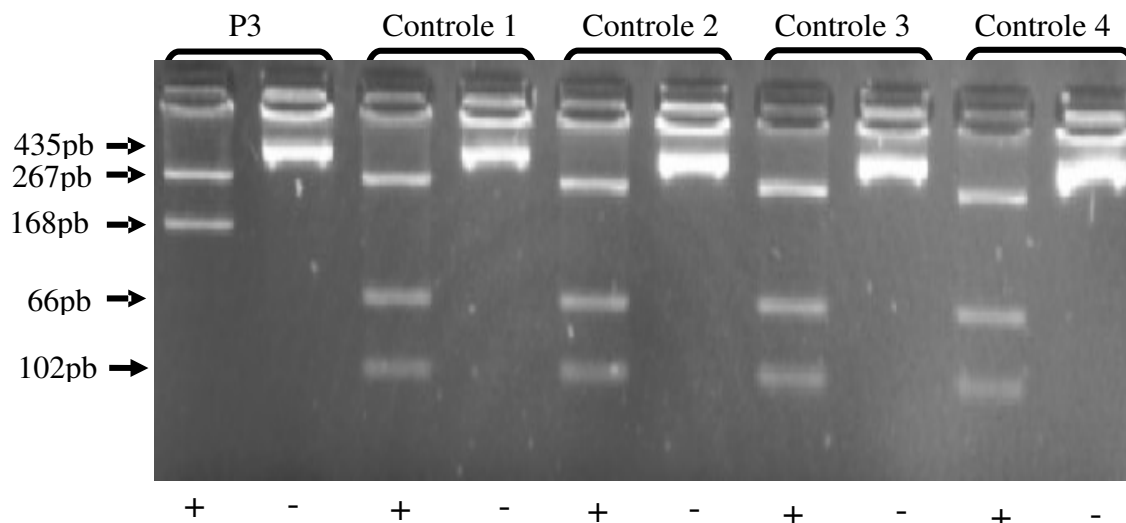


Figura 13- Gel de agarose 4% com produtos de PCR do éxon 11/12 do paciente 3 e de 4 controles digeridos com a enzima de restrição *BtsCI* (+) e sem digestão (-). Nos indivíduos sem mutação (controles) a enzima possui dois sítios de corte gerando 3 fragmentos: 267pb, 102pb e 66pb. A presença da mutação em P3 leva a perda de um sítio de corte da enzima resultando em uma banda de 267pb e outra de 168pb.

Foram também identificadas duas mutações frameshift. Em P2, uma deleção de um T na posição c.1204 não altera o aminoácido Alanina no códon 347, mas muda o quadro de

leitura e cria um stop codon na posição 55 (p.Ala347fsX55). De forma semelhante, no paciente 5 uma inserção de um T (c.1135insT) embora não cause a mudança do aminoácido Treonina no códon 324, leva a um frameshift gerando um stop codon na posição 24 (p.Thr324fsX24).

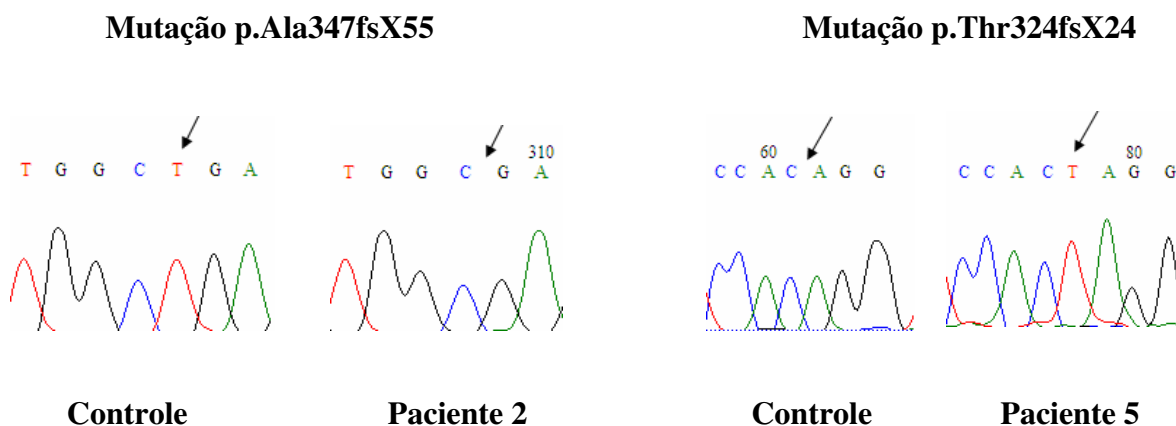


Figura 14- Mutações identificadas na análise de seqüenciamento de P2 na posição c.1204delT e de P5 na posição c.1135insT.

Foi possível a obtenção de amostras de sangue para a análise mutacional das mães dos pacientes 1, 2 e 5. Todas apresentaram alelos em heterozigose para a mutação encontrada no filho, confirmando o estado de carreadora da doença.

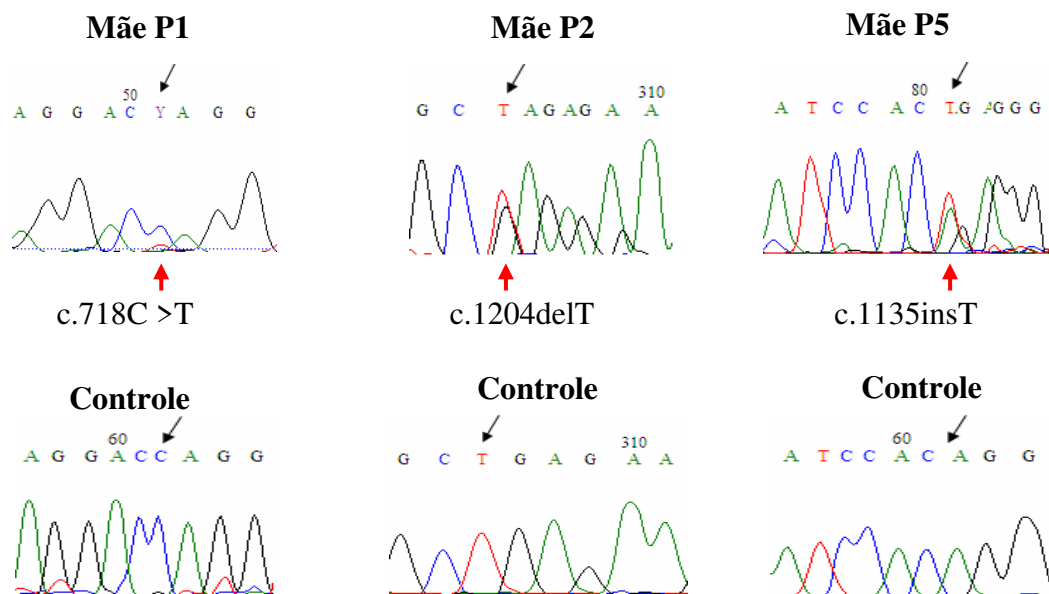


Figura 15- Análise de sequenciamento das mães de P1, P2 e P5 mostrando a presença de alelos em heterozigose para mutação.

4.5- Análise mutacional das avós e tias maternas

A partir da identificação das mutações nos pacientes, a análise de sequenciamento genômico foi estendida para os ancestrais maternos de P1 (avó, 3 tias), P2 (avó, 7 tias) e P3 (avó, 1 tia). Dentre as avós e tias examinadas, somente a avó de P1 apresentou alelos em heterozigose para mutação (c.718C>T), o que a confirma carreadora de XLA.

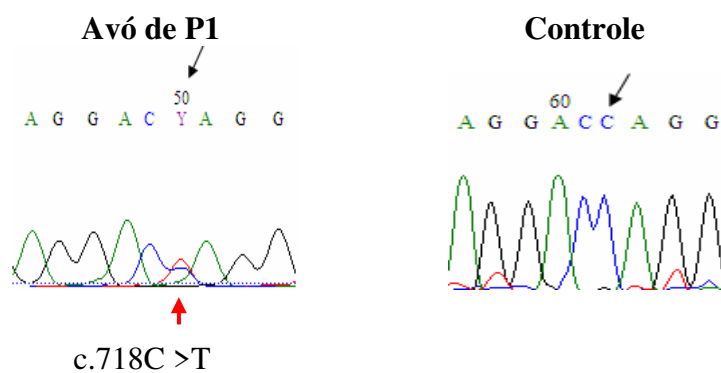


Figura 16- Análise de seqüenciamento da avó de P1 mostrando a presença de alelos em heterozigose para mutação.

Os heredogramas abaixo ilustram os resultados obtidos na análise de seqüenciamento das mães, avós e tias maternas dos pacientes 1, 2 e 3.

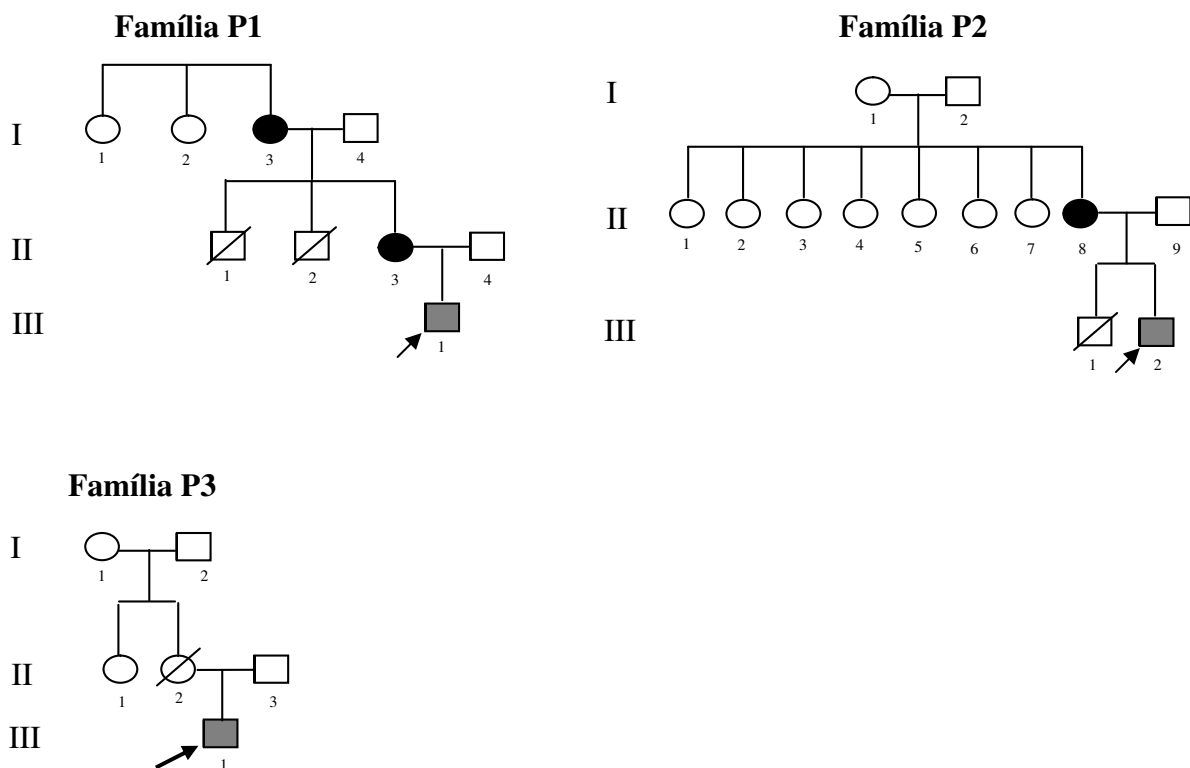


Figura 17- Heredogramas das famílias dos pacientes 1, 2 e 3. Os indivíduos são representados como: $\square$, homem não afetado; $\bigcirc$, mulher não afetada; $\diagup$, homem falecido; $\diagdown$, mulher falecida; $\blacksquare$, homem com XLA; $\bullet$, mulher portadora de XLA. A flecha indica o paciente.

4.6- Análise da expressão de Btk em monócitos por citometria de fluxo

A análise da expressão de Btk em monócitos foi realizada por citometria de fluxo, tendo sido encontrada deficiência na expressão de Btk nos pacientes (4,5% a 65,2%) e um padrão bimodal de expressão nas mães analisadas. A expressão de Btk reduzida nos pacientes identifica XLA, e nas mães o padrão bimodal de expressão detecta o estado de carreadora da doença. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para a expressão de Btk nos pacientes e mães estudadas.

Tabela 5- Expressão de Btk nos pacientes e mães analisadas.

Paciente No.	Expressão de Btk (%)^a	
	Paciente	Mãe
P1	59,1	NE
P2	65,2	78,6
P3	39	72
P4	27,9	52
P5	4,5	29,2
P6	42,2	NE

^a Expressão normal é > 95%. NE, não examinado.

5- DISCUSSÃO

Neste estudo são descritas as características clínicas, imunológicas e genéticas de 6 pacientes brasileiros com XLA. Os pacientes analisados desenvolveram sintomas durante o primeiro ano de vida, atribuídos à imunodeficiência. A aumentada susceptibilidade a infecções do trato respiratório foi a manifestação clínica principal. Todos os pacientes apresentaram hipogamaglobulinemia anterior ao início da terapia de reposição com gamaglobulina (IVIG) e linfócitos B periféricos abaixo de 2% .

Em relação ao início dos sintomas, os relatos da literatura mostram que os pacientes são saudáveis no período neonatal, mas geralmente têm o início das infecções entre 3 e 18 meses de idade (Lederman e Winkelstein, 1985; Conley e Howard, 2002; Smith *et al.*, 2007). Embora este estudo envolva um pequeno número de pacientes, as infecções do trato respiratório, como pneumonias, foram as manifestações clínicas mais encontradas, de forma similar a estudos recentes da Itália (Plebani *et al.*, 2002), Estados Unidos (Winkelstein *et al.*, 2006) e Irã (Moin *et al.*, 2004).

As infecções causadas por bactérias encapsuladas e enterovírus são frequentes em XLA devido à imunodeficiência humoral. Desde o primeiro caso reconhecido de agamaglobulinemia congênita em 1952 (Bruton, 1952), é descrito na literatura a profunda redução ou ausência de todas as classes de imunoglobulinas séricas nestes pacientes. Na XLA, mutações em *btk* levam a um bloqueio no desenvolvimento de linfócitos B na medula óssea resultando em baixas dosagens ou ausência de células B periféricas e hipogamaglobulinemia (Campana *et al.*, 1990).

As infusões de gamaglobulina intravenosa (IVIG) têm se tornado a base da terapia para as deficiências predominantemente de anticorpos (Buckley e Schiff, 1991; Chapel *et al.*, 2003). A eficácia da IVIG é documentada na redução da incidência e gravidade das infecções bacterianas em XLA (Quartier *et al.*, 1999; Aghamohammadi *et al.*, 2004). O diagnóstico

precoce da doença com início imediato da terapia de reposição de imunoglobulinas é efetivo na prevenção de seqüelas duradouras (Chun *et al.*, 2008).

Entretanto, o diagnóstico de XLA ocorre freqüentemente alguns anos após o início dos sintomas. Nos primeiros anos de vida, as manifestações clínicas da doença podem ser confundidas com as infecções recorrentes comuns na faixa pediátrica devido à imaturidade do sistema imune.

A média de idade ao diagnóstico de pacientes XLA tem sido obtida em muitos países, como 3,5 anos na Itália (Plebani *et al.*, 2002), 4 anos no Irã (Moin *et al.*, 2004), 4,5 anos na Argentina (Basile *et al.*, 2009) e 6,2 anos na Espanha (López-Granados *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos (Winkelstein *et al.*, 2006), a média de idade ao diagnóstico foi avaliada em dois grupos de pacientes XLA. Os pacientes com história familiar positiva para IDP apresentaram média de 2,59 anos, já no grupo com história familiar negativa a média foi de 5,37 anos. Baseando-se somente na história familiar positiva ao nascimento, apenas 34,5% dos pacientes foram diagnosticados antes dos primeiros sintomas clínicos.

Embora a herança da doença seja ligada ao X, há história familiar positiva em apenas 30-50% de todos os pacientes com XLA, com o restante dos casos desenvolvendo-se como mutações esporádicas (Conley e Howard, 2002; Winkelstein *et al.*, 2006). Independente da história familiar, os pacientes em sua maioria são reconhecidos imunodeficientes somente quando hospitalizados por uma infecção grave (Conley *et al.*, 2009).

A XLA é usualmente diagnosticada na infância, mas também são reportados na literatura indivíduos diagnosticados em idade adulta (Sigmon *et al.*, 2008). Nesses casos, o paciente pode ter apresentado os primeiros sintomas tardiamente ou ter sido diagnosticado incorretamente como tendo imunodeficiência comum variável (ICV), devido à sobreposição de sintomas desta IDP com XLA. Entretanto, neste estudo o paciente 6 teve início dos sintomas

com 1 ano de idade, mas somente aos 28 anos, devido à ocorrência de um linfoma de Burkitt, foi identificada IDP e iniciou-se a terapia de reposição com gamaglobulina. A heterogeneidade nos sintomas e na gravidade está se tornando cada vez mais reconhecida em XLA e em outras IDPs, aumentando a possibilidade de que indivíduos com manifestações clínicas moderadas cheguem a idade adulta sem o diagnóstico e o tratamento adequado (Gaspar *et al.*, 2000).

O diagnóstico definitivo de XLA é realizado por técnicas de sequenciamento gênico, visto que em 90-95% dos casos confirmados da doença é possível se identificar mutações no gene *btk* (Conley *et al.*, 1998). A análise mutacional de *btk* é fundamental na confirmação de XLA, principalmente nos casos de características clínicas sobrepostas com outras IDPs, como a imunodeficiência comum variável, hipogamaglobulinemia transitória e situações de neutropenia.

Durante o período deste estudo foram identificadas 5 mutações afetando a região codificante de *btk* e envolvendo os domínios da proteína: TH, SH2 e SH1. No paciente 1, a substituição de aminoácidos c.718 C>T gerou um stop codon (p.Q196X) no domínio TH, no qual está localizado um motivo de ligação de íons Zn^{2+} altamente conservado (motivo Btk) e uma região rica em prolina responsáveis pela autoregulação das Tec-quinases (Hyvönen e Saraste, 1997; Vihinen *et al.*, 1997b). Mutações afetando a ligação de zinco levam a geração de proteínas extremamente instáveis (Hyvönen e Saraste, 1997; Vihinen *et al.*, 1997b).

Do mesmo modo, a substituição c.1453G>T identificada em P4 leva a terminação prematura da proteína (p.E441X) afetando o domínio da quinase SH1. O domínio quinase de Btk tem aproximadamente 250 resíduos e o modelo tridimensional mostra que no centro de sua função catalítica existem sítios de ligação de ATP e substratos que consistem de resíduos altamente conservados (Vihinen *et al.*, 1994). A presença de mutações neste domínio deve interromper a atividade de autofosforilação da proteína (Futatani *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*,

1998). No entanto, são reportados casos de pacientes com mutação em SH1 e expressão de Btk ainda conservada embora em nível reduzido (Gaspar *et al.*, 2000).

Os pacientes P2, P3 e P5 apresentaram mutações no domínio SH2, que se liga a sequências que abrigam resíduos de tirosina fosforilados responsáveis pela localização celular da proteína, recrutamento de substratos e regulação da atividade da quinase (Guo *et al.*, 2006). Em P2, c.1204delT causa uma mutação frameshift levando a um stop codon prematuro (p.Ala347fsX55). De forma similar, em P5 c.1135insT gera um stop codon e resulta na mudança da proteína p.Thr324fsX24. No paciente 3, a substituição c.1227T>C resultou na troca de aminoácidos p.I355T. As mutações em SH2 podem resultar em desestabilização do domínio, posicionamento incorreto e inativação da atividade de quinase da proteína (Guo *et al.*, 2006).

Em adição, as mães dos pacientes P1, P2 e P5 foram analisadas e apresentaram alelos em heterozigose para as mutações identificadas em seus filhos, o que as confirma portadoras da doença. Nos casos de P1, P2 e P3 foi possível a análise mutacional de avós e tias maternas. Neste estudo apenas uma avó (avó de P1) foi identificada portadora de XLA e nenhuma das tias maternas analisadas mostrou-se carreadora da doença. Segundo Conley e cols. (1998) o risco reprodutivo de uma mãe de um paciente ser portadora de XLA é de aproximadamente 77%, o de uma irmã é metade do risco da mãe (38%) e para avós e tias maternas a estimativa é de 25% e 16%, respectivamente. Estas porcentagens são similares às encontradas em outras imunodeficiências ligadas ao X e podem ser explicadas pelo fato de que a maioria das novas mutações ocorre nos gametas masculinos, sendo mostrado em alguns estudos de XLA que o alelo com mutação em *btk* veio do avô ou bisavô materno não afetado (Goldberg *et al.*, 1993; Carlson *et al.*, 1994; Tuchman *et al.*, 1995; Conley *et al.*, 1998; Rae *et al.*, 1998).

A análise da expressão de Btk em monócitos por citometria de fluxo revelou a deficiência desta proteína nos pacientes e mães analisadas. A variabilidade nos valores de expressão de Btk encontrada nos pacientes e mães também é vista em outros estudos e é independente do tipo de mutação ou domínio afetado (Futatani *et al.*, 1998; Kanegane *et al.*, 2001; Tani *et al.*, 2002; Lopez-Herrera *et al.*, 2008).

Deste modo, não é possível prever como mutações específicas em *btk* devem afetar a função da proteína e originar XLA. Além disso, também não é possível correlacionar a expressão da proteína com as diferenças nos fenótipos clínicos e imunológicos, visto que tem sido mostrada deficiência na expressão de Btk em indivíduos previamente diagnosticados como imunodeficiência comum variável ou deficiência de subclasses de imunoglobulinas (Conley *et al.*, 1994; Hagemann *et al.*, 1994; Vorechovský, 1995; Futatani *et al.*, 1998).

A expressão de Btk encontrada na mãe de P5, 29,2%, destaca-se por ser a menor entre as mães analisadas. Tendo em vista que a presença do padrão bimodal de expressão de Btk nas mães evidencia a presença de células com Btk negativo e outras com Btk positivo, a reduzida expressão identificada pode ser resultante da interferência de Btk mutante na função de células com Btk intacta, o que é chamado de efeito dominante negativo. Recentemente, o possível efeito dominante negativo envolvido em mutações de *btk* foi testado por Pérez de Diego e cols. (2008). As interações funcionais entre formas transfectadas mutantes de Btk humano e Btk endógeno foram testadas utilizando-se de células de linfoma de galinha, DT40, tendo como leitura a mobilização de cálcio em resposta à estimulação de BCR. Sete mutações missense - R28C, R288W, K374N, K430E, F540S, R544G, R544S - localizadas em diferentes domínios e associadas à expressão significativa de Btk foram avaliadas neste modelo celular e nenhuma apresentou efeito dominante negativo sobre a função de Btk nas células do tipo selvagem. No entanto, outras mutações que também não levam a perda total de expressão de Btk devem ser

testadas quanto a um efeito dominante negativo. Na leucemia este fenômeno tem sido associado com mutações em *btk*, existindo sobrevivência seletiva de células leucêmicas que exibem expressão de formas Btk dominante-negativo (Feldhahn *et al.*, 2005).

A maioria das mutações em *btk* resulta em deficiência na expressão protéica refletindo uma redução no mRNA ou instabilidade da proteína produzida. Apoiando-se nesta observação a avaliação da proteína Btk é um importante indicador na triagem de XLA, principalmente nos casos atípicos, esporádicos, ou quando não se identifica a mutação. Em 10 a 20% dos pacientes nos estudos de XLA não é possível identificar a mutação, o que não está claro se é devido à presença de mutações difíceis de serem detectadas pelos métodos utilizados ou se esses pacientes apresentam doenças fenotipicamente semelhantes à XLA, mas causadas por defeitos genéticos diferentes (Conley *et al.*, 1998). Durante este estudo o paciente 6 apresentou deficiência na expressão de Btk indicando XLA, apesar de não ter sido encontrada mutação na região codificante ou promotora de *btk*.

Dentre as apresentações clínicas de P6 destaca-se a ocorrência de linfoma de Burkitt. Este tipo de linfoma é uma das manifestações clínicas da doença linfoproliferativa ligada ao X (XLP). XLP é causada por mutações no gene SH2D1A (*src homology 2 domain protein 1A*) e as principais complicações da doença são o defeito na resposta imune contra o vírus Epstein-Barr (EBV) e o desenvolvimento de linfomas de linfócitos B em pacientes infectados ou não por EBV (Bassiri *et al.*, 2008). No entanto, a baixa expressão de Btk apresentada por este paciente e o reduzido número de linfócitos B descartam a possibilidade de diagnóstico de XLP.

Como reportado na literatura (Conley *et al.* 1994; Holinski-Feder *et al.*, 1998; Tao *et al.*, 2000; Teimourian *et al.*, 2008), não há correlação entre fenótipo e genótipo em XLA indicando que a presença de mutações específicas em *btk* são apenas um dos fatores que influenciam a gravidade da doença. A idade ao diagnóstico e a gravidade das infecções antes e

pós-diagnóstico são variáveis mesmo entre pacientes com stop codon prematuro e deficiência de Btk. A característica mais consistente em XLA encontrada em todos os pacientes analisados foi a marcada redução de células B (= 1%).

Atualmente mais de 800 mutações em *btk* já foram identificadas (Mohamed *et al.*, 2009). Os tipos de mutações encontradas neste estudo: substituições de um único par de base ou inserções ou deleções menores que 5 pares de base somam mais de 90% do total de mutações descritas. O restante das mutações inclui grandes deleções, duplicações, inversões e combinações complexas de inserções e deleções (Rohrer *et al.*, 1999; Conley *et al.*, 2005).

Muitos fatores contribuem para a variabilidade de mutações. Primeiramente, como em outras doenças ligadas ao X que são letais sem intervenção médica, XLA é mantida na população por novas mutações (Howard *et al.*, 2006). Como estas novas mutações ocorrem independentemente, elas podem envolver múltiplos locais por todo o gene. Além disso, Btk é altamente conservada. A sequência de aminoácidos de Btk em humanos e murinos têm similaridade de 98%, sugerindo tolerância mínima para qualquer alteração na sequência (Conley *et al.*, 2009).

As consequências mutacionais devem ser avaliadas a nível de proteína, clareando o efeito das mutações na estabilidade e atividade de Btk. O método utilizado da citometria de fluxo em monócitos é importante na identificação da deficiência de Btk, entretanto não mostra a atividade funcional da proteína mutante. De acordo com as possibilidades laboratoriais, os ensaios *in vitro* de atividade da quinase são importantes para que a extensão das mutações em *btk* e a patogênese molecular de XLA possam ser plenamente compreendidas.

6- CONCLUSÕES

- Dentre 6 pacientes analisados de famílias não relacionadas foram identificadas 5 mutações em *btk* durante o curso deste estudo.
- A caracterização das mutações responsáveis por XLA possibilitou o diagnóstico definitivo da doença e a detecção de portadoras, permitindo o aconselhamento genético subsequente.
- Todas as mutações identificadas afetam a expressão da proteína Btk.
- A análise genética e a avaliação da expressão de Btk devem ser conduzidas de forma combinada, aprimorando o diagnóstico de XLA.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aghamohammadi A, Parvaneh N, Kanegane H, Moin M, Amirzargar AA, Farhoudi A, et al. Screening of the Bruton Tyrosine Kinase (BTK) Gene Mutations in 13 Iranian Patients with Presumed X-Linked Agammaglobulinemia. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2004;3:175-9.

Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science.* 1993;259:990-3.

Amoras AL, da Silva MT, Zollner RL, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela MM. Expression of Fc gamma and complement receptors in monocytes of X-linked agammaglobulinaemia and common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol.* 2007;150:422-8.

Amoras AL, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela MM. Defective Fc-, CR1- and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2003;13:181-8.

Antachopoulos C, Walsh TJ, Roilides E. Fungal infections in primary immunodeficiencies. *Eur J Pediatr.* 2007;166:1099-117.

Arkwright PD, Abinun M, Cant AJ. Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases. *Blood.* 2002;99:2694-702.

Assari T. Chronic granulomatous disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol.* 2006;5:4.

Basile N, Danielian S, Oleastro M, Rosenzweig S, Prieto E, Rossi J, et al. Clinical and molecular analysis of 49 patients with X-linked agammaglobulinemia from a single center in Argentina. *J Clin Immunol.* 2009;29:123-9.

Bassiri H, Janice Yeo WC, Rothman J, Koretzky GA, Nichols KE. X-linked lymphoproliferative disease (XLP): a model of impaired anti-viral, anti-tumor and humoral immune responses. *Immunol Res.* 2008;42:145-59.

Berg LJ, Finkelstein LD, Lucas JA, Schwartzberg PL. Tec family kinases in T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:549-600.

Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics.* 1952;9:722-8.

Brydges S, Kastner DL. The systemic autoinflammatory diseases: inborn errors of the innate immune system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;305:127-60.

Buckley RH, Schiff RI. The use of intravenous immune globulin in immunodeficiency diseases. *N Engl J Med.* 1991;325:110-7.

Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Picard C, Puel A, Abel L. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of pediatric infectious diseases. *Curr Opin Immunol.* 2008;20:39-48.

Bykowsky MJ, Haire RN, Ohta Y, Tang H, Sung SS, Veksler ES, et al. Discordant phenotype in siblings with X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet.* 1996; 58:477-83.

Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol.* 2007;7:633-43.

Campana D, Farrant J, Inamdar N, Webster ADB, Janossy G. Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia. *J Immunol.* 1990;145:1675-80.

Carlson KM, Bracamontes J, Jackson CE, Clark R, Lacroix A, et al. Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Am J Hum Genet.* 1994;55:1076-82.

Carneiro-Sampaio M, Coutinho A. Tolerance and autoimmunity: lessons at the bedside of primary immunodeficiencies. *Adv Immunol.* 2007;95:51-82.

Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science*. 2007; 317: 617-9.

Chapel H, Geha R, Rosen F. Primary immunodeficiency diseases: an update. *Clin Exp Immunol*. 2003;132:9-15.

Chun JK, Lee TJ, Song JW, Linton JA, Kim DS, Debnath J, et al. Analysis of clinical presentations of Bruton disease: a review of 20 years of accumulated data from pediatric patients at Severance Hospital. *Yonsei Med J*. 2008;49:28-36.

Citron KM. Agammaglobulinaemia with splenomegaly. *Br Med J*. 1957;1:1148-51.

Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, Howard V, Kanegane H, Miyawaki T, et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol Rev*. 2005;203:216-34.

Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, et al. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:199-227.

Conley ME, Fitch-Hilgenberg ME, Cleveland JL, Parolini O, Rohrer J. Screening of genomic DNA to identify mutations in the gene for Bruton's tyrosine kinase. *Hum Mol Genet*. 1994;3:1751-6.

Conley ME, Howard V. Clinical findings leading to the diagnosis of X-linked agammaglobulinemia. *J Pediatr*. 2002;141:566-71.

Conley ME, Mathias D, Treadaway J, Minegishi Y, Rohrer J. Mutations in Btk in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet*. 1998;62:1034-43.

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

Cooke WT, Weiner W, Shinton NK. Agammaglobulinaemia: report of two adult cases. Br Med J. 1957;1:1151-2.

Cooper MD, Lawton AR. Circulating B-cells in patients with immunodeficiency. Am J Pathol. 1972;69:513-28.

Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. Clin Immunol. 1999;92:34-48.

Cunningham-Rundles C, Ponda PP. Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases. Nat Rev Immunol. 2005;5:880-92.

Debnath J, Chamorro M, Czar MJ, Schaeffer EM, Lenardo MJ, Varmus HE, et al. rlk/TXK encodes two forms of a novel cysteine string tyrosine kinase activated by Src family kinases. Mol Cell Biol. 1999;19:1498-507.

Dobbs AK, Yang T, Farmer D, Kager L, Parolini O, Conley ME. A hypomorphic mutation in Ig β (CD79b) in a patient with immunodeficiency and a leaky defect in B cell development. J Immunol. 2007;179:2055-9.

Ekman N, Arighi E, Rajantie I, Saharinen P, Ristimäki A, Silvennoinen O. The Bmx tyrosine kinase is activated by IL-3 and G-CSF in a PI-3K dependent manner. Oncogene. 2000;19:4151-8.

ESID Registry. Major Immunodeficiency Groups, 2009. European Society for Immunodeficiencies [home page on the internet]. Disponível em: <http://www.esid.org/statistics.php?sub=2>.

Feldhahn N, Río P, Soh BN, Liedtke S, Sprangers M, Klein F, et al. Deficiency of Bruton's tyrosine kinase in B cell precursor leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:13266-71.

Felices M, Berg LJ. The Tec kinases Itk and Rlk regulate NKT cell maturation, cytokine production, and survival. *J Immunol* 2008;180:3007-18.

Felices M, Falk M, Kosaka Y, Berg LJ. Tec kinases in T cell and mast cell signaling. *Adv Immunol* 2007;93:145-84.

Ferrari S, Lougaris V, Caraffi S, Zuntini R, Yang J, et al. Mutations of the Ig β gene cause agammaglobulinemia in man. *J Exp Med*. 2007;204:2047-51.

Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and other hemophagocytic disorders. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2008;28:293-313.

Finkelstein LD, Schwartzberg PL. Tec kinases: shaping T-cell activation through actin. *Trends Cell Biol* 2004;14:443-51.

Frank MM. Hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:S398-S401.

Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood*. 1998;91:595-602.

Futatani T, Watanabe C, Baba Y, Tsukada S, Ochs HD. Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinaemia and carrier females. *Br J Haematol*. 2001;114:141-9.

Gaspar HB, Ferrando M, Caragol I, Hernandez M, Bertran JM, De Gracia X, et al. Kinase mutant Btk results in atypical X-linked agammaglobulinaemia phenotype. Clin Exp Immunol. 2000;120:346-50.

Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, Kinnon C. Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia (XLA): the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA. Clin Exp Immunol. 1998;111:334-8.

Geha RS, Rosen FS, Merler E. Identification and characterization of subpopulations of lymphocytes in human peripheral blood after fractionation on discontinuous gradients of albumin. J Clin Invest. 1973;52:1726-34.

Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, Theilmann J, Graham RK, Squitieri F, et al. Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. Nat Genet. 1993;5:174-9.

Gomez-Rodriguez J, Readinger JA, Viorritto IC, Mueller KL, Houghtling RA, Schwartzberg PL. Tec kinases, actin, and cell adhesion. Immunol Rev. 2007;218:45-64.

Good RA. Clinical investigations in patients with agammaglobulinemia. J Lab Clin Med. 1954;44:803.

Grant GH, Wallace WD. Agammaglobulinaemia. Lancet. 1954;267:671-3.

Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Eibel H, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. Nat Immunol. 2003;4: 261-8.

Grumach AS, Duarte AJ, Bellinati-Pires R, Pastorino AC, Jacob CM, Diogo CL, et al. Brazilian report on primary immunodeficiencies in children: 166 cases studied over a follow-up time of 15 years. J Clin Immunol. 1997;17:340-5.

Guo S, Wahl MI, Witte ON. Mutational analysis of the SH2-kinase linker region of Bruton's tyrosine kinase defines alternative modes of regulation for cytoplasmic tyrosine kinase families. *Int Immunol*. 2006;18:79-87.

Guzman D, Veit D, Knerr V, Kindle G, Gathmann B, Eades-Perner AM, et al. The ESID Online Database network. *Bioinformatics*. 2007;23:654-5.

Hagemann TL, Chen Y, Rosen FS, Kwan SP. Genomic organization of the Btk gene and exon scanning for mutations in patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mol Genet*. 1994;3:1743-9.

Hashimoto S, Tsukada S, Matsushita M, Miyawaki T, Niida Y, Yachie A, et al. Identification of Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide study of Btk deficiency in Japan. *Blood*. 1996;88:561-73.

Hermans PE, Diaz-Buxo JA, Stobo JD. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency: clinical observations in 50 patients. *Am J Med*. 1976;61:221-37.

Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med*. 1993;86:31-42.

Hirano M, Kikuchi Y, Nisitani S, Yamaguchi A, Satoh A, Ito T, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk) enhances transcriptional co-activation activity of BAM11, a Btk-associated molecule of a subunit of SWI/SNF complexes. *Int Immunol*. 2004;16:747-57.

Holinski-Feder E, Weiss M, Brandau O, Jedele KB, Nore B, Bäckesjö CM, et al. Mutation screening of the BTK gene in 56 families with X-linked agammaglobulinemia (XLA): 47 unique mutations without correlation to clinical course. *Pediatrics*. 1998;101:276-84.

Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM, et al. Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med*. 2003;197:1603-11.

Howard V, Greene JM, Pahwa S, Winkelstein JA, Boyle JM, Kocak M, et al. The health status and quality of life of adults with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol*. 2006;118:201-8.

Hu Q, Davidson D, Schwartzberg PL, Macchiarini F, Lenardo MJ, Bluestone J, et al. Identification of Rlk, a novel protein tyrosine kinase with predominant expression in the T cell lineage. *J Biol Chem*. 1995;270:1928-34.

Hyvönen M, Saraste M. Structure of the PH domain and Btk motif from Bruton's tyrosine kinase: molecular explanations for X-linked agammaglobulinaemia. *EMBO J*. 1997;16:3396-404.

IUIS. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:1161-78.

Janeway CA, Apte L, Gitlin D. Agammaglobulinemia. *Trans Assoc Am Phys*. 1953;66:200-2.

Janka GE. Hemophagocytic syndromes. *Blood Rev*. 2007;21:245-53.

Jefferies CA, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, Wietek C, et al. Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2003;278:26258-64.

Jin H, Webster AD, Vihinen M, Sideras P, Vorechovský I, Hammarstrom L, et al. Identification of Btk mutations in 20 unrelated patients with X-linked agammaglobulinaemia (XLA). *Hum Mol Genet*. 1995;4:693-700.

Jo EK, Kanegane H, Nonoyama S, Tsukada S, Lee JH, Lim K, et al. Characterization of mutations, including a novel regulatory defect in the first intron, in Bruton's tyrosine kinase gene from seven Korean X-linked agammaglobulinemia families. *J Immunol.* 2001;167:4038-45.

Kanegane H, Futatani T, Wang Y, Nomura K, Shinozaki K, Matsukura H, et al. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:1012-20.

Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, Futatani T, Nomura K, Yamamoto J, et al. Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clin Exp Immunol.* 2000;120:512-7.

Keefer CS, Blake FG, Marshall EK Jr, Lockwood JS, Wood BW. Penicillin and treatment of infections. A report of 500 cases. Statement by the Committee on Chemotherapeutic and Other Agents, Division of Medical Sciences, National Research Council. *J Am Med Assoc.* 1943;122:1217-24.

Kornfeld SJ, Haire RN, Strong SJ, Tang H, Sung SS, Fu SM, et al. A novel mutation (Cys145->Stop) in Bruton's tyrosine kinase is associated with newly diagnosed X-linked agammaglobulinemia in a 51-year-old male. *Mol Med.* 1996;2:619-23.

Kurosaki T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:555-92.

Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine.* 1985;64:145-56.

Lee PP, Chen TX, Jiang LP, Chan KW, Yang W, Lee BW, et al. Clinical Characteristics and Genotype-phenotype Correlation in 62 Patients with X-linked Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol*. 2009;Nov 11.

Leiva LE, Zelazco M, Oleastro M, Carneiro-Sampaio M, Condino-Neto A, Costa-Carvalho BT, et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol*. 2007;27:101-8.

Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr*. 1997;131:47-54.

Lewis CM, Broussard C, Czar MJ, Schwartzberg PL. Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development. *Curr Opin Immunol*. 2001;13:317-25.

Lindvall JM, Blomberg KE, Väliäho J, Vargas L, Heinonen JE, Berglöf A, et al. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev*. 2005;203:200-15.

LoGalbo PR, Sampson HA, Buckley RH. Symptomatic giardiasis in three patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Pediatr*. 1982;101:78-80.

López-Granados E, Pérez de Diego R, Ferreira Cerdán A, Fontán Casariego G, García Rodríguez MC. A genotype-phenotype correlation study in a group of 54 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:690-7.

Lopez-Herrera G, Berron-Ruiz L, Mogica-Martinez D, Espinosa-Rosales F, Santos-Argumedo L. Characterization of Bruton's tyrosine kinase mutations in Mexican patients with X-linked agammaglobulinemia. *Mol Immunol*. 2008;45:1094-8.

Mano H, Ishikawa F, Nishida J, Hirai H, Takaku F. A novel protein-tyrosine kinase, tec, is preferentially expressed in liver. *Oncogene*. 1990;5:1781-6.

Maródi L, Notarangelo LD. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:851-61.

Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L, Ersoy F, Campana D, Conley ME. Mutations in Iga (CD79a) result in a complete block in B cell development. *J Clin Invest*. 1999a;104:1115-21.

Minegishi Y, Coustan-Smith E, Wang YH, Cooper MD, Campana D, Conley ME. Mutations in the human $\lambda 5/14.1$ gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J Exp Med*. 1998;187:71-7.

Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E, Lederman HM, Pappu R, Campana D, et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science*. 1999b;286:1954-7.

Mohamed AJ, Nore BF, Christensson B, Smith CI. Signalling of Bruton's tyrosine kinase, Btk. *Scand J Immunol*. 1999;49:113-8.

Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev*. 2009; 228:58-73.

Moin M, Aghamohammadi A, Farhoudi A, Pourpak Z, Rezaei N, Movahedi M, et al. X-linked agammaglobulinemia: a survey of 33 Iranian patients. *Immunol Invest*. 2004;33:81-93.

Nisitani S, Satterthwaite AB, Akashi K, Weissman IL, Witte ON, Wahl MI. Posttranscriptional regulation of Bruton's tyrosine kinase expression in antigen receptor-stimulated splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:2737-42.

Nore BF, Vargas L, Mohamed AJ, Brandén LJ, Bäckesjö CM, Islam TC, et al. Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur J Immunol*. 2000;30:145-54.

Ochs HD, Smith CI. X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. *Medicine (Baltimore)*. 1996;75:287-99.

Okoh MP. Molecular and biophysical analysis of the non-catalytic PH, TH, SH3 and SH2 domains of Bruton tyrosine kinase (Btk) protein [dissertation]. Faculty of Science of the University of Helsinki; 2002.

Oksenhendler E, Gerard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, et al. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1547-54.

Ollila J, Lappalainen I, Vihinen M. Sequence specificity in CpG mutation hotspots. *FEBS Lett*. 1996; 396:119-22.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2766-70.

Pérez de Diego R, López-Granados E, Rivera J, Ferreira A, Fontán G, Bravo J, et al. Naturally occurring Bruton's tyrosine kinase mutations have no dominant negative effect in an X-linked agammaglobulinaemia cellular model. *Clin Exp Immunol*. 2008;152:33-8.

Piirilä H, Väliäho J, Vihinen M. Immunodeficiency mutation databases (IDbases). *Hum Mutat*. 2006;27:1200-8.

Plebani A, Soresina A, Rondelli R, Amato GM, Azzari C, Cardinale F, et al. Clinical, immunological, and molecular analysis in a large cohort of patients with X-linked agammaglobulinemia: an Italian multicenter study. *Clin Immunol*. 2002;104:221-30.

Preud'Homme JL, Griscelli C, Seligmann M. Immunoglobulins on the surface of lymphocytes in fifty patients with primary immunodeficiency diseases. *Clin Immunol Immunopathol*. 1973;1:241-56.

Quartier P, Debré M, De Blic J, de Sauverzac R, Sayegh N, Jabado N, et al. Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J Pediatr*. 1999;134:589-96.

Rae J, Newburger PE, Dinanuer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, et al. X-linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *Am J Hum Genet*. 1998;62:1320-31.

Rawlings DJ, Scharenberg AM, Park H, Wahl MI, Lin S, Kato RM, et al. Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science*. 1996;271:822-5.

Riches PG. Viral infections complicating primary immunodeficiencies. *Clin Ter* 1992;140:123-9.

Rodriguez R, Matsuda M, Perisic O, Bravo J, Paul A, Jones NP, et al. Tyrosine residues in phospholipase Cgamma 2 essential for the enzyme function in B-cell signaling. *J Biol Chem*. 2001;276:47982-92.

Rohrer J, Conley ME. Transcriptional regulatory elements within the first intron of Bruton's tyrosine kinase. *Blood*. 1998;91:214-21.

Rohrer J, Minegishi Y, Richter D, Eguiguren J, Conley ME. Unusual mutations in Btk: an insertion, a duplication, an inversion and four large deletions. *Clin Immunol*. 1999;90:28-37.

Saito K, Tolia K, Saci A, Koon H, Humphries L, Scharenberg A, et al. BTK regulates PtdIns-4,5-P2 synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity*. 2003;19:669-78.

Salavoura K, Kolialexi A, Tsangaris G, Mavrou A. Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. *Anticancer Res*. 2008;28:1263-9.

Samarghitean C, Väliäho J, Vihinen M. IDR knowledge base for primary immunodeficiencies. *Immunome Res.* 2007;3:6.

Schiff C, Lemmers B, Deville A, Fougereau M, Meffre E. Autosomal primary immunodeficiencies affecting human bone marrow B-cell differentiation. *Immunol Rev.* 2000;178:91-8

Schmidt U, Boucheron N, Unger B, Ellmeier W. The role of Tec family kinases in myeloid cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;134:65-78.

Shin DM, Jo EK, Kanegane H, Futatani T, Zhao M, Song CH, et al. Transcriptional regulatory defects in the first intron of Bruton's tyrosine kinase. *Pediatr Int.* 2008;50:801-5.

Shinkai K, McCalmont TH, Leslie KS. Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clin Exp Dermatol.* 2008;33:1-9.

Sideras P, Muller S, Shiels H, Jin H, Khan WN, Nilsson L, et al. Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J Immunol.* 1994;153:5607-17.

Siegal FP, Pernis B, Kunkel HG. Lymphocytes in human immunodeficiency states: a study of membrane-associated immunoglobulins. *Eur J Immunol.* 1971;1:482-6.

Sigmon JR, Kasasbeh E, Krishnaswamy G. X-linked agammaglobulinemia diagnosed late in life: case report and review of the literature. *Clin Mol Allergy.* 2008;6:5.

Smith CIE, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol.* 1994;152:557-65.

Smith CIE, Islam TC, Mattsson PT, Mohamed AJ, Nore BF, Vihinen M. The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *Bioessays*. 2001;23:436-46.

Smith CIE, Satterthwaite A, Witte ON. X-linked agammaglobulinemia: a disease of Btk tyrosine kinase. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, editors. *Primary Immunodeficiency Diseases*. New York: Oxford Univ. Press; 2007. p. 279-303.

Stojanov S, McDermott MF. The tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: current concepts. *Expert Rev Mol Med*. 2005;7:1-18.

Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, et al. Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood*. 2004;103:185-7.

Takata M, Kurosaki T. A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. *J Exp Med*. 1996;184:31-40.

Tani SM, Wang Y, Kanegane H, Futatani T, Pinto J, Vilela MM, et al. Identification of mutations of Bruton's tyrosine kinase gene (BTK) in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat*. 2002;20:235-6.

Tao L, Boyd M, Gonye G, Malone B, Schwaber J. BTK mutations in patients with X-linked agammaglobulinemia: lack of correlation between presence of peripheral B lymphocytes and specific mutations. *Hum Mutat*. 2000;16:528-9.

Teimourian S, Nasser S, Pouladi N, Yeganeh M, Aghamohammadi A. Genotype-phenotype correlation in Bruton's tyrosine kinase deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30:679-83.

Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Faraday Soc*. 1937;33:524-31.

Tiselius A, Kabat EA. Electrophoresis of immune serum. *Science*. 1938;87:1464-77.

Tóth B, Volokha A, Mihas A, Pac M, Bernatowska E, Kondratenko I, et al. Genetic and demographic features of X-linked agammaglobulinemia in Eastern and Central Europe: a cohort study. *Mol Immunol*. 2009;46:2140-6.

Tran H, Nourse J, Hall S, Green M, Griffiths L, Gandhi MK. Immunodeficiency-associated lymphomas. *Blood Rev*. 2008;22:261-81.

Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*. 1993;72:279-90.

Tuchman M, Matsuda I, Munnich A, Malcolm S, Strautnieks S, Briede T. Proportions of spontaneous mutations in males and females with ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Med Genet*. 1995;55:67-70.

Usui K, Sasahara Y, Tazawa R, Hagiwara K, Tsukada S, Miyawaki T, et al. Recurrent pneumonia with mild hypogammaglobulinemia diagnosed as X-linked agammaglobulinemia in adults. *Respir Res*. 2001;2:188-92.

Väliäho J, Smith CI, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat*. 2006; 27:1209-17.

van Zelm MC, Geertsema C, Nieuwenhuis N, de Ridder D, Conley ME, Claudine Schiff, et al. Gross deletions involving IGHM, BTK, or Artemis: a model for genomic lesions mediated by transposable elements. *Am J Hum Genet*. 2008;82:320-32.

Vetrie D, Vorechovský I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. 1993;361:226-33.

Vihinen M, Belohradsky BH, Haire RN, Holinski-Feder E, Kwan SP, Lappalainen I, et al. BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Nucleic Acids Res.* 1997a;25:166-71.

Vihinen M, Kwan SP, Lester T, Ochs HD, Resnick I, Väliäho J, et al. Mutations of the human BTK gene coding for bruton tyrosine kinase in X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat.* 1999;13:280-5.

Vihinen M, Nore BF, Mattsson PT, Bäckesjö CM, Nars M, Koutaniemi S, et al. Missense mutations affecting a conserved cysteine pair in the TH domain of Btk. *FEBS Lett.* 1997b;413:205-10.

Vihinen M, Vetrie D, Maniar HS, Ochs HD, Zhu Q, Vorechovský I, et al. Structural basis for chromosome X-linked agammaglobulinemia: a tyrosine kinase disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:12803-7.

Vorechovský I, Vihinen M, de Saint Basile G, Honsová S, Hammarström L, Müller S, et al. DNA-based mutation analysis of Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Hum Mol Genet.* 1995;4:51-8.

Wall RL, Saslaw S. Adult agammaglobulinemia. *AMA Arch Intern Med.* 1955;95:33-6.

Wang Y, Kanegane H, Sanal O, Tezcan I, Ersoy F, Futatani T, et al. Novel Iga (CD79a) gene mutation in a Turkish patient with B cell-deficient agammaglobulinemia. *Am J Med Genet.* 2002;108:333-6.

Winkelstein JA, Marino MC, Lederman HM, Jones SM, Sullivan K, Burks AW, et al. X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Medicine.* 2006;85:193-202.

Yel L, Minegishi Y, Coustan-Smith E, Buckley RH, Trubel H, Pachman LM, et al. Mutations in the mu heavy chain gene in patients with agammaglobulinemia. N Engl J Med. 1996;335:1486-93.

Zelazco M, Carneiro-Sampaio M, Cornejo de Luigi M, Garcia de Olarte D, Porras Madrigal O, Berrón Perez R, et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: First report from eight countries participating in the LAGID. J Clin Immunol. 1998;18:161-6.

ANEXO



CEP, 22/07/08.
(PARECER CEP: Nº 759/2005)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA EM PACIENTES COM AGAMGLOBULINEMIA LIGADA AO X E IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL FRENTE À ANTIGENOS VACINAIS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maraísa Centeville/Maria Marluce dos Santos Vilela

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o projeto intitulado “ATIVIDADE CITOTÓXICA DE NK E PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T PARA BCG EM PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL (ICV) AGAMGLOBULINEMIA LIGADA AO X (ALX)”, sob responsabilidade da Profª. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de julho de 2008.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br