



ARTIGO DE REVISÃO

Caracterização genético-molecular no diagnóstico das imunodeficiências primárias[☆]

Gesmar Rodrigues Silva Segundo^{ID}

Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Pediatria, Uberlândia, MG, Brasil

Recebido em 23 de setembro de 2020; aceito em 25 de setembro de 2020

PALAVRAS-CHAVE

Doenças da imunodeficiência primária;
Testes genéticos;
Sequenciamento completo do exoma;
Sequenciamento completo do genoma

Resumo

Objetivos: Resgatar conceitos de genética médica necessários para o entendimento dos avanços na caracterização genético-molecular das imunodeficiências primárias, como suporte na compreensão e na interpretação adequada de seus resultados.

Fonte de dados: Revisão não sistemática da literatura, com busca de artigos desde 2000 no PubMed com os termos “genetic evaluation” OR “whole exome sequence” ou “whole genome sequence” OR “next generation sequence” AND “immunologic deficiency syndromes” OR “immune deficiency disease” ou “imune deficiency” NOT “HIV”.

Síntese dos dados: O conhecimento da genética médica é essencial para a compreensão dos princípios de hereditariedade e padrões de herança das doenças, tipos de variantes genéticas, formas de sequenciamento genético e a interpretação de seus resultados. A avaliação clínica e imunofenotípica de cada paciente é fundamental para a correlação com as variantes genéticas observadas no estudo genético de pacientes com imunodeficiências primárias. A discussão de benefícios e limitações dos testes genéticos deve sempre pautar a realização dos testes genéticos.

Conclusões: Há muitos benefícios evidentes da análise genética, como o diagnóstico definitivo da doença, o aconselhamento genético familiar e a possibilidade de um manejo mais adequado e preciso. Custo, acesso e interpretação dos resultados dos exames genéticos são limitações que demandam contínuas melhorias. A compreensão dos benefícios e limites das diversas metodologias de avaliação genética relacionadas às imunodeficiências primárias é fundamental para a obtenção de resultados mais efetivos do sequenciamento.

© 2020 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

DOI se refere ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2020.09.007>

*Como citar este artigo: Segundo GR. Genetic-molecular characterization in the diagnosis of primary immunodeficiencies. J Pediatr 2021;97(S1):3-9.

E-mail: gesmar@famed.ufu.br

2255-5536/© 2020 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

As imunodeficiências primárias (IDP) são doenças causadas por mutações monogênicas da linha germinativa de genes relacionados ao sistema imunológico que resultam em perda de expressão e perda de função (LOF [*loss of function*] amórfico ou hipomórfico) ou ganho de função (GOF [*gain of function*] hiper-mórfico) da proteína codificada. As IDP, também recentemente classificadas como erros inatos da imunidade (EII), manifestam-se com maior suscetibilidade a doenças infecciosas, autoimunidade, doenças autoinflamatórias, alergias e/ou doenças malignas.^{1,2}

As IDP eram consideradas doenças raras, com prevalência estimada entre 1 em 10.000 a 1 em 50.000 nascidos vivos. Todavia, os recentes avanços nas plataformas de estudo genético e sua interface com o conhecimento imunológico tornaram possível um maior entendimento da imunogenética, que culminou com a descoberta de genes causadores de IDP já conhecidos fenotipicamente e de muitas outras IDP novas.^{3,4} Nesse sentido, estudos mais recentes têm demonstrado que as IDP são muito mais frequentes que previamente estimadas, e que cerca de 1% da população apresenta alguma forma de IDP quando todos os tipos e variações são considerados.^{5,6}

Esse grande avanço do conhecimento das IDP ocorreu em paralelo ao Projeto Genoma Humano, com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de DNA de próxima geração (NGS, de *next sequencing generation*), que possibilitaram o estudo de um grande número de genes ao mesmo tempo, inclusive o de todo o exoma ou mesmo de todo o genoma humano. Essas plataformas de sequenciamento genético são responsáveis pela geração de um banco de dados massivo; então, houve a necessidade de desenvolver plataformas de análise computacional para que todos esses dados gerados pudessem ser analisados de maneira adequada e cada vez mais rápida. Isso vem sendo nomeado de bioinformática ou biocomputação, especialidade que une os conhecimentos de biologia e informática em alto padrão. Em outras palavras, essas novas plataformas levaram a um enorme salto na identificação e no diagnóstico de defeitos do sistema imunológico, antes inconclusivos.^{3,7}

A União Internacional das Sociedades de Imunologia Clínica (IUIS), com o objetivo de monitorar, acompanhar e catalogar as descobertas recentes publicadas na literatura especializada, montou uma equipe médica altamente qualificada, que tem organizado publicações bianuais para o conhecimento de todos os avanços, novas doenças e genes envolvidos no campo das IDP. A publicação mais recente, do início de 2020, traz um aumento dessas doenças imunológicas para 406, com 430 defeitos genéticos conhecidos identificados como causadores dessas condições.¹

O objetivo deste artigo de revisão é resgatar conceitos de genética médica necessários para o entendimento dos avanços na caracterização genético-molecular das IDP, como suporte para auxiliar na compreensão das formas de avaliações genéticas disponíveis atualmente e na interpretação de seus resultados, bem como na importância de conhecimento médico para a realização da correlação clínica com os achados encontrados.

Recordando conceitos básicos de genética médica

Os conceitos básicos de genética são essenciais para o entendimento amplo da hereditariedade relacionada às IDP e ainda à sua fisiopatologia. Inicialmente, vale lembrar que o ser humano tem 23 pares de cromossomos; um par determina o gênero e é chamado de cromossomo sexual, enquanto os outros 22 pares de cromossomos são denominados autossômicos e neles estão contidos os genes, responsáveis por todo nosso arcabouço estrutural e funcional. O material genético é transmitido para cada indivíduo em duas partes, uma materna e outra paterna, conhecidas por alelos materno e alelo paterno dentro de cada gene.^{8,9}

Cada gene é formado por regiões conhecidas como exons, responsáveis pela transcrição gênica, e por introns, regiões que apresentam função estrutural e suporte do DNA, que se alternam pelo gene. No processo de transcrição, apenas o conteúdo dos exons é utilizado para a formação do RNA mensageiro por meio de um rearranjo estrutural do DNA. O material genético presente nos exons e introns é formado por bases nitrogenadas, conhecidas por adenina, timina, guanina e citosina, que se repetem milhões de vezes em nosso DNA. Cada conjunto de sequência de três bases nitrogenadas localizadas nos exons é denominado de códon e leva a colocação de um aminoácido na proteína formada ao final pelo gene. Essa sequência de pares de bases é conservada na maioria dos indivíduos; entretanto, algumas regiões podem apresentar alterações sem prejuízo ao produto proteico final, conhecidas por variantes genéticas. Essas alterações são encontradas em proporções diferentes na população e podem ser acessadas em bases de dados genéticos do genoma humano.^{8,9}

Entretanto, alguns erros nessa sequência de pares de bases podem levar à mudança em um aminoácido essencial para alguma função da proteína, o que ocasiona a perda de sua função (LoF) ou uma atividade excessiva da mesma (GoF). Outras vezes, essas mudanças podem levar à formação de um códon de parada, responsável por interromper a transcrição antes da formação total da RNAm, o que leva a uma parada precoce da formação da proteína e, conseqüentemente, de sua estabilidade e função, tornando-a muitas vezes indetectável. Outros erros nessa sequência das bases nitrogenadas podem ocorrer, como inserções ou deleções pequenas, que mudam toda a sequência de códons a partir da alteração e, conseqüentemente, toda a estrutura e função da proteína formada. Nessas situações, essas mudanças nas bases nitrogenadas são chamadas de variantes ou mutações patogênicas.⁹

Outro conceito central em genética médica é o de padrão de hereditariedade, parte importante da história familiar dos pacientes com suspeita de IDP e fundamental para a realização de aconselhamento genético. O padrão autossômico recessivo (AR) é aquele em que um determinado fenótipo é expresso quando os dois alelos de um determinado gene se encontram alterados. Esse é o padrão observado na maioria das IDP e quase sempre está relacionado com a perda de função daquele gene. No padrão AR, as variantes genéticas patogênicas podem ser semelhantes nos dois alelos (ditas em homozigose) ou cada alelo pode ter uma variante genética distinta que leve à perda de função do mesmo (apresentação em heterozigose composta).^{1,2}

No padrão autossômico dominante (AD), um determinado fe-nótipo clínico é expresso por alteração em apenas um dos alelos que compõem determinado gene. Ele pode ocorrer de maneira familiar, ou seja, um dos genitores apresenta uma alteração semelhante, ou por mutações *de novo*, que ocorrem nos gametas e são transmitidas diretamente aos descendentes, mesmo que os genitores não apresentem a variante genética. Esse padrão ocorre em várias IDP, como na síndrome da hiper-IgE, na haploinsuficiência de CTLA4, na APDS, entre outras. A herança ligada ao sexo ou a herança ligada ao X é relacionada a genes presentes na parte não homóloga dos cromossomos sexuais – ou seja, genes presentes no cromossomo X que não têm correspondentes no cromossomo Y. Como os indivíduos do gênero masculino apresentam apenas um cromossomo X e essa região não homóloga não tem alelos, eles são chamados hemizigóticos. Algumas das imunodeficiências clássicas apresentam esse padrão de herança, como a agamaglobulinemia ligada ao X (XLA), a síndrome de Wiskott Aldrich, o SCID por deficiência da cadeia gama-comum, DGC ligado ao X, o IPEX, entre outros.^{1,2}

A compreensão das noções básicas de genética são primordiais para entender a história familiar dos pacientes com IDP e para a interpretação adequada dos laudos genéticos que solicitamos no dia a dia, e de como devem ser realizados os aconselhamentos genéticos em cada caso.

Variantes genéticas

O sequenciamento genético analisa os pares de bases nitrogenadas presentes no DNA avaliado, que são comparados com as bases de dados montadas a partir do Projeto Genoma Humano, hoje são disponíveis com livre acesso em sua maior parte. A variação genética é a diferença nas sequências de DNA entre os indivíduos de uma população, e ocorre nas células germinativas – ou seja, espermatozoides e óvulos – e também nas células somáticas. Apenas a variação que surge nas células germinativas pode ser herdada de um indivíduo para outro, o que afeta a dinâmica da população e, em última análise, a evolução.¹⁰

As mutações são a fonte original da variação genética. Uma mutação é uma alteração permanente em uma sequência de DNA. Mutações *de novo* (novas) ocorrem quando há um erro durante a replicação do DNA que não é corrigido pelas enzimas de reparo; assim, esse erro é copiado e fixado no DNA. As mutações podem ser neutras para o organismo; em algumas situações, podem ser benéficas, e outras vezes deletérias, o que pode levar a doenças clinicamente evidenciáveis (patogênicas). A recombinação é outra fonte importante de variação genética. Cada indivíduo apresenta um mistura de material genético de seus pais que ocorre durante a recombinação, quando as fitas homólogas de DNA se alinham e se cruzam e podem criar novas combinações de variantes nas células germinativas filhas.¹⁰

O termo variante genética é utilizado para definir as regiões específicas do genoma que diferem em relação ao genoma presente nas bases de dados. As variantes podem ser nomeadas de acordo com o tipo de troca e a consequente alteração promovida por essa mudança.

- Variante silenciosa: ocorre a troca pontual de uma base nitrogenada por outra que não altera o códon, mas não o aminoácido codificado – ou seja, a proteína permanece sem nenhuma alteração. Para isso, é importante lembrar que diversos aminoácidos podem ser codificados por diferentes sequências de bases nitrogenadas. Em geral, essas variantes

não acarretam problemas para os pacientes, e são consideradas benignas.

- Variante do tipo *sense*: ocorre a troca pontual de uma base nitrogenada por outra que altera a codificação do aminoácido naquela posição. A proteína sofre uma mudança em sua estrutura linear, que pode impactar ou não em sua estabilidade e função. São necessários estudos funcionais para comprovar a alteração ou não da função daquela proteína.
- Variante do tipo *non sense*: ocorre a troca pontual de uma base nitrogenada que altera o códon do aminoácido para um códon de parada de tradução, conhecido por *stop codon*. A partir do ponto da troca, nenhum aminoácido é acrescentado e, na maioria das vezes, a proteína formada é instável e/ou disfuncional.
- Variante do tipo *frameshift*: nesse grupo de variantes ocorrem inserções ou deleções de bases nitrogenadas que mudam toda a sequência de códons subjacente, ou seja, mudam os aminoácidos que serão acrescentados a partir daquele ponto gerando uma proteína completamente diferente. São também denominadas de INDEL (inserção e/ou deleção). Na sua maioria, são instáveis e/ou disfuncionais.
- Variante do tipo *splicing*: são variantes que promovem alteração no rearranjo gênico entre exons e introns para a formação do RNAm. Em geral, promovem a formação de RNA mensageiros alterados e, conseqüentemente, proteínas alteradas. As variantes nas bases 1 e 2 na região de transição entre os exons e introns são as mais associadas com esse tipo de alteração. Em sua maioria, essas proteínas formadas de maneira alterada são instáveis e/ou disfuncionais

Inicialmente, para um entendimento universal, as variantes detectadas em um sequenciamento genético devem ser reportadas seguindo as regras de nomenclatura internacionais indicadas pelo *Human Genome Variation Society* (HGVS). A nomenclatura também tem importância nos casos em que a variante precisa ser pesquisada nos familiares do paciente – isso assegura que a mesma variante detectada anteriormente esteja sendo avaliada e evita um resultado falso-negativo.¹¹

Nos estudos de genética humana, as variantes genéticas são classificadas ainda de acordo com o efeito induzido pela modificação do genoma na função daquele gene e, conseqüentemente, da possibilidade de ser causa ou não de doenças nos indivíduos. Assim, as variantes podem receber as seguintes nomenclaturas: patogênica, provavelmente patogênica, variante de significado incerto (VUS), provavelmente benigna e benigna. As variantes patogênicas são aquelas em que a presença de alteração da função do gene estudado e a doença clínica do paciente já foram estudadas e confirmadas laboratorial e/ou clinicamente. As variantes provavelmente patogênicas são as que se encontram em genes reconhecidamente causadores de determinada doença que esteja em suspeição e o tipo de variante seja altamente indicativo de perda de função do gene, como aquelas do tipo INDEL, *stop codon* e *splicing*. Por outro lado, variantes benignas são aquelas estudadas e confirmadas clínica e/ou laboratorialmente em que não há perda da função do gene em decorrência da variação. São consideradas benignas, ainda, as variantes com frequência elevada na população, em geral mais de 1%, o que não ocorreria se fossem patogênicas. As variantes provavelmente benignas são aquelas que não se espera nenhuma patogenicidade (p.ex., variantes silenciosas e/ou intrônicas), mas que não preenchem todos os critérios para serem classificadas como benignas.

O grupo de variantes de maior dificuldade é de significado incerto – aquelas cujas evidências científicas disponíveis não possibilitam concluir que se trate de variante benigna ou patogênica. Geralmente, são variantes raras, ausentes ou encontradas em baixa frequência nos bancos de dados genéticos populacionais, sem relatos anteriores e cujas avaliações de programas computacionais de modificação da função proteica apresentem resultados conflitantes (*in silico*). São variantes que necessitariam de uma pesquisa laboratorial para verificar o efeito dessa mutação no resultado final e na função da proteína a ser formada, o que não podemos realizar na prática clínica por demandar laboratórios altamente especializados.¹¹

Técnicas de sequenciamento genético

O sequenciamento genético é o estudo da sequência dos pares de base nitrogenadas que formam nosso DNA. No caso da investigação de doenças, procuramos alterações nessa sequência que interfiram na formação do RNA mensageiro e, portanto, no produto final dos genes – as proteínas, que exercem diversas funções em nosso corpo. Ao solicitarmos uma avaliação genética, é importante saber o que procuramos, uma vez que há muitos testes genéticos disponíveis com diferentes metodologias, objetivos e número de genes que podem ser estudados. Assim, optamos por fazer uma pequena revisão direcionada àqueles que trabalham com a parte clínica das opções de exames genéticos disponíveis hoje para a ajuda no diagnóstico dos pacientes, disponíveis para os pacientes com IDP e também para outras doenças.¹²

Técnica de Sanger

A técnica de Sanger foi a primeira a ser descrita e ainda é amplamente utilizada em diversos estudos genéticos básicos, mas perdeu muito espaço na genética clínica nos últimos anos. O sequenciamento genético por essa técnica é manual, realizado em pequenos pedaços, em sua maioria exon por exon de cada gene. Por essas características, apresenta elevado custo por gene estudado, não pode ser automatizada e é muito trabalhosa. Em investigações das IDP em que vários genes podem levar a sintomas similares, torna-se um procedimento de custo elevado e de maior tempo de execução. Ainda é uma técnica bastante útil e realizada para situações específicas, como no estudo de genes que apresentem pseudogenes ou para uma confirmação em situações conflitantes com o uso das técnicas de NGS. Também pode ser útil quando se suspeita de doenças causadas por apenas um gene.¹³

Sequenciamento de DNA de próxima geração, ou *next sequencing generation* (NGS)

O NGS foi idealizado a partir da necessidade de automatização do processo do sequenciamento genético, possibilitando que um grande volume de genes pudessem ser analisados ao mesmo tempo. Nessa técnica, são utilizadas muitas estruturas padrões que se ligam a pedaços do DNA, conhecidos como *primers*, amplificando-os e tornando possível sua análise. Nesse processo, os dados das bases nitrogenadas são convertidos em sequências binárias, e o resultado do processo é analisado de modo computacional

com um grande volume de dados. Assim, esse processo demanda de investimento em bioinformática, além do laboratório. O NGS nos possibilita diferentes níveis de estudos, de acordo com o interesse da investigação genética em curso, e tem sido extremamente útil na avaliação das imunodeficiências primárias.¹³

Sequenciamento alvo ou painéis genéticos

Os sequenciamentos alvo, também conhecidos por painéis genéticos, são hoje amplamente utilizados pela maioria dos laboratórios de genética clínica. Nessa forma de sequenciamento, podemos estudar grupos de genes que estão associados a manifestações clínicas dos pacientes, usados para quase todas as áreas da Medicina. Por ter um número limitado de genes, o estudo em painéis apresenta menor custo, pela redução do material gasto e uma análise de bioinformática menor.¹⁴ Outra vantagem dessa técnica é a possibilidade de realização de uma análise quantitativa de amplificação dos genes, que possibilita a verificação da presença de grandes deleções/inserções comuns como causa genética de vários EI (DOCK8, LRBA, por exemplo), análise essa conhecida como *copy number variation* (CNV).^{15,16} Também é importante lembrar que a maioria dos painéis estuda apenas os exons desses genes. Os painéis genéticos para IDP podem perder genes que não estão contidos neles, bem como genes localizados em regiões não codificantes, ou seja, intrônicas.¹³ Para os médicos em atividade clínica, é importante saber que o laboratório de genética monta um painel diferente e, algumas vezes, o(s) gene(s) que necessitaria(m) de investigação pode(m) não estar presente(s) naquele painel. Antes de realizar um pedido, é importante conhecer o painel da instituição que realizará o exame e especialmente saber se ele contempla os genes que se deseja analisar.^{12,13}

Whole exoma sequencing (WES)

O WES sequencia os exons de todos os genes do nosso DNA, o que produz uma enorme quantidade de dados para uma análise de bioinformática. De modo simples, uma grande vantagem desse exame seria a possibilidade de avaliar todos os genes ao mesmo tempo. Entretanto, deve-se levar em consideração o alto custo do teste, muito mais elevado do que a realização de um determinado painel, a grande quantidade de variantes que podem ser encontradas relacionadas a outros processos do nosso corpo, que devem ser avaliadas a partir do resultado, e, ainda, uma redução na capacidade de avaliar os CNV, descritos anteriormente.¹²

Atualmente, o WES encontra-se disponível na maioria dos laboratórios de genética clínica, mas do ponto de vista prático e econômico, tem sido utilizado principalmente em pesquisas. Alguns laboratórios clínicos rodam apenas WES; entretanto, fazem a análise de dados de acordo com a solicitação médica, reduzindo custo e tempo para a análise de dados. A crescente melhoria no processo de análise de bioinformática, a presença de um banco de dados internacionais cada vez maior, alimentado pelos sequenciamentos de diferentes populações ao redor do mundo e, ainda, uma queda nos preços dos materiais utilizados podem nos levar, nos próximos anos, a um custo muito próximo dos painéis genéticos, tornando o WES mais acessível do ponto de vista clínico.¹³

Whole genome sequencing (WGS)

O WGS é o sequenciamento de todo o DNA, incluindo os exons e introns de todos os genes. É uma técnica bastante utilizada para a caracterização de uma espécie e suas variantes. Tem sido muito empregada durante a pandemia de COVID-19 para a caracterização dos vírus em diferentes regiões, colaborando no entendimento de mudanças que vêm ocorrendo com o SARS-CoV-2 durante a pandemia. Para o estudo de EI, tem sido utilizado para a investigação de novas doenças. Esse painel tem como desvantagem o custo elevado, além da necessidade de um amplo aparato de bioinformática para a realização da análise de dados — teremos bilhões de letras para serem analisadas para cada indivíduo, na tentativa de encontrar um erro nessa sequência que não seja apenas uma variação do normal.¹³

Hibridização e *microarray*

A variação do número de cópias, do inglês *copy number variation* (CNV), considera o número de cópias de um determinado gene que varia de um indivíduo para outro. O Projeto Genoma Humano demonstrou que o genoma experimenta ganhos e perdas de material genético, e pode associar-se a patologias no ser humano. Em termos práticos, essas variações podem compreender grandes deleções que reduziriam o número de cópias normalmente amplificado em um sequenciamento, uma vez que amplificaria somente um alelo.¹⁷ Apesar do desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para a detecção desses CNVs nos NGS, o padrão ouro para o diagnóstico genético continua sendo a hibridização genômica por *microarray*. Na hibridização genômica comparativa de matriz (CGH), a hibridização de DNA do paciente com um *microarray* de sondas de oligonucleotídeos de DNA é comparada com a hibridização de DNA de referência competitiva com as sondas no mesmo ensaio, e as sondas geralmente são projetadas especificamente para a detecção de CNVs.¹⁸

Genética nos erros inatos da imunidade

Como já dissemos, o avanço no campo das tecnologias do sequenciamento genético foram fundamentais para uma compreensão melhor das IDP. O avanço científico gerado por todos esses estudos vem sendo acompanhado de benefícios significativos na área clínica, uma vez que, ao chegarmos ao diagnóstico molecular, podemos entender melhor a fisiopatologia da doença e a correlação com o quadro clínico dos pacientes. Em muitos casos, esse entendimento nos proporciona opções de tratamento específicas para cada quadro, dentro do conceito de Medicina de precisão. Entretanto, da bancada até a beira do leito, ou melhor, dos consultórios, existem desafios a serem superados.

Atualmente, mais de 430 genes já foram descritos como causas monogênicas de imunodeficiências primárias, e esse número deve crescer ainda mais nos próximos anos. A interface entre a imunologia e a genética se tornou extremamente produtiva em razão da necessidade de conhecimento das me-

todologias de sequenciamento genético por parte dos profissionais médicos que atendem pacientes com IDP, pois só assim haverá o entendimento da grande diferença de exames em genética e, ainda, da grande diferença de custo desses sequenciamentos em diferentes laboratórios. Com base nessa interface, os profissionais frente a um paciente com suspeita de IDP devem realizar um avaliação clínica e laboratorial de acordo com suas suspeitas clínicas e, se de acordo com seus achados iniciais a investigação genética puder proporcionar uma confirmação ou exclusão diagnóstica, ou proporcionar a possibilidade de tratamentos específicos ou mesmo o acesso a esses tratamentos, devemos pensar no sequenciamento para o paciente.¹³

Para ressaltar a importância do sequenciamento genético no campo das IDP, um estudo recente verificou que em 60 (55%) de 110 famílias houve uma mudança no diagnóstico da sua IDP inicial baseado nos dados clínicos de imunofenotipagem após o diagnóstico molecular realizado por WES. O mesmo estudo também verificou que em 25% dos casos, ou seja, em 26 famílias dessas 110, houve uma substancial modificação no manejo dos pacientes com IDP; pelo menos 14 pacientes foram submetidos ao transplante de células hematopoiéticas após os achados da investigação genética com WES.¹⁹ Além da indicação do TMO para um grande número de IDP, o diagnóstico molecular pode direcionar um tratamento mais preciso de acordo com a via imunológica afetada, como por exemplo o uso de abatacepte nas insuficiências de CTLA4 e LRBA,^{20,21} o uso de inibidores de *janus associate kinase*/STAT nos quadros de ganho de função de STAT1 e STAT3,^{22,23} o uso de inibidores da via AKT-mTOR nos pacientes com alterações da via PI3K com aumento dessa atividade,²⁴ o uso de antagonistas de IL-1 em pacientes com quadro de algumas doenças autoinflamatórias,²⁵ interferon alfa para defeitos da via TLR3,²⁶ entre outros.

Por outro lado, o mesmo estudo citado anteriormente não encontrou alterações genéticas que pudessem confirmar o diagnóstico molecular de IDP em 60% das 278 famílias participantes.²⁶ A presença de regiões de genes sem uma cobertura adequada, incluindo regiões reguladoras e polyA, mosaicismos em baixo grau, pequenas CNV e INDEL, mutações intrônicas e a presença de pseudogenes podem estar associadas ao não encontro de variantes nesses casos.^{26,27} Como exemplo, as plataformas de WES mais utilizadas atualmente apresentam para genes presentes na lista da IUIS uma cobertura menor que 100% em 94 genes, menor que 99% em pelo menos 26 genes e cinco com cobertura menor que 90% (IKBKB, NCF1, TACI, UNC93B1 e TBX1) — em outras palavras, parte dos genes não são sequenciadas e analisadas e, portanto, variantes genéticas nessas regiões não são identificadas.²⁷

A **tabela 1** mostra uma série de genes presentes na lista da IUIS que apresentam mutações intrônicas patogênicas ou provavelmente “ADA” em la página 5patogênicas já descritas na base de dados ClinVar. A **tabela 2** traz genes presentes na lista da IUIS com pelo menos um pseudogene, que podem interferir na adequada interpretação da sequência dos mesmos.

Pelo número de citações nesta revisão, é importante mencionar que a IUIS traz uma revisão de todos os novos genes associados às IDP a cada dois anos, bem como a expansão fenotípica para defeitos genéticos já caracterizados anteriormente, e são uma fonte essencial para a consulta no dia a dia junto aos pacientes e na solicitação das avaliações genéticas.¹

Tabela 1 Genes relacionados a imunodeficiências primárias presentes na lista da União Internacional das Sociedades de Imunologia Clínica (IUIS) com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas localizadas em regiões não exônicas listadas no ClinVar

ADA	G6PD	NOD2	TA2
ADAR	GATA2	OSTM1	TCN2
ATM	GIN51	PMS2	TERC
BTK	IKBKG	PNP	TERT
CARD14	IL10	POLA1	THBD
RM RP	IL2RG	POLE	TPP1
CD30	IL36RN	PRKDC	TRAC
CFH	KMT2D	PTEN	TRNT1
CFTR	MSH6	RNASEH2B	TT37
CHD7	MVK	SBDS	TTC7A
CTLA4	NBN	SERPING1	UNC13D
CYBB	NCF1	SH2D1A	VPS13B
DNMT3B	NF κ b	SPINK5	WAS
ELANE	NLP12	STAT2	ZAP70

Fonte: Adaptada de Henrickson et al.²⁷

Tabela 2 Genes relacionados a imunodeficiências primárias presentes na lista da União Internacional das Sociedades de Imunologia Clínica (IUIS) que apresentam pelo menos um pseudogene

Genes da IUIS com 1 pseudogene	C19orf40, CD46, CDCA7, CSF2Rb, DCLRE1C, FPR1, HAX1, IKBKG, ITCH, MAGT1, MSN, MTHFD1, NBAS, NCSTN, NHP2, NOP10, PIK3CD, PNP, PTEN, RANBP2, RLTPR, RLTBP2, RLTBR, RNASEH2C, RTEL1, TCF3, TMC6, ZBTB24
Genes da IUIS com mais de 1 pseudogene	ACTB, AK2, CFTR, IGLL1, NCF1, PMS2, RAC2, RNF168, RPSA, SBDS, TRNT1, UNG, XIAP

Fonte: Adaptada de Henrickson et al.²⁷

Conclusões

A avaliação genética no campo das imunodeficiências primárias trouxe um avanço sem precedentes no conhecimento e manejo dos pacientes. Na prática clínica, os benefícios são evidentes, como diagnóstico definitivo, aconselhamento genético familiar e a possibilidade de uma abordagem mais adequada e precisa, o que melhora a qualidade de vida e reduz riscos de morte e seqüela para os pacientes com IDP. Por outro lado, temos diversas barreiras que precisam ser superadas, como o custo, o acesso aos exames e a interpretação dos resultados genéticos. É necessário que médicos que acompanham pacientes com IDP possam compreender cada vez mais os benefícios e limites das diversas metodologias de avaliação genética e que possam direcionar a investigação da maneira mais adequada, de acordo com a avaliação clínica e imunofenotípica de cada paciente, aumentando assim a chance de resultados mais efetivos do sequenciamento.

Financiamento

Programa CHILDREN da Fundação Jeffrey Modell.

Conflitos de interesse

O autor declara não haver conflitos de interesse.

Referências

- Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2020;40:24-64.
- Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2018;38:96-128.
- Bucciol G, Moens L, Bosch B, Bossuyt X, Casanova JL, Puel A, et al. Lessons learned from the study of human inborn errors of innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:507-27.
- Zhang Q, Frange P, Blanche S, Casanova JL. Pathogenesis of infections in HIV-infected individuals: insights from primary immunodeficiencies. *Curr Opin Immunol.* 2017;48:122-33.
- Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, Benhsaien I, Mahlaoui N, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J Clin Immunol.* 2013;33:1-7.
- Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol.* 2007;27:497-502.
- Meyts I, Bosch B, Bolze A, Boisson B, Itan Y, Belkadi A, et al. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:957-69.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, eds. *Thompson & Thompson Genética Médica.* 8th ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan; 2016. 525 p.
- Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Mutant types. In: Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. *An Introduction to Genetic Analysis.* 7th ed. New York: W. H. Freeman; 2000.
- Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science.* 2015;349:1483-9.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405-24.
- Seleman M, Hoyos-Bachiloglu R, Geha RS, Chou J. Uses of Next-Generation Sequencing Technologies for the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol.* 2017;8:847.
- Chinn IK, Orange JS. A 2020 update on the use of genetic testing for patients with primary immunodeficiency. *Expert Rev Clin Immunol.* 2020:1-13.
- Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, Zoccolillo M, Ferradini V, Petricone D, et al. Targeted NGS Platforms for Genetic Screening and Gene Discovery in Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol.* 2019;10:316.
- Fowler A, Mahamdallie S, Ruark E, Seal S, Ramsay E, Clarke M, et al. Accurate clinical detection of exon copy number variants in a targeted NGS panel using DECoN. *Wellcome Open Res.* 2016;1:20.

16. Cacheiro P, Ordóñez-Ugalde A, Quintáns B, Piñeiro-Hermida S, Amigo J, García-Murias M, et al. Evaluating the Calling Performance of a Rare Disease NGS Panel for Single Nucleotide and Copy Number Variants. *Mol Diagn Ther.* 2017;21:303-13.
17. National Human Genome Research Institute. Copy Number Variation (CNV) [cited 22 September 2020]. Available from: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Copy-Number-Variation>
18. Wiszniewska J, Bi W, Shaw C, Stankiewicz P, Kang SH, Pursley AN, et al. Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:79-87.
19. Stray-Pedersen A, Sorte HS, Samarakoon P, Gambin T, Chinn IK, Coban Akdemir ZH, et al. Primary immunodeficiency diseases: Genomic approaches delineate heterogeneous Mendelian disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:232-45.
20. Lee S, Moon JS, Lee CR, Kim HE, Baek SM, Hwang S, et al. Abatacept alleviates severe autoimmune symptoms in a patient carrying a de novo variant in CTLA-4. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:327-30.
21. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science.* 2015;349:436-40.
22. Weinacht KG, Charbonnier LM, Alroqi F, Plant A, Qiao Q, Wu H, et al. Ruxolitinib reverses dysregulated T helper cell responses and controls autoimmunity caused by a novel signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:1629-1640.e2.
23. Wegehaupt O, Muckenhaupt T, Johnson MB, Schwab KO, Speckmann C. Ruxolitinib Controls Lymphoproliferation and Diabetes in a STAT3-GOF Patient. *J Clin Immunol.* 2020. doi: 10.1007/s10875-020-00864-w. Epub ahead of print.
24. Maccari ME, Abolhassani H, Aghamohammadi A, Aiuti A, Aleinikova O, Bangs C, et al. Disease Evolution and Response to Rapamycin in Activated Phosphoinositide 3-Kinase δ Syndrome: The European Society for Immunodeficiencies-Activated Phosphoinositide 3-Kinase δ Syndrome Registry. *Front Immunol.* 2018;9:543.
25. Bettiol A, Lopalco G, Emmi G, Cantarini L, Urban ML, Vitale A, et al. Unveiling the Efficacy, Safety, and Tolerability of Anti-Interleukin-1 Treatment in Monogenic and Multifactorial Auto-inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1898.
26. Maglione PJ, Simchoni N, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor signaling in primary immune deficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1356:1-21.
27. Henrickson SE, Butte M. What We Are Missing with PID Exomes, Including Poorly Covered Exons. *J Clin Immunol.* 2019;39:S84.