

### MISSENSE MUTATIONS IN THE COAGULATION FACTOR XII (HAGEMAN FACTOR) GENE IN HEREDITARY ANGIOEDEMA WITH NORMAL C1 INHIBITOR

Dewald G, Bork K.

*Biochem Biophys Res Commun* 2006; 19;343:1286-9.

**Introdução** – O angioedema hereditário é uma doença caracterizada por episódios recorrentes de edema cutâneo, crises de dor abdominal e obstrução das vias aéreas potencialmente fatais. Os dois tipos clássicos de angioedema hereditário – tipo 1 e tipo 2 – são ambos causados por mutações no gene que codifica o C1-inibidor; associando-se o tipo 1 a um défice quantitativo e o tipo 2 a um défice funcional desta protease.

Recentemente foi reportado um novo tipo de angioedema hereditário com sintomatologia semelhante, mas em que não se documentam alterações quantitativas ou funcionais do C1-inibidor. Com raras exceções, todos os pacientes descritos são do sexo feminino, constituindo a exposição a estrógenos um importante factor precipitante. A base molecular desta entidade não foi ainda identificada. Os autores colocaram a hipótese de que uma anomalia do factor XII poderia conduzir a uma activação inapropriada da cascata das cininas e, sendo assim, investigaram a presença de mutações no gene do factor XII nestes doentes.

**Material e métodos** – Foram estudados 20 doentes do sexo feminino, de naturalidade alemã mas não relacionados entre si. Todos os pacientes apresentavam: episódios de angioedema recorrente; um ou mais familiares do

sexo feminino com o mesmo diagnóstico; e doseamentos normais de C1-inibidor. Foram utilizados como controlos 145 dadores de sangue saudáveis. Os 14 exões e junções de *splicing* do gene do factor XII foram analisados através de amplificação por PCR e sequenciamento bidireccional.

**Resultados** – Foram identificadas duas mutações diferentes no exão 9, para além de várias variantes polimórficas conhecidas. Ambas as mutações se localizavam precisamente na mesma posição, a segunda posição do codão (ACG) que codifica o aminoácido 309, uma treonina. A mutação 1 (1032C→A), encontrada em 5 doentes, resulta num tripleto AAG que codifica uma lisina (Thr309Lys). A mutação 2 (1032C→G), observada apenas num doente, prediz a substituição da treonina por arginina (thr309Arg). Estas mutações não foram encontradas em nenhum dos 145 controlos saudáveis ( $p=0,0000015$ ; teste exacto de Fisher).

Foi também documentada, nas famílias destas 6 doentes, uma co-segregação desta mutação conjuntamente com o fenótipo da doença. Nestas famílias existiam 20 doentes do sexo feminino com o diagnóstico de angioedema hereditário com C1-inibidor normal, sendo todas elas heterozigóticas para as referidas mutações. Foi documentada também a mutação em duas mulheres sem manifestações de angioedema até à data. Finalmente, foi encontrada esta mutação em 8 indivíduos do sexo masculino, todos assintomáticos.

**Discussão** – O presente estudo demonstra pela primeira vez uma relação altamente significativa entre o angioedema hereditário com C1-inibidor normal e mutações do factor XII da coagulação.

O impacto estrutural e funcional desta mutação, a sua ausência em controlos saudáveis e a sua co-segregação

com o fenótipo clínico suportam a sua importância como causa da doença.

O facto de todos os doentes serem heterozigóticos para as respectivas mutações e o facto de as manifestações estarem limitadas ao sexo feminino está também de acordo com as observações clínicas prévias.

Como é sabido, o início do quadro clínico dos doentes com angioedema hereditário é muito variável, pelo que permanece possível que as duas portadoras de mutação assintomáticas, com 16 e 46 anos, respectivamente, possam ainda desenvolver sintomas.

Em relação às doentes e respectivas famílias em que esta mutação não foi encontrada, estudos futuros terão de examinar se existem mutações das regiões não codificantes do gene do factor XII ou de outros genes.

O factor XII da coagulação é uma serina protease que circula no plasma humano a uma concentração aproximada de 30µg/mL, não tendo sido realizado o seu doesamento neste estudo. As substituições de aminoácidos aqui descritas estão localizadas numa zona desta proteína mal caracterizada, rica em prolina. Esta região parece desempenhar um papel na ligação do factor XII a superfícies com carga negativa. Desta forma, podemos especular que as mutações aqui descritas podem influenciar os mecanismos de activação por contacto e facilitar inapropriadamente a activação do factor XII.

**Comentários** – O angioedema hereditário, entidade descrita pela primeira vez em 1888 por William Osler, caracteriza-se pela existência de défice quantitativo ou funcional de C1-inibidor, determinado geneticamente. Estão até à data descritas cerca de 150 mutações do gene que codifica o C1-inibidor.

Em 2000, Bork e Binkley descreveram um terceiro tipo de angioedema hereditário, designado por angioedema hereditário dependente de estrogénios. A base genética e molecular desta entidade não havia sido ainda identificada, sendo esta a primeira descrição de uma associação entre uma mutação genética e este tipo de angioedema. O facto de estas mutações terem sido documentadas em menos de metade das doentes reforça, no entanto, a heteroge-

neidade genética desta entidade e o longo caminho que falta ainda percorrer até a sua completa compreensão.

Um outro aspecto que importa salientar é a relação entre este tipo de angioedema e o sexo. Embora já tenham sido descritos alguns casos de angioedema hereditário com C1-inibidor normal em indivíduos do sexo masculino, neste estudo foram encontrados 8 indivíduos do sexo masculino que apresentavam a mutação descrita mas sem qualquer sintomatologia, o que, uma vez mais, salienta o carácter multifactorial e possivelmente multigénico deste tipo de angioedema.

Não obstante, espera-se que os presentes resultados tenham um impacto a curto prazo na melhor caracterização desta entidade, com eventuais implicações no seu diagnóstico e terapêutica a médio prazo. Estudos posteriores deverão investigar as consequências funcionais das mutações descritas, de forma a elucidar, entre outros aspectos, a etiologia da influência hormonal na expressão clínica da doença.

Rodrigo Alves

## FEATURES OF SEVERE ASTHMA IN SCHOOL-AGE CHILDREN: ATOPY AND INCREASED EXHALED NITRIC OXIDE

Fitzpatrick AM, Gaston BM, Erzurum SC, Teague WG.

*J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1218-25.

**Introdução** – A asma grave, frequentemente designada asma difícil de tratar, é identificável na infância e está associada a deficiente controlo dos sintomas, apesar do tratamento com corticosteróides inalados (CIs). As características clínicas que diferenciam asma grave de asma ligeira a moderada nas crianças estão ainda pouco definidas.

**Objectivo** – Identificar as características de asma grave *versus* ligeira a moderada em crianças em idade escolar, usando métodos não invasivos de avaliação da função pulmonar, atopia e inflamação das vias aéreas.

**Métodos** – Foram recrutadas no período de Outubro de 2003 a Março de 2006 um total de 75 crianças com asma (6-17 anos, mediana 10 anos) observadas numa consulta especializada da Universidade de Emory, centro este incluído no *National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program*. Foram excluídas crianças com disfunção das cordas vocais, apneia obstrutiva do sono, doença nasosinusal grave ou imunodeficiência conhecida. Os participantes foram classificados como tendo asma grave ou asma ligeira a moderada, de acordo com os critérios desenvolvidos pelo *National Institutes of Health/NHLBI SARP* baseado no *consensus* da *American Thoracic Society*.

A avaliação inicial incluiu, além da história clínica e de um questionário de sintomas, espirometria, avaliação dos volumes pulmonares, prova de provocação brônquica com metacolina, estudo alergológico e medição do óxido nítrico exalado (FENO). Vinte e oito doentes foram observados mensalmente durante 6 meses. Os participantes foram incluídos no subgrupo de asma grave se requeressem doses elevadas de CIs e dois ou mais critérios *minor* definidos no *consensus*.

**Resultados** – Crianças com asma grave *versus* ligeira a moderada tinham mais sintomas, maior obstrução das vias aéreas, maior reversibilidade da obstrução após broncodilação, maior encarceramento aéreo e maior grau de reactividade brônquica à metacolina. Doentes com asma grave revelaram também maiores concentrações de FENO e uma maior sensibilização a aeroalergénios. Na avaliação longitudinal durante 6 meses, a redução no VEMS e o aumento no FENO persistiram no grupo grave *versus* no ligeiro a moderado. Além disso, apesar dos ajustes da dose de CIs, a frequência de exacerbações foi significativamente superior em doentes com asma grave (83%) *versus* asma ligeira a moderada (43%).

**Discussão** – As diferenças observadas suportam a ideia de que o fenótipo de asma grave na criança tem características fisiopatológicas únicas. Contrariamente à asma grave do adulto, que parece incluir uma grande variedade de fenótipos, na criança é caracterizada por um espectro de alterações, relativamente pequeno, que incluem atopia mar-

cada e aumento do FENO. Uma questão importante e interessante é avaliar se este fenótipo mudará ao longo do tempo, ou seja, para o padrão do adulto, com obstrução fixa das vias aéreas, níveis de FENO menores e menos atopia, como sugerido no estudo ENFUMOSA. Em alternativa, terá a asma grave em adultos um maior espectro de fenótipos por inclusão de sujeitos com asma de início recente?

**Comentários** – Neste estudo houve o cuidado de na análise de alguns dados serem considerados e ajustados os efeitos que pudessem influenciar os resultados, como o mês de inclusão e sensibilização alérgica. A ideia de que existe um fenótipo de asma grave com características únicas na criança pode ser discutível, uma vez que o grupo de doentes observado pode não ser representativo da população em geral. Com efeito, as crianças foram seleccionadas num centro de referência que observa doentes provenientes de um hospital central em área urbana. Além disso, o tamanho da amostra pode ter sido insuficiente para identificar fenótipos alternativos, incluindo crianças não atópicas. Algumas das questões levantadas pelos autores revelam-se de grande pertinência. São no entanto necessários mais estudos para melhor compreender a progressão para asma grave da infância à idade adulta.

Beatriz Tavares

## OBSTRUCTIVE SLEEP APNOEA AND ORAL BREATHING IN PATIENTS FREE OF NASAL OBSTRUCTION

Koutsourelakis I, Vagiakis E, Roussos C, Zakyntinos.

*Eur Respir J* 2006, 28: 1222-1228.

**Introdução** – É bem reconhecida a associação entre a obstrução nasal, respiração oral e síndrome de apneia obstrutiva do sono (SAS). No entanto, permanece por esclarecer se a respiração oral é predominante em doentes com SAS sem obstrução nasal.

Foi objectivo deste estudo avaliar a relação entre respiração oral e SAS em doentes sem obstrução nasal.

**Metodologia** – Foram avaliados 62 doentes com roncopia associada a hipersonia diurna e/ou suspeita de apneia do sono. Foram excluídas: patologia respiratória nasal e brônquica, incluindo alergia nasal, antecedentes de cirurgia nasal, tratamento anterior de SAS, uso de medicamentos que influenciam resistência nasal (anti-histamínicos, descongestionantes, etc.), doença neuromuscular ou doença cardiovascular.

A resistência nasal foi determinada, em período vigília, na posição sentado e deitado, por rinomanometria anterior activa, de acordo com as recomendações internacionais. Valor de resistência nasal  $< 3,0 \text{ cmH}_2\text{O.L}^{-1}\text{s}$  foi considerada normal. Foram excluídos os doentes com valores de resistência nasal aumentada. Os doentes foram submetidos a estudo polissonográfico do sono. A via de respiração foi avaliada usando sensores orais e nasal.

**Resultados** – Foram excluídos 21 dos 62 doentes observados, por: resistência nasal aumentada (9), apneia central (5), sono por um período  $< 3\text{h}$  (7). Foram incluídos neste estudo os restantes 41 doentes (25 do sexo masculino, idade média  $51,3 \pm 14,5$  anos, IMC  $31,5 \pm 5,7 \text{ kg/m}^2$ ). SAS foi diagnosticada em 28 doentes (“apneicos”). Os restantes 13 doentes foram considerados “roncadores”.

Os “apneicos” apresentaram uma maior percentagem de períodos de respiração oral e oro-nasal. Os períodos oral e oro-nasal correlacionaram-se positivamente com índice apneia/hipopneia (IAH) e também com a duração das apneias/hipopneias. Estavam inversamente correlacionados com a saturação de oxigénio. Os períodos oro-nasais correlacionaram-se com IMC. Os períodos de respiração oral foram independentemente relacionados com IAH ( $r^2=0,443$ ). Os períodos de respiração oro-nasal foram independentemente relacionados com IAH ( $r^2=0,736$ ) e IMC ( $r^2=0,036$ ).

**Discussão** – Os doentes “apneicos” apresentaram uma proporção aumentada de tempo de sono com respiração oral e oro-nasal, comparativamente aos doentes “roncadores”. A severidade da SAS, expresso pelo IAH, foi deter-

minante *major* do tempo de sono em que os doentes apresentaram respiração oral e oro-nasal. O IMC foi também um factor independente para o tempo de sono com respiração oro-nasal.

**Comentários** – Os autores concluem que o IAH é factor determinante dos períodos de respiração oral. Há um mecanismo fisiopatológico subjacente, pois as apneias tendem a ser seguidas por respiração oral de modo a compensar a interrupção do fluxo de ar ocorrida, ainda que estes períodos não tenham sido incluídos na análise deste estudo, pois foram considerados como parte do período contendo a apneia/hipopneia. O IMC foi também determinante do tipo de respiração predominante. Este estudo salienta a relevância clínica da respiração oral na fisiopatologia do SAS, mesmo em doentes sem obstrução nasal.

Graça Loureiro

## MUTATIONAL ANALYSIS OF HUMAN BLYS IN PATIENTS WITH COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY

Losi CG, Salzer U, Gatta R, Lougaris V *et al.*

*J Clin Immunol* 2006; 26(4):396-9.

**Introdução** – A imunodeficiência comum variável (IDCV) é entidade de apresentação clínica heterogénia que se caracteriza por defeitos na diferenciação terminal das células B em células plasmáticas provavelmente devido a defeitos na interacção entre células B e T. A descrição recente de defeitos monogénicos no ICOS e TACI, em cerca de 10% de doentes com IDCV, despertou o interesse para a possível existência na IDCV de outros defeitos génicos nas citocinas e receptores envolvidos na interacção entre as células B e T. O BlyS é uma citocina, membro da família TNF, codificada pelo gene TNFSF13b localizado no cr. 13q 32-34, expresso nos monócitos, macrófagos e células dendríticas fundamental para a proliferação e diferenciação

dos linfócitos B periféricos. Existe também sobre a forma solúvel e actua através de 3 receptores: TACI, BCMA e BAFF-R. A confirmar-se a presença de mutações no gene BlyS, este poderia ser considerado como potencial candidato a terapia génica nos doentes IDCV. O objectivo deste estudo foi avaliar o possível envolvimento de mutações do gene do BlyS na patogenia da IDCV.

**Material e métodos** – Foram avaliados 78 doentes com IDCV, não consanguíneos, com critérios de diagnóstico definidos pelo ESID/PAGID e uma média de idade de 21,7 anos (9 meses aos 66 anos). As percentagens de células B variavam entre 2 e 15%. Foram realizados a todos os doentes sucessivas técnicas de extracção de DNA, a amplificação por PCR, detecção da mutação através de DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) e análise da sequenciação directa.

**Resultados** – A análise do BlyS mostrou nos 78 doentes com IDCV um genótipo tipo polimórfico, com excepção do um doente, em que detectou um *mismatch* no DNA *duplex* no exon I. Neste doente, a sequenciação por PCR evidenciou uma nova transição heterozigótica G>A, mas que não leva a substituição de aminoácidos. Esta variante foi observada nos familiares do doente saudáveis, o que sugere que não existe relação com a patogenia da doença.

**Discussão** – O interesse no estudo da sequenciação dos genes do BlyS na IDCV surgiram das observações no murino, onde se detectou que o bloqueio do BlyS levou a importante diminuição das imunoglobulinas séricas e bloqueio no desenvolvimento de células B periféricas. Também estudos *in vitro* demonstraram a importância do BlyS e dos

seus receptores na maturação e manutenção do *pool* periférico de células B. Pelo contrário, o aumento da produção de BlyS causou manifestações auto-imunes no murino. Não foram, no entanto, detectadas nesta série quaisquer mutações no gene BlyS associadas à IDCV. O gene do BlyS é altamente conservado, com funções biológicas complexas apenas parcialmente mediadas pela TACI. Também na análise das frequências genéticas na artrite reumatóide e LES não foi possível detectar qualquer associação genética com maior susceptibilidade a estas doenças. Os autores afirmam não poder excluir o envolvimento do BlyS na IDCV, mas, caso exista, a sua frequência será extremamente baixa.

**Comentários** – O presente estudo permitiu excluir o envolvimento *major* das mutações do gene da citocina BlyS na patogenia da IDCV. Nos últimos 3 anos a identificação de mutações no ICOS e TACI, numa pequena percentagem de doentes com IDCV, despertou o interesse na investigação de novas mutações genéticas, eventualmente existentes nesta síndrome. Os mecanismos envolvidos na interacção celular T e B são complexos e as deficiências imunológicas existentes na IDCV estão ainda hoje por esclarecer. Os conhecimentos imunológicos e genéticos futuros permitirão certamente, nos próximos anos, um avanço na identificação de outras mutações genéticas na IDCV e sua correlação com os fenótipos existentes. No entanto, a base da IDCV é provavelmente multifactorial/multigénica, o que torna a investigação patogénica desta síndrome complexa e ainda longe da ideal terapia génica ambicionada pelos autores.

Emília Faria