Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo

LUCILA AKUNE BARREIROS

Investigação genético-molecular de pacientes com

Imunodeficiência Combinada Grave

São Paulo

2018

LUCILA AKUNE BARREIROS

**Investigação genético-molecular de pacientes com
Imunodeficiência Combinada Grave**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Versão original.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pela autora

Akune Barreiros, Lucila
Investigação genético-molecular de pacientes
com Imunodeficiência Combinada Grave / Lucila Akune
Barreiros; orientador Antonio Condino Neto. -- São
Paulo, 2018.
114 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Imunologia. 2. Imunogenética. 3.
Imunodeficiências Primárias (IDPs). 4.
Imunodeficiência Combinada Grave (SCID). I. Condino
Neto, Antonio, orientador. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram com este trabalho, na forma de apoio científico, financeiro, acadêmico e emocional.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Departamento de Imunologia pelos recursos investidos. A todos os professores e professoras que despertaram cada vez mais meu interesse pela imunologia e a ciência de maneira geral.

À Fundação Jeffrey Modell, que financiou parte deste estudo e minha estadia no *Seattle Children's Research Institute*, na Universidade de Washington. Agradeço à toda a equipe do Dr. Hans D. Ochs pela ajuda, acolhimento e carinho em Seattle.

Ao meu orientador, Antonio Condino Neto, por ter me aceitado no Laboratório de Imunologia Humana (LIH) e me proporcionado experiências acadêmicas e científicas únicas.

À toda equipe do LIH, por todo apoio não só intelectual, mas emocional. Os cafés, almoços, lanchinhos e congressos com meus pares são grande parte dos responsáveis pelo meu crescimento científico e pessoal. Agradeço especialmente Jusley e Edson, por todos os dias em que dividiram as tarefas comigo, permitindo que eu pudesse me dedicar à dissertação. E Christina e Silvana, sem as quais a vida no laboratório seria impraticável.

À Marília Kanegae por ter aberto minha linha de pesquisa, ter sido a minha mentora e me ensinado (quase) tudo o que precisei para desenvolver não só o estudo, mas minha vida profissional como um todo.

Aos meus amigos, meus biólogos, pelo apoio e as risadas constantes por 10 anos. O caminho até aqui seria cinza sem vocês.

Ao Luiz, por todo o amor, carinho, paciência, paciência e paciência.

À minha família, em especial aos meus pais, por me proporcionarem diariamente os exemplos compromisso e persistência, e por terem me dado total liberdade e apoio para fazer da minha vida profissional e pessoal absolutamente o que eu quisesse.

Esse trabalho é dedicado a todos vocês.

EPÍGRAFE

(Fernando Gonsales [data desconhecida])

RESUMO

Barreiros, LA. Investigação genético-molecular de pacientes com Imunodeficiência Combinada Grave.

A imunodeficiência combinada grave (SCID) é uma doença caracterizada por profunda deficiência de células T, que afeta as imunidades celular e humoral e gera anormalidades graves no desenvolvimento e funções do sistema imune. Recém-nascidos com SCID apresentam a doença nos primeiros meses de vida e tem grande susceptibilidade a infecções. Sem tratamento, essas condições são invariavelmente fatais, porém se reconhecidas precocemente, há a possibilidade da realização do transplante de células-tronco hematopoiéticas, o tratamento curativo, o que torna a SCID uma emergência pediátrica. A investigação do defeito genético é uma prerrogativa para o condicionamento adequado do transplante, a terapia gênica, o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal. No Brasil, o conhecimento sobre SCID é incipiente e não existem dados moleculares sobre pacientes com a doença. Sendo assim, este estudo teve por objetivo investigar defeitos genético-moleculares de pacientes brasileiros com SCID. Foram incluídos 13 pacientes, todos com início precoce dos sintomas e manifestações clínicas esperadas em SCID (principalmente infecções respiratórias, de pele, diarreia crônica e atraso de crescimento). Os patógenos isolados foram vírus, bactérias e fungos oportunistas comumente encontrados em pacientes SCID. A partir da quantificação de TRECS e KRECs e imunofenotipagem de linfócitos, foi montado o perfil imunológico de cada paciente, que guiou o sequenciamento direto de *Sanger* dos genes mais frequentemente mutados em cada imunofenótipo de SCID. Mutações em 3 pacientes foram identificadas por *Sanger* e, posteriormente, 8 pacientes cujas mutações não foram encontradas no *Sanger*, foram encaminhados para o sequenciamento completo de exoma, que resultou na identificação do gene afetado em 62,5% dos casos. Ao todo, foram identificadas mutações patogênicas em 8 dos 13 pacientes. Os resultados revelaram 6 alterações em 5 genes de SCID clássica (*IL7R*, *RAG2*, *DCLRE1C*, *JAK3*, *IL2RG*), 1 mutação no gene *CD3G* e 2 alterações em *CECR1*. Das 9 mutações encontradas, 5 não possuíam registro na literatura. O estudo genético de SCID em nosso país é problemático, principalmente porque ainda hoje, a esmagadora maioria dos pacientes não é diagnosticada. A implementação da quantificação de TRECs e KRECs como triagem neonatal para linfopenias graves é uma ferramenta fundamental para que os pacientes SCID possam ser identificados, investigados e tratados adequadamente.

Palavras-chave: imunodeficiência combinada grave (SCID), células T, mutação, sequenciamento completo de exoma, triagem neonatal.

ABSTRACT

Barreiros, LA. Genetic and molecular investigation of patients with Severe Combined Immunodeficiency.

Primary immunodeficiencies are a heterogeneous group of genetic diseases that lead to increased susceptibility to infections and affect mostly children. Severe Combined Immunodeficiency (SCID) is the most severe of all these diseases and is characterized by profound T cell deficiency, which affects cellular and humoral immunities and leads to severe abnormalities in the development and function of the immune system. Newborns with SCID present the disease in the first months of life and are highly susceptible to infections. Without treatment, these conditions are invariably fatal, but if recognized early, there is the possibility of hematopoietic stem cell transplantation, the curative treatment, which makes SCID a pediatric emergency. Identifying the genetic defect of SCID patient's is a prerequisite for proper transplant conditioning, gene therapy, genetic counseling and prenatal diagnosis. Knowledge about SCID is still incipient in Brazil, and there are virtually no molecular data on patients with the disease. Therefore, this study aimed to investigate genetic-molecular defects of Brazilian patients with SCID. Thirteen patients were recruited, all with early onset of symptoms and clinical manifestations expected of classic SCIDs (mainly respiratory and skin infections, chronic diarrhea and failure to thrive). The pathogens isolated were opportunistic viruses, bacteria and fungi often reported in SCID patients. The immunological profile from each patient was defined by the quantification of TRECS and KRECs and lymphocyte immunophenotyping, which was meant to guide direct sequencing by *Sanger* of the most frequently mutated genes of each SCID immunophenotype. Mutations in 3 patients were identified by *Sanger* and, subsequently, 8 patients whose mutations were not identified by *Sanger* were referred for whole exome sequencing, which resulted in the identification of the affected gene in 62,5% of cases. Pathogenic mutations were identified in 8 of the 13 patients. The results revealed 6 mutations in 5 genes associated to classical SCID genes (*IL7R*, *RAG2*, *DCLRE1C*, *JAK3*, *IL2RG*), 1 mutation in the *CD3G* gene, and 2 mutations in *CECR1*. Five of the 9 mutations found had no record in the literature. SCID genetic investigation in our country is troublesome, mainly because even nowadays, the vast majority of patients are not diagnosed properly. Newborn screening for SCID and other severe lymphopenias by the quantification of TRECs and KRECs is key for the identification, investigation and proper treatment of SCID patients.

Keywords: Severe Combined Immunodeficiency (SCID), T cells, mutation, whole exome sequencing, newborn screening.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Sinais de alerta para IDPs em crianças adaptados para o Brasil	16
Figura 2 -	Distribuição fenotípica em porcentagens de IDPs do Registro LASID de 2014	17
Figura 3 -	Probabilidade de sobrevivência de pacientes SCID ao transplante de células-tronco hematopoiéticas	22
Figura 4 -	Critérios de recomendação de inclusão de uma doença no programa de triagem neonatal	24
Figura 5 -	Formação dos TRECs	25
Figura 6 -	Imunofenótipos mais comuns de SCID	28
Figura 7 -	Causas de TRECs baixos	30
Figura 8 -	Fluxograma de inclusão de pacientes no estudo	35
Figura 9 -	Fluxograma do processo de triagem neonatal para linfopenias T e B	39
Figura 10 -	Caracterização do defeito genético em <i>IL7R</i> do Paciente 1	49
Figura 11 -	Alterações genéticas em <i>RAG2</i> encontradas na Paciente 5	56
Figura 12 -	Sequência de aminoácidos de Rag-2 referência em comparação ao mutante T250Sfs*17	58
Figura 13 -	Investigação genética da mutação de <i>JAK3</i> encontrada na Paciente 6	61
Figura 14 -	Estrutura esquemática dos exons e domínios de Jak-3 com as mutações conhecidas	62
Figura 15 -	Conservação entre espécies da região de JH1 mutada na Paciente 6	62
Figura 16 -	Mutação c.241C>T em <i>DCLRE1C</i> encontrada no Paciente 8	66
Figura 17 -	Alteração genética em <i>CD3G</i> encontrada no Paciente 9 e segregação familiar	68
Figura 18 -	Conservação entre espécies da proteína CD3 γ na região mutada em P9	69
Figura 19 -	Mutação c.217A>C em <i>IL2RG</i> encontrada nos Pacientes 10 e 11	72
Figura 20 -	Estrutura da proteína cadeia γ c do receptor de IL-2 e mutações de X-SCID	72
Figura 21 -	Conservação entre espécies do domínio CC da proteína γ c	73
Figura 22 -	Sinais e sintomas dos pacientes estudados	77
Figura 23 -	Microrganismos isolados nos pacientes estudados	78
Figura 24 -	Genes afetados nos pacientes estudados	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Defeitos genéticos das Imunodeficiências Combinadas Graves	29
Tabela 2 -	Proveniência dos pacientes e da imunofenotipagem de linfócitos	36
Tabela 3 -	Sequência dos <i>primers</i> e sondas utilizados para o qPCR	37
Tabela 4 -	Análise dos valores de TREC e KREC para a triagem de linfopenias T e B graves	38
Tabela 5 -	Marcadores de membrana característicos das populações de células T, B e NK	40
Tabela 6 -	<i>Primers</i> utilizados nas amplificações por PCR	44
Tabela 7 -	Condições de PCR para cada grupo de <i>primers</i>	46
Tabela 8 -	Caracterização imunológica do Paciente 1	47
Tabela 9 -	Caracterização imunológica da Paciente 2	50
Tabela 10 -	Caracterização imunológica da Paciente 3	52
Tabela 11 -	Caracterização imunológica da Paciente 4	53
Tabela 12 -	Caracterização imunológica da Paciente 5	55
Tabela 13 -	Caracterização imunológica da Paciente 6	59
Tabela 14 -	Caracterização imunológica do Paciente 7	63
Tabela 15 -	Caracterização imunológica do Paciente 8	65
Tabela 16 -	Caracterização imunológica do Paciente 9	67
Tabela 17 -	Caracterização imunológica do Paciente 10 e 11	71
Tabela 18 -	Caracterização imunológica da Paciente 12	74
Tabela 19 -	Caracterização imunológica do Paciente 13	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – adenosina deaminase
AK2 – adenilato quinase 2
APAE – associação de pais e amigos dos excepcionais
BRAGID – do inglês, *Brazilian group for Immunodeficiencies* (Grupo Brasileiro de Imunodeficiências Primárias)
BCG – do francês, *Bacillus Calmette-Guérin*
BCR – do inglês *B cell receptor* (receptor de antígenos da célula B)
CD3G/CD3 γ - CD3 subunidade gama
CMV – citomegalovírus
Ct – do inglês, *cycle threshold*
dL - decilitro
DNA –do inglês, *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
DNAg – DNA genômico
ESID – do inglês, *European Society of Primary Immunodeficiencies* (Sociedade Europeia de Imunodeficiências Primárias)
ExAC – do inglês, *Exome Aggregation Consortium*
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Frameshift – mudança de quadro de leitura
HIV – do inglês, *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
HLA –do inglês, *human leucocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)
ICB – Instituto de Ciências Biomédicas
IDCs – imunodeficiências combinadas
IDP – imunodeficiência primária
IF – imunofenotipagem
Igs - imunoglobulinas
IL2RG- cadeia gama do receptor de interleucina 2
IL7R – cadeia alfa do receptor de interleucina 7
IUIS – *Internation Union of Immunological Societies* (União Internacional das Sociedades de Imunologia)
JAK3 – janus quinase 3
JH – do inglês, *janus homology domain* (domínio de homologia de janus)
Kb – quilo-base
KREC –do inglês *Kappa-deleting Recombination Excision Circles* (círculos de excisão da cadeia kappa)
LAGID – do inglês, *Latin-American Group for Immunodeficiencies* (grupo latino-americano de imunodeficiências primárias)
LASID – do inglês, *Latin American Society of Primary Immunodeficiencies* (Sociedade Latino-Americana de Imunodeficiências Primárias)
LIG4 – ligase 4
LIH – Laboratório de Imunologia Humana
m - meses
MAF – do inglês, *Minor Allele Frequency* (menor frequência alélica)
NF- κ B – do inglês, *nuclear factor kappa B* (fator nuclear kappa B)
 μ L – microlitro
mL – mililitro
mg - miligrama
 mm^3 – milímetro cúbico

mRNA – RNA mensageiro
 ng – nanograma
 nM - nanomolar
 NHEJ1 - do inglês *non-homologous end-joining factor 1*
 NI – não informado
 NK – do inglês, *Natural Killer* (assassinas naturais)
 nm – nanômetro
 NR – não realizado
 OMIM – do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Men*
 p10 – percentil 10
 p90 – percentil 90
 PCR –do inglês, *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
 qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa
 PIDTC - do inglês *Primary Immunodeficiency Treatment Consortium* (consórcio de tratamento de imunodeficiências primárias)
 PRKDC – do inglês *protein kinase C delta*
 RAG – do inglês, *recombination activation gene* (gene de ativação de recombinação)
 SCID – do inglês, *Severe Combined Immunodeficiency* (Imunodeficiência Combinada Grave)
 SDG – Síndrome de DiGeorge
 SG – sobrevivência global
 SIFT – do inglês, *Sorting Tolerant From Intolerant* (filtrando o tolerável do intolerável)
 SJ – do inglês, *signal joint* (sinal de junção)
 SNP –do inglês, *Single Nucleotide Polimorfism* (polimorfismo de nucleotídeo único)
 SO – Síndrome de Omenn
 STATs – do inglês, *signal transducer of activation* (sinal transdutor de ativação)
 TA – temperatura ambiente
 TAE – tris-acetato EDTA
 Taq – *Thermus aquaticus*
 TCR –do inglês, *T cell receptor* (receptor de antígenos da célula T)
 TCTH – transplante de células-tronco hematopoiéticas
 TN – triagem neonatal
 TREC – do inglês, *T-cell Receptor Excision Circles* (círculos de excisão do receptor de célula T)
 UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo
 UCSC – *University of California Santa Cruz*
 USP – Universidade de São Paulo
 UTI – unidade de tratamento intensivo
 VSR – vírus sincicial respiratório
 X-SCID – SCID ligada ao cromossomo X
 γ c –cadeia gama-comum

BASES NITROGENADA DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

AMINOÁCIDOS

Código (1 letra)	Código (3 letras)	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutâmico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Imunodeficiências Primárias	15
1.2 Imunodeficiência Combinada Grave	17
<i>1.2.1 Diagnóstico</i>	19
<i>1.2.2 Tratamento</i>	20
<i>1.2.3 Triagem Neonatal</i>	23
<i>1.2.4 Defeitos genético-moleculares</i>	26
<i>1.2.5 SCID no Brasil</i>	31
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Casuística e amostras	34
3.2 Extração de DNA	36
3.3 PCR quantitativo de TRECs, KRECs e β-actina	36
3.4 Avaliação do PCR quantitativo de TRECs, KRECs e β-actina	38
3.5 Determinação do perfil imunológico dos pacientes	39
3.6 Caracterização genético-molecular dos pacientes	40
<i>3.6.1 Extração do DNA genômico</i>	41
<i>3.6.2 Sequenciamento completo do exoma</i>	41
<i>3.6.2.1 Estratégia de análise do exoma</i>	42
<i>3.6.2.2 Análise <u>in silico</u> das variantes</i>	43
<i>3.6.3 Sequenciamento direto pela metodologia de <u>Sanger</u></i>	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Análise clínica e investigação genética do Paciente 1	47
4.2 Análise clínica e investigação genética da Paciente 2	49
4.3 Análise clínica e investigação genética da Paciente 3	51
4.4 Análise clínica e investigação genética da Paciente 4	53
4.5 Análise clínica e investigação genética da Paciente 5	55
4.6 Análise clínica e investigação genética da Paciente 6	58
4.7 Análise clínica e investigação genética do Paciente 7	63

4.8	Análise clínica e investigação genética do Paciente 8	64
4.9	Análise clínica e investigação genética do Paciente 9	67
4.10	Análise clínica e investigação genética dos Pacientes 10 e 11	70
4.11	Análise clínica e investigação genética da Paciente 12	74
4.12	Análise clínica e investigação genética do Paciente 13	75
4.13	Caracterização dos pacientes SCID	77
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
6.	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	95
	ANEXO B – Resultados dos sequenciamentos de exoma	96
	APÊNDICE – Artigos originais publicados em periódicos	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Imunodeficiências Primárias

Defeitos em um ou mais componentes do sistema imunológico podem resultar em doenças sérias, frequentemente fatais, classicamente caracterizadas por susceptibilidade aumentada a infecções, nomeadas imunodeficiências. Esse grupo é dividido entre as imunodeficiências congênitas (ou primárias) e adquiridas (ou secundárias). As imunodeficiências primárias (IDPs) são erros inatos da imunidade, transmitidos hereditariamente, e que resultam em anormalidades nas funções do sistema imune humano. Já as imunodeficiências secundárias podem ser adquiridas como consequência de outras doenças, a mais proeminente delas é a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV – *human immunodeficiency vírus*) e tumores, ou podem ser secundárias a fatores ambientais como inanição ou imunossupressão iatrogênica, devido a tratamentos para doenças inflamatórias ou prevenção de rejeição em transplantes (Abbas & Litchman, 2008).

As IDPs são doenças consideradas raras, que podem afetar quaisquer componentes do sistema imune, formando um grupo heterogêneo de doenças genéticas hereditárias (Casanova, Abel, 2007). Todas as formas de IDP são caracterizadas pela susceptibilidade a infecções de repetição, frequentemente de gravidade maior do que o esperado em um indivíduo imunocompetente; por vezes, há susceptibilidade anormal a patógenos específicos, que depende da natureza do defeito imune (Casanova, Abel, 2004). Defeitos da resposta imune inata incluem deficiências de fagócitos, receptores do tipo *Toll* e componentes do Sistema Complemento. Já defeitos na resposta imune adaptativa incluem as deficiências de anticorpos - que afeta mais da metade dos pacientes, e tem como tratamento padrão a reposição de anticorpos (De Vries, Driessen, 2011) - e imunodeficiências combinadas (IDCs) – que representam defeitos celulares de linfócitos, com apresentações clínicas geralmente mais graves, cujo tratamento curativo padrão-ouro é o transplante de células-tronco hematopoiéticas (Pay et al. 2009) e, alternativamente, a terapia gênica (Touzot et al. 2014). Além disso, há algumas formas de IDP que apresentam principalmente uma desregulação imune devido à defeitos nos mecanismos de tolerância, o que pode levar a autoimunidade e malignidades, e também há síndromes de fenótipo complexo nas quais a imunodeficiência é apenas um dos componentes do espectro da doença (Sullivan, 2001).

Atualmente há cerca de 320 defeitos genéticos descritos que compõe esse grupo tão complexo e com manifestações clínicas variáveis (Picard et al., 2018). Na maioria dos casos IDPs são doenças monogênicas com padrão mendeliano de hereditariedade, porém penetrâncias variáveis, mosaicismos e interações entre fatores genéticos e ambientais podem contribuir para a diversidade fenotípica dessas

doenças (Notarangelo, 2010). O amplo espectro clínico das IDPs, somado às apresentações variáveis que defeitos em um mesmo gene podem gerar, tornam essas doenças um grande desafio diagnóstico tanto para médicos quanto para pesquisadores.

A Cruz Vermelha Americana e a Fundação Jeffrey Modell definiram 10 sinais de alerta para IDPs em crianças, auxiliando clínicos brasileiros no diagnóstico desses pacientes raros e subnotificados (Figura 1). Foi necessária a criação de sinais de alerta específicos para a população brasileira porque os patógenos mais comuns em imunodeficientes variam de acordo com o ambiente ao qual os indivíduos estão expostos. No Brasil, a vacina contra a tuberculose, a BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), que contém uma linhagem atenuada de *Mycobacterium bovis*, é uma vacina viva atenuada administrada no período neonatal e é a responsável por causar complicações em pacientes com IDPs (Gonzalez et al., 1989; Norouzi et al., 2012). Sendo assim, as infecções disseminadas por BCG são características de países que ainda utilizam essa vacina como ferramenta no combate à tuberculose.

Figura 1 - Sinais de alerta para IDPs em crianças adaptados para o Brasil

10 sinais de alerta para Imunodeficiências Primárias em crianças

1. Duas ou mais pneumonias no último ano
 2. Quatro ou mais otites no último ano
 3. Estomatites de repetição ou monilíase por mais de dois meses
 4. Abscessos de repetição ou eczemas
 5. Um episódio de infecção sistêmica grave (meningite, osteoartrite, septicemia)
 6. Infecções intestinais de repetição / diarreia crônica
 7. Asma grave, doença do colágeno ou doença autoimune
 8. Efeito adverso ao BCG e/ou infecção por Micobactéria
 9. Fenótipo clínico sugestivo de síndrome associada a imunodeficiência
 10. História familiar de imunodeficiência
-

Fonte: adaptado de BRAGID (www.bragid.org.br).

A incidência real das IDPs é desconhecida devido a deficiências na capacidade de diagnóstico temporalmente apropriado dos portadores. Com exceção da deficiência de IgA (prevalência de 1: 2.000), todas as outras formas de IDPs são consideradas raras e estima-se uma prevalência geral de 1 em cada 10.000 nascimentos (Condino-Neto et al., 2015). Todavia, taxas maiores são observadas em populações com alta consanguinidade ou geneticamente isoladas (Notarangelo, 2010).

Estudos recentes têm mostrado que as IDPs são mais comuns do que se imaginava, o que pode

ser notado pelo crescente número de diagnósticos pelo mundo (Modell et al., 2011; Bousfiha et al., 2013). Estima-se que até 2% da população mundial pode ser afetada por uma IDP quando todas as formas das doenças são consideradas (Modell et al., 2016). A frequência dessas doenças registrada no ano de 2014 pela Sociedade Latino-Americana de Imunodeficiências Primárias (LASID, do inglês *Latin-American Society for Immunodeficiencies*) pode ser observada na Figura 2.

Figura 2 - Distribuição fenotípica em porcentagens de IDPs do Registro LASID de 2014

Fonte: adaptado de Condino-Neto et al., 2014.

1.2 Imunodeficiência Combinada Grave

A primeira descrição de crianças com linfopenias graves e de desfecho fatal, o que hoje acredita-se que fosse Imunodeficiência Combinada Grave, foi feita em 1950 na Suíça, quando dois patologistas descreveram duas crianças aparentadas com uma progressiva diminuição de linfócitos, o que sugeriram ser uma consequência direta de infecções graves por *Candida albicans*, em uma interpretação errônea de causa e efeito (Glanzmann, Riniker, 1950). Oito anos mais tarde, dois grupos suíços, de Berna e Zurique, reportaram casos de quatro crianças que morreram de infecções fúngicas e bacterianas graves cujas autópsias mostraram atrofia ou ausência de órgãos linfáticos, com um timo

também atrofiado e deslocado de seu lugar original (Hitzig et al., 1958; Tobler, Cottier, 1958); dois desses pacientes eram primos daqueles descritos por Glanzmann e Riniker, sugerindo que a doença poderia ter origem genética. Ambos os grupos suíços descreveram desenvolvimento anormal de plasmócitos e linfócitos, com linhagem mielóide normal, e propuseram que a combinação da agamaglobulinemia com a linfopenias resultava em um defeito imune celular-humoral combinado, culminando em um desfecho fatal. Devido aos achados clínicos e patológicos, a doença foi originalmente chamada de “deficiência celular-humoral combinada”. Em 1970, um comitê da Organização Mundial da Saúde cunhou a doença como Imunodeficiência Combinada Grave, ou SCID (do inglês, *Severe Combined Immunodeficiency*).

Atualmente, as SCID são consideradas um grupo de doenças caracterizado por anormalidades graves no desenvolvimento e funções do sistema imune adaptativo. Apesar da heterogeneidade genética, todos os pacientes possuem defeitos na timopoiese, maturação e função das células T, gerando uma deficiência numérica de linfócitos T, que pode ser acompanhada por deficiências de células B e *Natural Killer* (NK), dependendo do gene envolvido (Fischer et al. 1997). Entretanto, mesmo nos casos em que não existam defeitos intrínsecos nos linfócitos B, a produção de imunoglobulinas depende em grande parte da ajuda das células T, o que resulta no comprometimento funcional das células B, mesmo que seus números estejam normais (Bousfiha et al., 2013).

A incidência estimada de SCID, de acordo com estudos americanos, é de aproximadamente 1: 58.000 nascidos vivos (Verbsky et al., 2012; Kwan et al., 2014; Vogel et al., 2014). As primeiras manifestações aparecem precocemente, com idade de apresentação variável, mas que na maioria ocorre entre 3 e 6 meses de vida, quando os efeitos protetores das imunoglobulinas maternas começam a diminuir (Notarangelo, 2010). Clinicamente, pacientes com SCID são susceptíveis a infecções recorrentes ou oportunistas graves, atraso no crescimento e morte precoce (Buelow, Verbsky, Routes, 2016). Sem o diagnóstico e tratamento adequados, o portador de SCID vai a óbito em até 24 meses de vida (Notarangelo, 2010). Por este motivo, as SCID são consideradas emergências pediátricas que necessitam de diagnóstico precoce e tratamento agressivo.

1.2.1 Diagnóstico

O diagnóstico de um indivíduo com infecções recorrentes frequentes, um indicador da presença de algum tipo de IDP, normalmente envolve a avaliação clínica, acompanhada de perfil de leucócitos no sangue periférico e, dependendo da suspeita, também pode ser feita uma análise funcional de tipos celulares específicos (Costabile, Quash, Ferrante, 2006). Primeiramente, a investigação deve se basear em um indivíduo com suspeita clínica de IDP baseando-se nos 10 Sinais de Alerta para

Imunodeficiências Primárias em Crianças e a presença de HIV deve ser descartada. A SCID clássica tem seu diagnóstico definitivo se a criança afetada possuir menos de 2 anos de idade e número de células T CD3⁺ menor que 300 células por milímetro cúbico de sangue, ou com número maior de 300, porém sem células T *naïve* (CD3⁺CD45⁺) (Buelow, Verbsky, Routes, 2016). Já o diagnóstico provável se dá em pacientes com menos de 2 anos de idade com: a) menos do que 20% de células T CD3⁺ com contagem absoluta de linfócitos abaixo de 3000/mm³ e resposta linfoproliferativa a mitógenos de menor do que 10% quando comparado a um controle saudável ou, b) presença de linfócitos maternos na circulação. Além disso contagem diferencial de leucócitos em um hemograma acompanhado pela citometria de fluxo para determinar as subpopulações de linfócitos T, B e NK são os exames necessários para se fechar um diagnóstico (Illoh, 2004). É importante ressaltar que um diagnóstico final sempre requer a avaliação clínica e laboratorial por um imunologista.

Os pacientes que caem no diagnóstico provável por apresentarem níveis intermediários de linfopenia, com células T virgens entre 300 e 1500 por microlitro de sangue são considerados SCID atípicos, ou *Leaky SCIDs* (Shearer et al., 2014). Esse fenômeno pode se dever à presença de células maternas ou também a defeitos hipomórficos que levam à formação residual de linfócitos, que não necessariamente são funcionais, mas que podem passar por expansão oligoclonal. Esses casos podem ser mais elusivos ao diagnóstico e fenotipicamente, o curso da doença nesses pacientes pode ser menos grave ou de apresentação mais tardia; sendo assim, exames adicionais são necessários para garantir a proveniência das células T do recém-nascido e testes genéticos podem ser necessários para definir a causa da linfopenia persistente (Buelow et al., 2016).

O Consórcio de Tratamento de Imunodeficiências Primárias (PIDTC, do inglês *Primary Immunodeficiency Treatment Consortium*) estabeleceu em 2014 que, adicionalmente à SCID clássica, as formas variantes de SCID incluem a já citada *Leaky SCID* e também a Síndrome de Omenn (SO) e a Disgenesia Reticular (Shearer et al., 2014). A Síndrome de Omenn é uma doença inflamatória de manifestação precoce, caracterizada por sintomas típicos de SCID como diarreia crônica, atraso de crescimento e infecções de repetição, juntamente com outros sintomas diferenciais derivados da expansão oligoclonal de células T autorreativas: eritrodermia generalizada com descamação e alopecia, hepatoesplenomegalia, adenomegalia e hipereosinofilia (Villa et al., 1999). Assim como a *Leaky SCID*, a SO pode ser causada por defeitos hipomórficos em genes autossômicos recessivos de SCID, em especial dos genes ativadores de recombinação 1 e 2 (*RAG1* e *RAG2*), responsáveis por parte do processo de recombinação gênica dos receptores de células T (Notarangelo et al., 1999). Já a Disgenesia Reticular, umas das formas mais raras e graves de SCID, é caracterizada por ausência de neutrófilos, células T e NK e surdez bilateral sensorial (hemácias, plaquetas e células B também podem estar diminuídas) (Fischer et al., 2015). É causada por defeitos no gene mitocondrial adenilato quinase

2 (AK2), autossômico recessivo, que participa do metabolismo de adenosina na mitocôndria e é expresso em diversos tecidos e em todas as células hematopoiéticas (Pannicke et al., 2009). Na ausência de AK2, ocorre apoptose dos precursores mieloides e linfoides, provavelmente devido à alta exigência energética de células-tronco hematopoiéticas durante seu desenvolvimento (Ito, Suda, 2014).

Infantes com suspeita de SCID devem passar por um regime profilático com intuito de protegê-los de infecções bacterianas, fúngicas e virais (Dorsey et al., 2017). Imunoglobulina subcutânea ou intravenosa deve ser administrada para prevenir a aquisição de infecções (Gaspar et al., 2013). Além disso, pacientes com suspeita de SCID não devem receber nenhum tipo de vacina viva ou atenuada (no Brasil, chama-se a atenção para as vacinas contra tuberculose, poliomielite e rotavírus), já que o efeito protetor não existe (Gaspar et al., 2013). Independentemente da forma apresentada, todos os pacientes SCID, após o diagnóstico, devem ser encaminhados para o TCTH (Pai et al., 2014).

1.2.2 Tratamento

O primeiro transplante de medula óssea para SCID foi realizado em 1968 e mostrou que o procedimento possibilitou a correção efetiva do sistema imune do paciente (Gatti et al., 1968). Desde essa época até hoje, o desfecho da doença como um todo melhorou muito. Um número crescente de estudos retrospectivos internacionais tem documentado um aumento na sobrevivência de modo geral e na recuperação imune (Antoine et al., 2003; Gennery et al., 2010; Fernandes et al., 2012). A melhora se deve a diferentes fatores, como a tipagem de HLA (*human leukocyte antigen*), estabelecida graças à formação de grandes bancos de medula óssea e de sangue de cordões umbilicais, que disponibilizaram doações compatíveis de voluntários não aparentados, desenvolvimento de novas terapias contra a doença do enxerto-versus-hospedeiro, diagnóstico precoce, melhores cuidados e suporte antes e após o transplante, e regimes quimioterápicos com menor toxicidade, utilizados no preparo dos pacientes (Ochs, Hitzig, 2012). Além disso, avanços tecnológicos agora permitem o diagnóstico genético para a maioria dos pacientes SCID e cada vez mais a estratégia de condicionamento do TCTH tem se baseado no defeito genético específico encontrado (Gaspar et al., 2013).

Os fatores que influenciam o sucesso de TCTH em pacientes SCID são o tipo de doador (irmãos compatíveis são preferíveis), tipo de SCID (T-B- tem a pior taxa de sucesso), comorbidades pré-existentes ao procedimento (pneumonias, septicemia, infecções virais), idade no momento do transplante (pacientes com menos de 6 meses possuem as melhores taxas de sucesso), realização do transplante em ambiente protegido e uso de profilaxia com o antibiótico Cotrimoxazol (Gaspar, 2013).

Em 2007, resultados do programa de transplante de medula óssea para pacientes SCID da Universidade de Duke, nos Estados Unidos, mostraram que pacientes diagnosticados no período pré-natal ou logo ao nascimento, antes do aparecimento de infecções, possuem a maior chance de sucesso e também menores gastos durante o tratamento quando comparados a pacientes diagnosticados mais tardiamente, que possuem maior mortalidade e internações hospitalares mais longas, devido a infecções graves, em particular devido a vírus (Puck, 2007). Entre os pacientes tratados antes de 3,5 meses de vida a sobrevivência global (SG) foi de 96% (n=46), já entre os pacientes transplantados após 3,5 meses de vida, caiu para 66% (n=113).

Em uma atualização desses dados feita pelo PIDTC (Pai et al., 2014), com 100 pacientes tratados, a SG foi de 90%, porém a sobrevivência de pacientes com menos de 3,5 meses e sem infecções ativas no momento do transplante foi de 95%, contra 81% nos pacientes também com menos de 3,5 meses, mas com infecções ativas (Figura 3). Esses trabalhos mostram que, mesmo com todas as melhorias citadas nos procedimentos de transplante para pacientes SCID, a existência de infecções continua sendo o maior fator de risco para o sucesso do tratamento.

Figura 3 - Probabilidade de sobrevivência de pacientes SCID ao transplante de células tronco hematopoiéticas

m = meses de vida

Fonte: adaptado de Pai et al., 2014.

Na ausência de doadores compatíveis, existem protocolos de terapia gênica em uso em alguns países, em especial para pacientes X-SCID (SCID ligada ao X, devido a deficiência do gene que codifica a cadeia gama-comum do receptor de IL-2, *IL2RG*) e ADA-SCID (SCID autossômica recessiva, causada por deficiência de adenosina deaminase, ADA) (Bordignon, 2017). X-SCID é a mais frequente das SCIDs e foi a primeira a ser estudada clinicamente em humanos, o estudo resultou em reconstituição imune de sucesso em 22 dos 23 pacientes incluídos, tratados em Paris e Londres; porém, 5 deles desenvolveram leucemia linfoblástica aguda, devido à inserção do vetor de integração perto do proto-oncogene LMO2 (Hacein-Bey-Abina et al, 2003). Esse evento mostrou a complexidade e os potenciais perigos da terapia gênica em humanos e levou a comunidade científica a um período de reflexão e novos vetores vêm sendo desenvolvidos visando aumentar a segurança deste tipo de procedimento. A primeira terapia gênica de sucesso para ADA-SCID foi publicada em 2002 e, ao contrário dos pacientes incluídos no estudo de X-SCID, nenhum dos indivíduos do estudo de ADA desenvolveu malignidades (Aiuti et al., 2002). E assim, após mais duas décadas dos primeiros tratamentos, a terapia gênica *ex-vivo* para ADA-SCID chegou ao mercado no ano de 2016 (GSK Press release: www.gsk.com/en-gb/media/pressreleases/strimvelistm-receives-european-marketing-authorisation-to-treat-very-rare-disease-ada-scid).

Apesar disso, a opção de terapia gênica para paciente SCID ainda não é uma realidade em nosso país. O TCHT é a terapia padrão-ouro disponível no Brasil e é o recomendado para SCID, inclusive para os casos atípicos (Buelow, Verbsky, Routes, 2016).

As complicações infecciosas levam grande parte dos pacientes SCID à óbito antes do diagnóstico, durante a espera ou logo após o transplante. Por causa disso é imprescindível que os pacientes sejam identificados precocemente, passem por investigação de patógenos minuciosa e caso haja uma infecção, ela deve ser tratada rápida e agressivamente (Gaspar, 2013). Entretanto, como a maioria dos casos não possui histórico familiar declarado da doença, e os sintomas iniciais são infecções comuns, o diagnóstico precoce torna-se um desafio. Visando a identificação precoce, alguns países têm adotado a triagem neonatal para linfopenias T, que é capaz de identificar pacientes com perfil de SCID, que são então encaminhados para imunologistas para avaliação e diagnóstico. Esse rastreamento universal pode ser muito vantajoso, pois permite encontrar pacientes ao nascimento, antes do estabelecimento de infecções, potencialmente salvando vidas e diminuindo drasticamente os custos do tratamento futuro (Modell, Knaus, Modell, 2014).

1.2.3 Triagem Neonatal para SCID

Programas de rastreamento populacional previnem a morbidade e mortalidade de doenças genéticas tratáveis através de detecção precoce, antes das manifestações clínicas dessas doenças, permitindo um tempo oportuno para a intervenção adequada. Atualmente, no Brasil, a triagem neonatal (TN) permite o rastreamento de até 50 doenças congênitas diferentes ao nascimento (APAE de São Paulo, 2016).

Em 1968, Wilson e Jungner publicaram princípios para a inclusão de doenças em programas de TN (Figura 4). Apesar de terem sido estabelecidos há décadas, esses princípios foram evoluindo com os programas de rastreamento e continuam sendo de grande importância como um auxílio na decisão de incluir ou não uma doença na TN. De acordo com esses princípios, a SCID se encaixaria perfeitamente em programas de rastreamento, por ser uma emergência pediátrica, de história natural que pode ser prevenida e interrompida com o diagnóstico precoce, possui tratamento disponível e tem um custo muito menor quando o paciente ainda não manifestou os sintomas da doença.

Figura 4 - Critérios de recomendação de inclusão de uma doença no programa de triagem neonatal

Critérios para inclusão em programa de triagem neonatal
1. A condição deve ser um importante problema de saúde
2. Deve haver um tratamento estabelecido para a doença
3. Deve haver instituições para diagnósticos e tratamento acessíveis
4. Deve haver um estágio sintomático reconhecível latente ou precoce
5. Deve haver um teste ou exame adequado
6. O teste deve servir à população geral
7. A história natural da condição, incluindo o desenvolvimento de doença latente a ativa, deve ser bem estabelecida.
8. Deve haver um regulamento claro de quem oferecerá tratamento aos pacientes
9. O custo do paciente (incluindo diagnóstico e tratamento) deve ser economicamente balanceado em relação aos possíveis gastos do tratamento médico como um todo.
10. Rastreamento deve ser um processo contínuo e sistemático.

Fonte: adaptado de Wilson & Jungner, 1968.

O manejo do paciente com SCID é tão crucial para o desfecho da doença quanto o próprio transplante. Gaspar e cols. (2013) relataram que antes do advento da TN para SCID, com exceção dos indivíduos com histórico familiar da doença, todos os pacientes eram diagnosticados por causa de infecções recorrentes ou oportunistas ou problemas relacionados à infecção, e mesmo com o aumento

da conscientização da comunidade médica sobre a doença, boa parte dos pacientes morrem antes do

transplante devido a complicações infecciosas. Por isso é tão importante o uso de um método que permita o rastreamento de portadores dessa doença na população como um todo.

A observação de que todos os pacientes com SCID, independente da causa, não possuíam ao nascimento linfócitos T virgens emigrados do timo na circulação, levou ao desenvolvimento de uma técnica eficiente e simples, capaz rastrear neonatos com esta doença. A maturação normal das células T no timo envolve o processamento do DNA codificante do receptor de célula T (TCR). Esse processo gera pequenos círculos de DNA do locus α do TCR, os chamados círculos excisados de receptor de células T (do inglês *T cell receptor excision circles* - TRECs) (Figura 5). Esse pequeno DNA não se multiplica nas divisões celulares, podendo ser utilizado para determinação do número de células emigrantes do timo. Como o indivíduo com SCID possui baixo número de linfócitos T – independente de qual gene apresente mutação – ele também apresenta menor quantidade de TRECs.

Figura 5 - formação dos TRECs

O gene *TCRD* está intercalado entre segmentos do gene *TCRA* ao longo do cromossomo 14 (14q11). A excisão do *locus* D forma um círculo de DNA episomal, os chamados TRECs.

Fonte: adaptado de Somech & Etzioni, 2014.

TRECs podem ser identificados por PCR utilizando manchas de sangue seco sobre papel de filtro (Guthrie, Susie, 1963; Puck, 2012), normalmente coletadas de sangue venoso obtido do calcanhar de recém-nascidos. A coleta de sangue em papel filtro é utilizada corriqueiramente no Brasil pois existem doenças que são triadas em toda a população pelo nosso Sistema Único de Saúde, o que traz a vantagem de que não é necessário o estabelecimento de um novo processo de coleta para a realização do teste de triagem específico para SCID.

Desde o desenvolvimento e recomendação da técnica de triagem neonatal para SCID em 2005 (Chan & Puck), já houve muito avanço na implementação do processo em diversos países. Ao longo desse tempo, foram realizados programas pilotos e, em alguns países, já foram estabelecidos programas de triagem para SCID por recomendação do próprio governo. Já foram publicados trabalhos validando e recomendando a TN para SCID em todo o território dos Estados Unidos (Kwan et al. 2014), e diversos outros países, como Japão (Morinishi et al., 2009), China (Chien et al., 2012), Israel (Somech et al., 2013), Inglaterra (Adams et al., 2014), França (Audrain et al., 2014), Espanha (Olbrich et al., 2014), Irã (Fazlollahi et al., 2017) e Brasil (Kanegae et al., 2016; Kanegae et al, 2017). Todas essas iniciativas concluíram que esse teste se mostrou sensível para a detecção de recém-nascidos portadores de SCID (Buelow, Verbsky, Routes, 2016), e de vantagem econômica ao se comparar os gastos para o manejo de um paciente SCID antes e após o aparecimento de infecções (Chan, Davis, Pai, 2011; Kubiak et al., 2014; Modell, Knaus, Modell, 2014; Gardulf, 2016).

Além disso, também é possível investigar deficiências de células B, utilizando-se a mesma metodologia da quantificação por PCR, porém dos KRECs (do inglês, *kappa-deleting recombination*

excision circles), subprodutos da formação do receptor de célula B, que se originam de maneira similar aos TRECs e que também podem ser quantificados por PCR e usados na identificação de pacientes portadores de agamaglobulinemia ligada ao X (van Zelm et al. 2011; Borte et al. 2012). Em conjunto, a quantificação de TRECs e KRECs pode dar pistas sobre quais tipos celulares estão afetados em cada paciente, ajudando a direcionar a investigação genético-molecular de SCID.

Quando falamos em TN para SCID, é importante ter em mente que no Brasil, a BCG é especialmente perigosa para os indivíduos afetados, que em geral são assintomáticos no momento da administração, que é feita nas primeiras horas de vida, ainda na maternidade. Por causa disso, em todos os países que realizam a TN para SCID, é recomendado que a vacina seja aplicada somente com o resultado da TN em mãos. No Brasil, foi constatado que entre 70 pacientes diagnosticados entre 1996 e 2011, 65% apresentam complicações devido à vacinação com BCG, sendo que destes, 74% apresentaram BCG disseminada e essa forma da doença foi responsável, sozinha ou acompanhada por outros fatores, pelas 35 mortes registradas no estudo (Mazzucchelli et al., 2014). Portanto, uma vez que a TN para SCID é possível ao nascimento, deve-se tomar muito cuidado em impedir a aplicação de BCG e outras vacinas atenuadas aos indivíduos com resultados positivos.

1.2.4 Defeitos genético-moleculares de pacientes com SCID

Apesar de resultarem de uma grande variedade de defeitos genético-moleculares, mutações em diversos genes acabam culminando em uma apresentação clínica muito similar, devido à ausência ou baixo número de linfócitos T no recém-nascido (Gaspar, Gilmour, Jones, 2001). Por ser uma condição muito grave, a identificação do defeito genético específico não é necessária para o início do tratamento do paciente, no entanto, é um pré-requisito para a terapia gênica, o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal e é importante para um condicionamento eficiente para o transplante de medula óssea (Gilmour et al. 2001).

O estudo molecular de pacientes com fenótipo SCID começou com a descoberta do gene que codifica a enzima ADA (Giblett et al. 1972; Wiginton et al. 1986). A deficiência de ADA é uma condição hereditária rara do metabolismo das purinas, caracterizada pelo acúmulo de substratos metabólicos que levam a anomalias de desenvolvimento e função do sistema imune e uma variedade de defeitos sistêmicos (Gaspar et al. 2009). Anormalidades características em subpopulações de linfócitos T, B e células NK podem fornecer pistas sobre o defeito molecular envolvido. Por exemplo, o imunofenótipo T-B-NK- sugere defeito em ADA, que é comum ao metabolismo de todos os tipos de linfócitos; a falta de linfócitos T e B com a presença de células NK sugere mutações nos genes envolvidos na recombinação dos receptores de linfócitos T e B, TCR e BCR, respectivamente (como

RAG1, *RAG2* e *ARTEMIS*), sem os quais a formação de um receptor funcional fica prejudicada e as células sofrem morte celular programada.

Apesar de alguns autores relatarem a possibilidade do imunofenótipo indicar o possível defeito genético (Puck, 2007), a análise genética de coortes de pacientes com SCID levou à descoberta de que diferentes defeitos genéticos também podem resultar em fenótipos clínicos idênticos, se os genes envolvidos forem parte da mesma via de sinalização. Por exemplo, mutações nos genes de *IL2RG* e *JAK3* resultam em um perfil idêntico de SCID T-B^{high/low}NK-, uma ligada ao cromossomo X e a outra, autossômica recessiva, respectivamente. Por outro lado, mutações em um gene podem resultar em fenótipos clínicos variados, como ilustrado pelas consequências de mutações *RAG1/RAG2*, que podem se apresentar como SCID clássica se forem mutações nulas (T-B-) ou como Síndrome de Omenn (T^{low} B^{low}) no caso de mutações hipomórficas (Ochs, Hitzig, 2012). Os defeitos mais comuns de SCID clássica e seus imunofenótipos podem ser vistos na Figura 6.

Numa recente revisão (Kwan, Puck, 2015), a distribuição dos diferentes defeitos genéticos na população sugere que a SCID ligada ao X e outras formas T-B+ representem aproximadamente 40-50% de todas as formas de SCID. Formas T-B-, resultantes de defeitos da recombinação V(D)J seriam responsáveis por 25-37% e deficiência de ADA, 10-18%.

Figura 6 - Imunofenótipos mais comuns de SCID

ADA, adenosina deaminase; IL, interleucina; NK, *natural killer*; RAG, gene ativador de recombinação; ARTEMIS, proteína do reparo de DNA.

Fonte: adaptado de Gaspar, Gilmour, Jones 2000.

Até o momento, 17 genes diferentes já foram identificados como mutados em pacientes com SCID (Picard et al., 2018). Tais defeitos podem ser caracterizados de acordo com a via afetada pelo defeito molecular ou pelo fenótipo específico gerado pela mutação (Tabela 1).

A classificação de pacientes SCID com base nos imunofenótipos é muito útil quando o paciente tem um quadro clínico clássico e o defeito genético caracteriza uma mutação nula, ou seja, uma mutação que oblitera a função daquele gene na qual está inserida. Entretanto, com a adoção da quantificação de TRECs e da disseminação de informações sobre a doença e do sequenciamento de nova geração, novos fenótipos clínicos e imunológicos têm sido classificados como Imunodeficiência Combinada Grave e associados a novos genes, ou a mutações hipomórficas nos genes já conhecidos (Cirillo et al., 2015).

Tabela 1 - Defeitos genéticos das Imunodeficiências Combinadas Graves

Imuno fenótipo	Gene	Herança	Produto Gênico	Função	Características associadas
T-B+					
	<i>IL2RG</i>	LX	Cadeia γ -comum dos receptores de IL-2, 4, 7, 9 e 15	Ativação de JAK3 quinase e consequente sinalização intracelular	ausência de células NK
	<i>JAK3</i>	AR	Tirosina janus quinase 3	Diferenciação de células hematopoiéticas	ausência de células NK
	<i>IL7RA</i>	AR	Cadeia α do receptor de IL-7	Crescimento e sobrevivência de progenitores linfoides e LT no timo; ativação JAK3	-
	<i>CD45 (PTPRC)</i>	AR	Proteína tirosina fosfatase	Regula quinases necessárias à transdução de sinal do TCR e BCR	-
	<i>CD3D, CD3E, CD3Z</i>	AR	Componentes δ , ϵ , ζ do complexo TCR	Transdução de sinal do complexo do TCR	ausência de células T γ/δ
	<i>CORO1A</i>	AR	Coronina 1A	Regulador de actina; importante papel na saída de linfócitos do timo e linfonodos	timo detectável, infecções por EBV
	<i>LAT</i>	AR	Ligação para ativação de células T	Proteína adaptadora necessária à sinalização do TCR	adenopatia, esplenomegalia, infecções recorrentes, autoimunidade
T-B-					
	<i>RAG1 e RAG2</i>	AR	DNA recombinases	Medeiam a recombinação não homóloga V(D)J	-
	<i>DCLRE1C</i>	AR	ARTEMIS	Reparo do DNA dupla fita por recombinação não homóloga	sensibilidade à radiação (SR)
	<i>PRKDC (PKcs)</i>	AR	Subunidade catalítica da quinase dependente de DNA	Idem	SR, microcefalia
	<i>XLF (NHEJ1)</i>	AR	Cernunnos	Idem	SR, microcefalia
	<i>LIGIV</i>	AR	Ligase IV	Idem	SR, microcefalia
	<i>AK2</i>	AR	Adenilato quinase 2	Metabolismo de purina	granulocitopenia e surdez
	<i>ADA</i>	AR	Adenosina deaminase 1	Metabolismo de purinas; remoção de metabólitos tóxicos em células linfoides	ausência de NK, defeitos ósseos, defeito cognitivos e proteinose pulmonar

AR = autossômico recessivo; LX – ligado ao X

Obs.: Painel expandido de IDCs: *DOCK2, CD40, CD40LG, ICOS, CD3G, CD8A, ZAP70, TAP1, TAP2, TAPBP, B2M, CIITA, RFX5, RFXANK, RFXAP, DOCK8, RHOH, STK4, TRAC, LCK, MALTI, CARD11, BCL10, BCL11B, IL21, IL21R, OX40, IKBKB, MAP3K14, RELB, MSN, TFRC*.

Fonte: adaptado de Picard et al., 2018.

O aumento do número de estudos utilizando a quantificação de TREC para triagem neonatal tem mostrado que os ensaios possuem 100% de sensibilidade para SCID, mas que nem todo TREC abaixo do valor de corte é necessariamente um indivíduo com SCID, também são identificados

pacientes com linfopenias devido a outras condições (Comeau et al., 2010; Verbsky et al., 2012; Fronkova et al., 2014; Kwan et al., 2014; Patel et al., 2014; de Felipe et al., 2016). Em 2017, foi publicada uma revisão sistemática da literatura compilando as causas de TRECs baixos, nela os autores analisaram 100 publicações, com um total de resultados de TRECs para 6.093.942 de indivíduos, destes 1553 (0,02%) apresentaram quantificações de TRECs consistentemente abaixo do valor de corte (Figura 7). Destas, 40% foram classificadas como IDPs, sendo a maioria destes casos pacientes com Síndrome de DiGeorge (SDG); dentre os 60% restantes, 3% se deveram a síndromes conhecidas (principalmente Trissomia do 21, Trissomia do 18, Síndrome de Jacobsen) e os outros 57% foram condições sem causa genética aparente; destas 31% não foram especificadas, 36% normalizaram espontaneamente, 8% eram neonatos prematuros e 25% tiveram causas diversas como timectomia, defeitos cardíacos, gastrointestinais, entre outros (Maraucher et al., 2017).

Figura 7 - causas de TRECs baixos

Fonte: adaptado de Maraucher et al., 2017.

Devido aos novos genes sendo associados ao que é clinicamente definido como um SCID, optou-se por englobar no estudo, não só os genes classicamente descritos como causadores de SCID típica, mas também os genes envolvidos com OS, *Leaky* SCIDs e todos os genes associados às Imunodeficiências Combinadas.

1.2.5 SCID no Brasil

O primeiro registro de Imunodeficiências Primárias da América Latina foi criado em 1994 pelo então Grupo Latino Americano de Imunodeficiências Primárias (LAGID, *Latin-American Group for*

Immunodeficiencies), que depois se tornaria o LASID. Desde então, com as publicações do grupo (Zelazko et al., 1998; Leiva et al., 2007; Condino-Neto et al., 2011; Leiva et al., 2011) foi sendo constatado que existe uma subnotificação importante dos casos de IDPs na América Latina.

No Brasil, o cenário segue a mesma tendência. Em 2001 foi criado o Grupo Brasileiro de Imunodeficiências primárias (BRAGID, do inglês *Brazilian Group for Immunodeficiency*), com o objetivo de melhorar o diagnóstico de IDPs através de atividades educacionais e estimular a pesquisa de IDPs no país. Apesar da melhora no atendimento e tratamento feito por imunologistas, para a comunidade médica no geral, as IDPs continuam sendo um tópico obscuro. Uma pesquisa feita pelo BRAGID com 3047 pediatras mostrou que 97% deles já havia atendido pelo menos um paciente com infecções recorrentes, porém apenas 63% realizou algum tipo de investigação para IDPs e apenas 50% conheciam imunologistas para referenciar o paciente (Rosario-Filho et al., 2013). Estudos publicados posteriormente com médicos de diferentes especialidades da cidade de São Paulo (Dantas et al., 2013) e de todo o Brasil (Dantas et al., 2015) apresentaram resultados muito similares.

De acordo com um estudo multicêntrico (Mazzucchelli et al. 2014), em um período de 15 anos (1996 a 2010), apenas 70 casos de SCID foram diagnosticados em 73 centros contatados pelo país. Considerando a provável incidência de 1 caso de SCID para 58.000 nascidos vivos e a média de 3 milhões nascidos vivos/ano de 1996 a 2010, esperávamos 775 casos neste período. O diagnóstico de apenas 70 pacientes (9,3% do esperado) revela um número alarmante de casos de SCID não diagnosticados no Brasil. Além disso, a investigação dos defeitos genético-moleculares não é facilmente alcançada em nosso país. Mazzucchelli e colegas reportaram que apenas 10% dos pacientes suspeitos foram definidos como portadores de SCID com descrição do defeito genético. O grande número de casos não diagnosticados se deve em parte a falhas no treinamento médico (Dantas et al. 2015), à indisponibilidade de testes diagnósticos acessíveis à população e à dificuldade do diagnóstico genético em casos de alguns defeitos específicos, já que na maioria dos casos não há uma relação fenótipo-genótipo clara (Nijman et al. 2014). O maior problema nas falhas de conhecimento sobre SCID é que, devido à gravidade da doença, os pacientes vão à óbito em decorrência das infecções sem o diagnóstico, ou seja, um diagnóstico tardio significa um aumento na morbimortalidade (Pai et al., 2014).

Outro fator a ser considerado é a heterogeneidade genética da população brasileira. A maioria dos estudos de novas mutações em IDPs foca em populações com altos índices de consanguinidade, normalmente do Oriente Médio, em que consanguinidade média de pacientes com IDP é de 65,7%, contra 5,6% na Europa e 2,3% na região da Ásia-Pacífico. Nas décadas de 50 e 60 foram realizados diversos estudos de consanguinidade na população Brasileira (Freire-Maia, 1957, 1958; Salzano, Freire-Maia, 1967, Freire-Maia 1989, 1990), que constataram a média de frequência de

consanguinidade para o país como um todo foi de 4,8%, variando desde estados com as menores frequências no Sudeste (menos de 1% em São Paulo) até estados do Nordeste com frequências variando de 6 a 12%. Ou seja, apesar de existirem regiões com maior consanguinidade, somos uma população bastante miscigenada, formada principalmente por uma mistura entre caucasianos, africanos e ameríndios, sendo que as últimas duas são população sem informações sobre IDPs. Sendo assim, é possível que a distribuição das mutações de SCID em pacientes brasileiros seja diferente da distribuição reportada pela literatura.

Diante do panorama apresentado, este estudo visou investigar os defeitos genéticos de indivíduos com SCID, verificando quais são as mutações e genes afetados, além das características clínicas dos pacientes brasileiros em comparação com as informações de outros países. Com isso, espera-se expandir o conhecimento sobre essa doença, a fim de aumentar sua visibilidade, possibilitando tratamento adequado aos pacientes e aconselhamento genético às famílias.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na última década, melhorias no diagnóstico molecular e no sequenciamento de nova geração tem adicionado mais e mais informações sobre o funcionamento do sistema imune e os mecanismos patogênicos das IDPs, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Com o avanço nas terapias de suportes e nos protocolos de transplante de células-tronco hematopoiéticas, crianças com SCID tem oportunidade de cura e sobrevivência a longo prazo, em especial se as morbidades infecciosas forem minimizadas antes do transplante, o qual deve ser realizado precocemente. Entretanto, em muitos países, o Brasil incluso, o maior problema é o oferecimento de um serviço completo de detecção precoce, diagnóstico e tratamento definitivo para esse grupo de pacientes. É necessária uma rede multicêntrica de colaboração para que surjam estudos sobre epidemiologia, ônus da doença para os pacientes, familiares e o sistema público de saúde, e desfechos finais. Com esses dados em mãos, pode-se realizar campanhas de conscientização para profissionais da saúde, promovendo a identificação precoce e tratamento. Juntamente a isso, é necessário que se estabeleçam instituições de serviço de referência, protocolos de tratamento e o serviço de aconselhamento genético para os pacientes e suas famílias (Griffith et al., 2009).

Pesquisas epidemiológicas sobre SCID são difíceis devido ao déficit de diagnóstico e, conseqüentemente, ao subregistro. Existem registros multinacionais que tem contribuído muito para o acúmulo de informações (Guzman et al., 2007; Gathmann et al., 2009) e também para a caracterização genética de certas populações. Na América Latina possuímos o Registro LASID; De acordo com o registro referente a maio de 2018, foram notificados 129 casos de IDPs neste mês, sendo que 23% foram casos registrados no Brasil, ficando atrás da Argentina, que é responsável pela notificação de 34% dos casos, e é o membro do LASID que mais notifica IDPs (http://bragid.org.br/download/registro/estatisticas_2018_05.pdf). Levando-se em consideração o tamanho populacional dos dois países – em 2016, o Brasil possuía aproximadamente 208 milhões de habitantes, contra 44 milhões na Argentina (<http://www.worldbank.org>), uma diferença de 4,7 vezes -, é notável que existe um problema grave de notificação em nosso país, o que reflete um problema de falta de conhecimento médico para o diagnóstico e também de acessibilidade a exames para o diagnóstico para esses pacientes. Grande parte desse problema poderia ser sanado com a implementação do teste de triagem neonatal utilizando os TRECs e KRECs, já disponível em nosso país.

O advento da TN populacional em alguns países vem permitindo com que a real incidência de SCID venha à tona, caindo de 1:100.000 para 1:58.000 nascidos vivos, segundo dados americanos (Kwan, Puck, 2015). Graças aos TRECs, crianças com SCIDs atípicas começaram a ser

diagnosticadas. Sem a TN, indivíduos com um espectro heterogêneo de mutações hipomórficas seriam diagnosticados tardiamente, tendo desenvolvido outras complicações como autoimunidades, além dos sintomas clássicos de SCID (Felgentreff et al., 2011).

O aumento no número de casos identificados devido à TN e a evolução nas técnicas de sequenciamento acabou por permitir a descoberta de novos genes associados à SCID, entretanto ainda existem muitos casos de pacientes cujas mutações patogênicas permanecem obscuras (Kwan, Puck, 2015; Routes, Verbsky, 2018). De acordo com o banco de registro de pacientes com IDP do ESID (Sociedade Europeia de Imunodeficiências Primárias), até o ano de 2008 - anterior à implementação em massa da TN em alguns países da Europa -, quase 50% dos pacientes com SCID não tinham defeito genético definido (Gathmann et al., 2009). Mais recentemente, em um estudo multicêntrico de TN para SCID conduzido em 11 estados americanos, foram triados mais de 3 milhões de indivíduos e identificados 52 pacientes com SCID, sendo que o defeito genético foi definido em apenas 77% dos casos, ou seja, mesmo com todo o avanço tecnológico e científico atual, quase um quarto dos pacientes continua sem o diagnóstico genético definitivo (Kwan et al. 2014). Evidenciando que nenhum método de investigação é infalível. Existem mutações profundas em regiões intrônicas e aberrações de números de cópia de genes que, muitas vezes, não são detectados pelo sequenciamento completo de exoma (Buccioli et al., 2017).

Como os estudos acima denotam, mesmo em centros de excelência, mutações nem sempre são identificadas pois ainda existem defeitos genéticos desconhecidos. Dada a diversidade genética de mutações em SCID, é improvável que o sequenciamento de variantes únicas de genes específicos seja informativo (Patel et al., 2017) e o sequenciamento por metodologia de *Sanger* de todos os genes associados à SCID é laborioso e custoso. O uso de painéis multigênicos para IDPs já teve sua utilidade demonstrada (Nijman et al., 2014; Moens et al., 2014), mas possui como limitação importante a inabilidade de detectar defeitos ainda não descritos. Mesmo com suas limitações, o sequenciamento completo de exoma tem o maior potencial de fornecer um diagnóstico genético mais rápido e aumentar o espectro de análise de variantes, o que é particularmente útil em doenças de clínica e genética tão heterogênea como as IDPs (Al-Mousa et al., 2016; Yang et al., 2013; Yang et al., 2014).

A identificação de uma mutação específica é importante não apenas para a confirmação do diagnóstico, mas também para guiar o aconselhamento genético, facilitar a identificação dos indivíduos portadores e o diagnóstico pré-natal, e também oferecer o condicionamento ótimo para o tratamento por TCTH. Entretanto, é importante ressaltar que nem toda mudança no DNA é necessariamente patogênica; algumas variantes podem representar polimorfismos, variantes raras ou variantes que contribuem para a doença, mas não são a causa primária. Tais mudanças podem contribuir para a heterogeneidade dos fenótipos clínicos e imunes associados à SCID e às IDPs como

um todo, o que fazem com que a correlação genótipo-fenótipo dessas doenças menos estridente (Notarangelo, 2009).

3. CONCLUSÕES

Em suma, os resultados do presente estudo mostraram que no Brasil, os pacientes SCID possuem manifestações clínicas similares aos pacientes do resto do mundo. A idade de início dos

sintomas é similar, assim como os patógenos apresentados. Além disso, independentemente das manifestações e momento de apresentação da doença, todos foram identificados com sucesso pela quantificação de TRECs e KRECs. Os genes afetados também foram correspondentes à literatura, porém apenas 40% das mutações encontradas já haviam sido descritas na literatura, mostrando que ainda há muito a ser estudado sobre a genética de pacientes SCID no Brasil. De todos os dados coletados, o que mais chama a atenção é a baixa sobrevivência global em comparação a outros países. Nossos pacientes ainda são diagnosticados muito tarde e poucos encontram doadores totalmente compatíveis devido à escassez de amostras nos bancos de medula óssea, ambos fatores que interferem diretamente no sucesso do tratamento curativo.

O Brasil evoluiu nas últimas décadas no diagnóstico e tratamento de pacientes com IDPs. Porém, a investigação genética de pacientes com SCID ainda é muito difícil porque a esmagadora maioria desses pacientes acabam morrendo antes da possibilidade de identificação de um defeito genético. Devido ao número de casos notificados, sabe-se que a maioria dos pacientes vai à óbito sem sequer a suspeita de uma imunodeficiência primária. Após o diagnóstico, muitos pacientes morrem antes ou logo após o transplante devido a complicações infecciosas. É necessário o desenvolvimento de programas educacionais voltados para a comunidade médica e às famílias de pacientes para aumentar a conscientização a respeito da doença e da importância do estabelecimento da TN para SCID de maneira universal. Apesar de todos os desafios de um país em desenvolvimento, a existência da triagem neonatal será fundamental para o avanço no diagnóstico precoce e tratamento de recém-nascidos com SCID, permitindo assim que esses pacientes possam ser estudados, tratados, e suas famílias aconselhadas.

REFERÊNCIAS¹

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8ª ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2015.

Adams SP, Rashid S, Premachandra T, Harvey K, Ifederu A, Wilson MC, et al. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *J ClinImmunol*. 2014;34(3):323–330.

¹De acordo com o estilo Vancouver

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010; 7(4):248-249.

Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, Casorati G, Ficara F, Andolfi G, et al. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* 2002; 8:423–425.

Al-Mousa H, Abouelhoda M, Monies DM, Al-Tassan N, Al-Ghonaium A, Al-Saud B, et al. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1780-7.

Antoine C, Muller S, Cant A, Cavazzana-Calvo M, Veys P, Vossen J, et al. European Group for Blood and Marrow Transplantation; European Society for Immunodeficiency. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet*. 2003; 361(9357):553-560.

APAESP [homepage on the Internet]. APAE de São Paulo. [acesso em 4 abr. 2017]. Disponível em <http://autapaesp.org.br>.

Audrain M, Thomas C, Mirallie S, Bourgeois N, Sebille V, Rabetrano H, et al. Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French single center study. *Clin Immunol*. 2014;150(2):137–139.

Baker MW, Grossman WJ, Laessig RH, Hoffman GL, Brokopp CD, Kurtycz DF, et al. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 124(3):522–7.

Barbaro M, Ohlsson A, Borte S, Jonsson S, Zetterstrom RH, King J, et al. Newborn screening for severe primary immunodeficiency diseases in Sweden - a 2 year pilot TREC and KREC screening study. *J Clin Immunol*. 2017; 37:51-60.

Belmont JW, Puck JM. T Cell and Combined Immunodeficiency Disorders in Valle D. et al editors. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* [internet]. McGraw-Hills; c2018 [citado 26 jun. 2018]. Disponível em 10.1036/ommbid.218.

Bogaert D, Van Schil K, Taghon T, Bordon V, Bonroy C, Dullaers M, et al. Persistent *rotavirus* diarrhea post-transplant in a novel *JAK3*-SCID patient after vaccination. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016; 27: 93–96.

Bordignon C. Twenty-five years of gene therapy for genetic diseases and leukemia: The road to marketing authorization of the first ex vivo gene therapies. *J Autoimm*. 2017; 85:98-102.

Borte S, von Döbeln U, Fasth A, Wang N, Janzi M, Winiarski J, et al. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*. 2012; 119(11): 2552-5.

Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, Al-Herz W, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. A phenotypic approach for IUIS PID classification and diagnosis: guidelines for clinicians at the bedside. *J Clin Immunol*. 2013; 33(6): 1078-87.

Brooimans RA, van der Slot AJ, van den Berg AJAM and Zegers BJM. Revised exon-intron structure of human *JAK3* locus. *Eur. J. Hum. Genet*. 1999; 7:837-840.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234:177–86.

Brooks EG, Filipovich AH, Padgett JW, Mamlock R, Goldblum RM. T-cell receptor analysis in Omenn's syndrome: evidence for defects in gene rearrangement and assembly. *Blood*. 1999;93:242-250.

Bucciol G, Van Nieuwenhove E, Moens L, Itan Y, Meyts I. Whole exome sequencing in inborn errors of immunity: use the power but mind the limits. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2017; 17:1-10.

Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondanèche MC, Sanal O, et al. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*. 2006; 124(2):287-99.

Buelow BJ, Verbsky JW & Routes JM. Newborn screening for SCID: lessons learned. *Expert Rev Hematol*. 2016. Jun;9(6):579-84

- Butte MJ, Haines C, Bonilla FA, Puck J. IL-7 receptor deficient SCID with a unique intronic mutation and post-transplant autoimmunity due to chronic GVHD. *Clin Immunol*. 2007 Nov; 125(2): 159–164.
- Callebaut, I. & Mornon, J. P. The V(D)J recombination activating protein RAG2 consists of a six-bladed propeller and a PHD fingerlike domain, as revealed by sequence analysis. *Cell. Mol. Life Sci.* 1998; 54, 880–891.
- Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science*. 2007; 317:617-619.
- Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:55-66.
- Chan A, Scalchunes C, Boyle M, Puck JM. Early vs. delayed diagnosis of severe combined immunodeficiency: a family perspective survey. *Clin Immunol*. 2011;138(1):3–8.
- Chan K, Davis J, Pai SY, Bonilla FA, Puck JM, Apkon M. A Markov model to analyze cost-effectiveness of screening for severe combined immunodeficiency (SCID). 2011; 104(3): 383–389.
- Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:391–8.
- Chien YH, Chiang SC, Chang KL, Yu HH, Lee WI, Tsai LP, et al. Incidence of severe combined immunodeficiency through newborn screening in a Chinese population. *J Formos Med Assoc* 2015; 114, 12-16.
- Cirillo E, Giardino G, Gallo V, D'Assante R, Grasso F, Romano R et al. Severe combined immunodeficiency--an update. *Ann N Y Acad Sci*. 2015; 1356:90-106.
- Comeau AM, Hale JE, Pai SY, Bonilla FA, Notarangelo LD, Pasternack MS, et al. Guidelines for implementation of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Inher Metab Dis* 2010;33:S273-81.
- Condino-Neto A, Sorensen RU, Gómez Raccio AC, King A, Espinosa-Rosales FJ, Franco JL. Current state and future perspectives of the Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID). *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015;43(5):493-497.
- Costabile M, Quash A, Ferrante A. Molecular Approaches in the Diagnosis of Primary Immunodeficiency Diseases. *Hum Mutat*. 2006; 27(12), 1163–1173.
- Daguindau N, Decot V, Nzietchueng R, Ferrand C, Picard C, Latger-Cannard V, et al. Immune constitution monitoring after PBMC transplantation in complete DiGeorge syndrome: an eight-year follow-up. *Clin Immunol*. 2008; 128:164–71.
- Dantas EO, Aranda CS, Silva AMR, Tavares FS, Ferreira JFS, Coelho MAQ, et al. Doctors' awareness concerning primary immunodeficiencies in Brazil. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015; 43(3):272-8.
- de Felipe B, Olbrich P, Lucenas JM, Delgado-Pecellin C, Pavon-Delgado A, Marquez J, et al. Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;27:70-7.
- De Vries E & Driessen G. Primary immunodeficiencies in children: a diagnostic challenge. *Eur J Pediatr*. 2011. 170(2):169–77.
- Dorsey MJ, Dvorak CC, Cowan MJ, Puck JM. Treatment of infants identified as having severe combined immunodeficiency by means of newborn screening. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 139(3):733–42. doi:10.1016/j.jaci.2017.01.005
- Douek, DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000; 355(9218): 1875-81.
- Dvorak CC, Cowan MJ, Logan BR, Notarangelo LD, Griffith LM, Puck JM, et al. The natural history of children with Severe Combined Immunodeficiency: baseline features of the first fifty patients of the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium Prospective Study 6901. *J Clin Immunol*. 2013; 33(7):1156-1164.
- Fazlollahi MR, Pourpak Z, Hamidieh AA, Movahedi M, Houshmand M, Badalzadeh M. Clinical, Laboratory and

Molecular Findings of 63 Patients with Severe Combined Immunodeficiency: A Decade's Experience. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017; Mar 7:0. doi: 10.18176/jiaci.0147. [Epub ahead of print].

Felgentreff K, Perez-Becker R, Speckmann C, Schwarz K, Kalwak K, Markelj G et al. Clinical and immunological manifestations of patients with atypical severe combined immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2011;141(1):73–82.

Felgentreff K, Lee YN, Frugoni F, Du L, van der Burg M, Giliani S, et al. Functional analysis of naturally occurring DCLRE1C mutations and correlation with the clinical phenotype of ARTEMIS deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2015; 136:140–150 e147.

Fernandes JF, Rocha V, Labopin M, Neven B, Moshous D, Gennery AR, et al; Eurocord and Inborn Errors Working Party of European Group for Blood and Marrow Transplantation. Transplantation in patients with SCID: mismatched related stem cells or unrelated cord blood? *Blood*. 2012;119(12):2949-2955.

Fischer A, Cavazzana-Calvo M, De Saint Basile G, DeVillartay JP, Di Santo JP, Hivroz C, et al. Naturally occurring primary deficiencies of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1997;15:93–124.

Fischer A, Notarangelo LD, Neven B, Cavazzana M, Puck JM. Severe combined immunodeficiency and other related disorders. *Nature reviews*. 2015; 1:18.

Flores, SK. Estudos de novos defeitos genético-moleculares em pacientes com diagnóstico clínico de imunodeficiência primária. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Fronkova E, Klocperk A, Svaton M, Novakova M, Kotrova M, Kayserova J, et al. The TREC/KREC assay for the diagnosis and monitoring of patients with DiGeorge syndrome. *PLoS One* 2014;9:e114514.

Fujimura MD. Níveis séricos das subclasses de IgG em crianças normais e nefróticas. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1991.

Gardulf A, Winiarski J, Thorin M, Arnlind MH, von Döbeln U, Hammarström L. Costs associated with treatment of severe combined immunodeficiency—rationale for newborn screening in Sweden. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Dec 21. pii: S0091-6749(16)32461-7.

Gaspar HB, Aiauti A, Porta F., Candotti F, Herschfield MS, Notarangelo LD. How I treat ADA deficiency. *Blood*. 2009 Oct 22;114(17):3524-32.

Gaspar HB, Gilmour KC, Jones AM. Severe combined immunodeficiency – molecular pathogenesis and diagnosis. *Arch Dis Child*. 2001; 84: 169-173.

Gaspar HB, Qasim W, Davies EG, Rao K, Amrolia PJ, Veys P. How I treat severe combined immunodeficiency. *Blood*. 2013;122(23):3749-3758.

Gathmann B, Grimbacher B, Beaute J, Dudoit Y, Mahlaoui N, Fischer A, et al. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2006–2008. *Clin Exp Immunol*. 2009;157 Suppl 1:3–11.

Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;2(7583):1366-1369.

Gennery AR, Slatter MA, Grandin L, Taupin P, Cant AJ, Veys P, et al. Transplantation of hematopoietic stem cells and long-term survival for primary immunodeficiencies in Europe: entering a new century, do we do better? *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(3):602-610.

Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 1972; 2:1067–1069.

Giliani S, Bonfim C, de Saint Basile G, Lanzi G, Brousse N, Koliski A, et al. Omenn syndrome in an infant with IL7RA gene mutation. *J Pediatrics*. 2006; 8(2): 272–274.

- Giliani, S., Mori, L., De Saint Basile, G., Le Deist, F., Rodriguez-Perez, C., Forino, C. Interleukin-7 receptor α (IL-7R α) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunol Reviews*, 2005; 203: 110–126.
- Gilmour KC, Cranston T, Loughlin S, Gwyther J, Lester T, Espanol T, et al. Rapid protein-based assays for the diagnosis of T-B+ severe combined immunodeficiency. *Br J Haematol*. 2001 Mar;112(3):671-6.
- Glanzmann E & Riniker P. Essentielle Lymphozytopenie: Ein neues Krankheitsbild der Säuglingspathologie. *Ann Paediatr* 1950; 175:1–32.
- Gokturk B, Keles S, Kirac M, et al. CD3G gene defects in familial autoimmune thyroiditis. *Scand J Immunol*. 2014;80(5):354-361.
- Gonzalez B, Moreno S, Burdach R, Valenzuela MT, Henriquez A, Ramos MI, SorensenRU. Clinical presentation of Bacillus Calmette-Guérin infections in patients with immunodeficiency syndromes. *Pediatr Infect Dis J*. 1989;8(4):201-6.
- Griffith LM, Cowan MJ, Notarangelo LD, Puck JM, Buckley RH, Candotti F, et al. Improving cellular therapy for primary immune deficiency diseases: recognition, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 124:1152–60.
- GSK Press Release. Available at: <http://www.gsk.com/en-gb/media/pressreleases/strimvelistm-receives-european-marketing-authorisation-to-treat-very-rare-disease-ada-scid/> 2016.
- Guthrie R & Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963; 32:338– 343.
- 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.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-Associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, *Science*. 2003; 415:419.
- Hagen PT, Scholz DG, Edwards WD. Incidence and size of patent foramen ovale during the first 10 decades of life: an autopsy study of 965 normal hearts. *Mayo Clin Proc*. 1984; 59:17–20
- Hitzig WH, Biro Z, Bosch H, Huser HJ. Agammaglobulinemia & alymphocytosis with atrophy of lymphatic tissue. *Helv Paediatr Acta* 1958; 13:551–585;
- Homma S, Sacco RL. Patent foramen ovale and stroke. *Circulation*. 2005; 12:1063–1072.
- Illoh OC. 2004. Current applications of flow cytometry in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol Lab Med* 128:23–31.
- Kanegae MPP, Barreiros LA, Mazzucchelli JTL, Hadachi SM, Guilhoto LMFF, Acquesta AL, et al. Neonatal screening for severe combined immunodeficiency in Brazil. *J Pediatr (Rio)*. 2016; 92: 374-80.
- Kanegae MPP, Barreiros LA, Sousa JL, Brito MAS., Oliveira-Junior EB, Soares LP et al. Newborn screening for Severe combined immunodeficiencies using TRECs and KRECs: second pilot study in Brazil. *Rev. paul. pediatr*. 2017; 35(1):25-32.
- Khan R, Chan AK, Mondal TK, Paes BA. Patent foramen ovale and stroke in childhood: A systematic review of the literature, *Eur J of Paediatr Neurology*. 2016; 20(4): 500-511.
- Kim MS, Lapkouski M, Yang W, Gellert M. Crystal structure of the V(D)J recombinase RAG1–RAG2. *Nature*. 2015; 518, 507–511.
- Kubiak C, Jyonouchi S, Kuo C, Garcia-Lloret M, Dorsey MJ, Sleasman J, et al. Fiscal Implications of Newborn Screening in the Diagnosis of Severe Combined Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014 Nov-Dec;2(6):697-702.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.

Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, Andruszewski K, Abbott JK, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA*. 2014;312(7):729-38.

Kwan A, Puck JM. History and current status of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Semin Perinatol*. 2015; Apr;39(3):194-205.

Leiva LE, Bezrodnik L, Oleastro M, Condino-Neto A, Costa-Carvalho BT, Grumach AS, et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: proceedings of the Second Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID) Advisory Board. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2011; 39:106---10.

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.

Mazzucchelli JT, Bonfim C, Castro GG, et al. Severe combined immunodeficiency in Brazil: management, prognosis, and BCG-associated complications. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2014;24(3):184-91.

Meyts I, Aksentijevich I. Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (DADA2): updates on the phenotype, genetics, pathogenesis, and treatment. *J Clin Immunol*. 2018; p-1-10.

Modell V, Gee B, Lewis DB, Orange JS, Roifman CM, Routes JM, et al. Global study of primary immunodeficiency diseases (PI) --- diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation. *Immunol Res*. 2011;51:61-70.

Modell V, Knaus M, Modell F. An analysis and decision tool to measure cost benefit of newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID) and related T-cell lymphopenia. *Immunol Res*. 2014; 60:145–152

Modell V, Quinn J, Orange JS, Notarangelo LD, Modell F. Primary immunodeficiencies worldwide: an update overview from the Jeffrey Modell Centers Global Network. *Immunol Res*. 2016; Jun;64(3):736-53.

Moens LN, Falk-Sorqvist E, Asplund AC, Bernatowska E, Smith CI, Nilsson M. Diagnostics of primary immunodeficiency diseases: a sequencing capture approach. *PLoS One* 2014;9:e114901.

Moraes-Pinto MI, Ono E, Santos-Valente EC, Almeida LC, de Andrade PR, Dinelli MIS, et al. Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus-unexposed Brazilian individuals from birth to adulthood. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(8):989:998.

Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, et al. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards. *J Pediatr*. 2009;155(6):829–833.

Moshous D, Callebaut I, Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calva M, Le Deist F, et al. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human Severe Combined Immunodeficiency. *Cell*. 2001; 105:177-186.

Navon Elkan P, Pierce SB, Segel R, Walsh T, Barash J, Padeh S, et al. Mutant adenosine deaminase 2 in a polyarteritis nodosa vasculopathy. *N Engl J Med*. 2014;370(10):921–31.

Niemela JE, Puck JM, Fischer RE, Fleisher TA, Hsu AP. Efficient detection of thirty-seven new IL2RG mutations in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2000; 95:33-38.

Nijman IJ, van Montfrans JM, Hoogstraat M, Boes ML, van de Corput L, Renner ED, et al. Targeted next-generation sequencing: A novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:529-34.

Norouzi S, Aghamohammadi A, Mamishi S, Rosenzweig SD, Rezaei N. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) complications associated with primary immunodeficiency diseases. *J Infect*. 2012;64(6):543-54.

Notarangelo LD, Giliani S, Mella P, Schumacher RF, Mazza C, Savoldi G, et al. Combined immunodeficiencies due to defects in signal transduction: defects of the gamma-c-JAK3 signaling pathway as a model. *Immunobiology*. 2000; 202(2):106–119.

- Notarangelo LD: Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125 (2 Suppl 2):S182–S194.
- Notarangelo LD, Villa A, Schwartz K. RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11:435–42.
- O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell*. 2001; 8:1175–1185.
- Ochs HD & Hitzig WH. History of primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012; 12:577–587.
- Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics*. 2011; 63:417–428.
- Olbrich P, de Felipe B, Delgado-Pecellin C, Rodero R, Rojas P, Aguayo J, et al. A first pilot study on the neonatal screening of primary immunodeficiencies in Spain: TRECS and KRECS identify severe T- and B-cell lymphopenia. *An Pediatr (Barc)*. 2014;81(5):310–317.
- Pai SY, Logan BR, Griffith LM, Buckley RH, Parrott RE, Dvorak CC, et al. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000–2009. *N Engl J Med*. 2014; 371:434–46.
- Palmer K, Green TD, Roberts JL, Sajaroff E, Cooney M, Parrott R, et al. Unusual clinical and immunologic manifestations of transplacentally acquired maternal T cells in severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:423–8.
- Pannicke U, Baumann B, Fuchs S, Henneke P, Rensing-Ehl A, Rizzi M, et al. Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *New Engl J Med*. 2013; 369:2504–14.
- Pannicke U, Honig M, Hess I, Friesen C, Holzmann K, Rump EM, et al. Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. *Nat Genet*. 2009;41:101–105.
- Pannicke U, Honig M, Schulze I, Rohr J, Heinz GA, Braun S, et al. The most frequent DCLRE1C (ARTEMIS) mutations are based on homologous recombination events. *Hum Mutat*. 2010; 31:197–207.
- Pasic S, Vujic D, Veljkovic D, Slavkovic B, Mostarica-Stojkovic M, Minic P, et al. Severe Combined Immunodeficiency in Serbia and Montenegro between years 1986 and 2010: a single-center experience. *J Clin Immunol*. 2014; 34(3):304–8.
- Patel KP, Kwan A, Muskat M, Church JA, Dorsey MJ, Puck JM. DiGeorge syndrome found by SCID newborn screening in California. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:AB163.
- Patel DR, Yu H, Wong L-JC, Lupski JR, Seeborg FO, Rider NL, et al. Linking newborn severe combined immunodeficiency screening with targeted exome sequencing. A case report. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017; 5(5):1442–1444.
- Pepper AE, Buckley RH, Small TN, Puck JM. Two mutational hotspots in the interleukin-2 receptor gamma chain gene causing human X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 1995;57:564–571.
- Picard C., Bobby Gaspar H., Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L., 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(1), 96–128.
- Puck, JM. Laboratory technology for population-based screening for severe combined immunodeficiency in neonates: the winner is T-cell receptor excision circles. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2012; 129: 607–616.
- Puck JM et al. (in name of the SCID Newborn Screening Working Group). Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: steps towards implementation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120(4): 753–5.
- Puck JM. Neonatal screening for severe combined immune deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007; 7(6):522–7.
- Puck JM, Pepper AE, Henthorn PS, Candotti F, Isakov J, Whitwam T, et al. Mutation analysis of IL2RG in human

X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood*. 1997; 89:1968-1977.

Recio MJ, Moreno-Pelayo MA, Kiliç SS, Guardo AC, Sanal O, Allende LM, et al. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J Immunol*. 2007;178(4):2556-64.

Regueiro JR, T. Español. CD3 and CD8 deficiencies. In *Primary Immunodeficiency Diseases, a Molecular and Genetic Approach*, 2nd Ed. H. D. Ochs, C. I. Edward Smith, and J. M. Puck, eds. Oxford University Press, New York. 2007; pp. 216–226.

Rieux-Laucat F, Bahadoran P, Brousse N, Selz F, Fischer A, Le Deist F, et al. Highly restricted human T-cell repertoire in peripheral blood and tissue-infiltrating lymphocytes in Omenn's syndrome. *J Clin Invest* 1998;102:312-321.

Rosario-Filho, N. A., Jacob, C. M., Sole, D., Condino-Neto, A., Arruda, L. K., Costa-Carvalho, B., et al. (2013). Pediatric allergy and immunology in Brazil. *Pediatric Allergy and Immunology*, 24(4), 402-409. doi:10.1111/pai.12069

Routes J, Verbsky J. Newborn screening for Severe Combined Immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2018; 18:34.

Rowe JH, Delmonte OM, Keles S, Stadinski BD, Dobbs AK, Henderson LA, et al. Patients with *CD3G* mutations reveal a role for human CD3 γ in Treg diversity and suppressive function. *Blood*. 2018; 131:2335-2344.

Rozmus J, Junker A, Laffin M, Thibodeau L, Grenier D, Turvey SE, et al. Severe Combined Immunodeficiency (SCID) in Canadian children: a national surveillance study. *J Clin Immunol*. 2013; 33:1310-1316.

Sato T, Okano T, Tanaka-Kubota M, Kimura S, Miyamoto S, Ono S, et al. Novel compound heterozygous mutations in a Japanese girl with Janus kinase 3 deficiency. *Pediatrics International*. 2016; 58:1076–1080.

Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014 Apr;11(4):361-2.

Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, Pannicke U, Li Z, Lindner D, et al. RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* 1996; 274:97-9.

Shearer W, Dunn E, Notarangelo L, Dvorak C, Puck J, Logan B, et al. Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium experience. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133:1092–8.

Signorini, S. Imbert L, Pirovano S, Villa A, Facchetti F, Ungari M, et al. Intrathymic restriction and peripheral expansion of the T-cell repertoire in Omenn syndrome. *Blood*. 1999; 94, 3468–3478.

Somech R, Etzioni A. A call to include severe combined immunodeficiency in newborn screening program. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(1): e0001.

Somech R, Lev A, Simon AJ, Korn D, Garty BZ, Amaraglio N, et al. Newborn screening for severe T and B cell immunodeficiency in Israel: a pilot study. *Isr MedAssocJ*. 2013;15(8):404–409.

Sottini, A, Ghidini C, Zanotti C, Chiarini M, Caimi L, Lanfranchi A, et al. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clin Immunol*. 2010; 136(2): 217-27.

Stepensky P, Keller B, Shamriz O, NaserEddin A, Rumman N, Weintraub M, et al. Deep intronic mis-splicing mutation in *JAK3* gene underlies T–B+*NK*– severe combined immunodeficiency phenotype. *Clin Immunol*. 2016; 163(2): 91-95.

Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:179-205.

Sullivan KE. DiGeorge Syndrome/Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome. *Current Science Inc*. 2001; 1:438–444.

Tobler R, Cottier H. Familial lymphopenia with agammaglobulinemia & severe moniliasis: the essential lymphocytophthisis as a special form of early childhood agammaglobulinemia. *Helv Paediatr Acta* 1958; 13:313–338;

- Touzot F, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Cavazzana M. Gene therapy for inherited immunodeficiency. *Expert Opin Biol Ther.* 2014; 14(6):789–98.
- van Zelm MC, Van der Burg M, Langerak AW, van Dongen JJ. PID Comes Full Circle: Applications of V(D)J Recombination Excision Circles in Research, Diagnostics and Newborn Screening of Primary Immunodeficiency Disorders. *Front Immunol.* 2011; 4(2):12.
- Verbsky JW, Baker MW, Grossman WJ, Hintermeyer M, Dasu T, Bonacci B, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency; the Wisconsin experience (2008–2011). *J Clin Immunol.* 2012; 32(1):82–8.
- Villa A, Marrella V, Rucci F, Notarangelo LD. Genetically determined lymphopenia and autoimmune manifestations. *Curr Opin in Immunol.* 2008; 20:318–324.
- Villa A, Santagata S, Bozzi F, Imberti L, Notarangelo LD. Omenn Syndrome: a disorder of Rag1 and Rag2 genes. *J Clin Immunol.* 1999; 19(2): 87-97.
- Vogel BH, Bonagura V, Weinberg GA, Ballow M, Isabelle J, DiAntonio L, et al. Newborn screening for SCID in New York State: experience from the first two years. *J Clin Immunol* (2014) 34(3):289–303. doi:10.1007/s10875-014-0006-7
- Walshe D, Gaspar HB, Thrasher AJ, Cale CM, Gilmour KC. Signal transducer and activator of transcription 5 tyrosine phosphorylation for the diagnosis and monitoring of patients with severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; Feb;123(2):505-8.
- Wiginton DA, Kaplan DJ, States JC, Akeson AL, Perme CM, Bilyk IJ, et al. Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase. *Biochemistry* 1986; 25:8234–8244.
- Wilson JM & Jungner YG. Principles and Practice of Screening for Disease. *Public Health Papers.* 1968;7-151 volume 34.
- Woodbine L, Neal JA, Sasi NK, Shimada M, Deem K, Coleman H, et al. PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *The Journal of Clinical Investigation.* 2013; 123(7):2969–2980.
- Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of Mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013;369:1502-11.
- Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* 2014;312: 1870-9.
- Zelazko M, Carneiro-Sampaio M, Cornejo de Luigi M, Garciade Olarte D, Porras Madrigal O, Berron Perez R, et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: first report from eight countries participating in the LAGID Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases. *J Clin Immunol.* 1998;18:161---6.
- Zhou Q, Yang D, Ombrello AK, Zavialov AV, Toro C, Zavialov AV, et al. Early-onset stroke and vasculopathy associated with mutations in ADA2. *N Engl J Med.* 2014; 370(10):911–20.