

# IMUNODEFICIÊNCIA PRIMÁRIA POR DÉFICE DE ZAP-70

L.T. BARATA, R. HENRIQUES, C. HIVROZ, E. JOUANGUY, A. PAIVA, A. M. FREITAS,  
H. BREDÁ COIMBRA, A. FISCHER, H. CARMONA DA MOTA

Serviço de Medicina. Hospital Pediátrico. Coimbra.

Unidade de Imunoalergologia. Serviço de Pneumologia. Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra.

Centro de Histocompatibilidade do Centro. Universidade de Coimbra. Coimbra.

Imunologie et Hématologie. Hôpital Necker Enfants Malades. Paris. França.

## RESUMO

Os autores apresentam o caso de uma criança com infecções de repetição desde os quatro meses, incluindo uma pneumonia bilateral por *Pneumocystis carinii* e varicela arrastada. Os valores séricos das imunoglobulinas (aos dez meses), bem como os de células B eram normais. Apresentava leucocitose linfocítica persistente, quase ausência de células CD8+ e consequente elevação da relação CD4/CD8. A percentagem de células T activadas e a expressão de HLA classe I eram normais. Estudos de proliferação, activação e síntese de IL-2 em células T mostraram défice de transdução de sinal pelo complexo TCR/CD3. A sequenciação de cDNA de ZAP-70 revelou uma mutação e não se detectou a proteína ZAP-70 em células T. O seu défice está associado a uma imunodeficiência rara, com ausência de células T CD8+ e défice funcional de células T. A criança está clinicamente bem e imunologicamente reconstituída, sete meses após transplante de medula óssea.

*Palavras-chave: imunodeficiência primária, ZAP-70, défice CD8, pneumonia por Pneumocystis carinii*

## SUMMARY

### Primary immunodeficiency due to ZAP-70 deficiency

The authors present the case of a child with recurrent infections since the age of 4 months, including bilateral pneumonia by *Pneumocystis carinii* and protracted varicella. Serum immunoglobulin values (when 10 months old), and B cell values were normal. There was persistent lymphocytic leucocytosis, near absence of CD8+ cells, and an increased CD4/CD8 ratio. The percentage of activated T cells and the expression of HLA class I were normal. Proliferation, activation and IL-2 synthesis studies in T cells showed a TCR/CD3-associated signal transduction deficit. ZAP-70 cDNA sequencing showed a mutation, and no ZAP-70 protein was detected in T cells. ZAP-70 deficiency is associated with a rare immune deficiency with absence of CD8+ T cells as well as a functional deficiency in T cells. Seven months after bone marrow transplantation the child is clinically well and immunologically recovered.

*Key words: primary immunodeficiency, ZAP-70, CD8 deficit, pneumocystis carinii pneumonia*

## INTRODUÇÃO

A deficiência de ZAP-70 está associada a uma imunodeficiência primária muito rara, havendo apenas nove casos descritos a nível mundial<sup>1,3-6</sup>. A ZAP-70 é uma tirosinoquinase, uma proteína que participa na transdução do sinal a partir do complexo constituído pelo receptor de células T (TCR) e o CD3 (Figura 1)<sup>7</sup>. É um

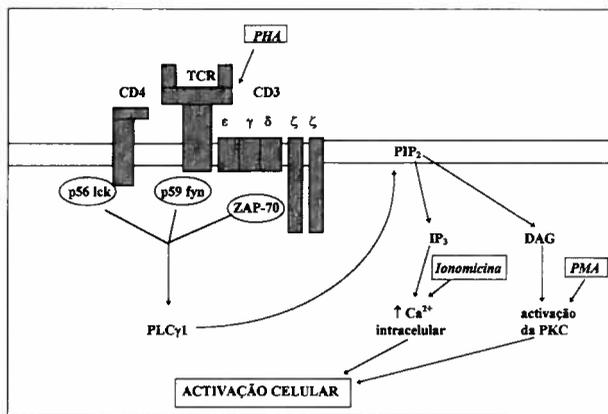


Fig. 1 - Esquema simplificado da transdução de sinal em células T. A estimulação celular através do complexo do receptor de células T (TCR) e molécula CD3 dá início a uma cascata bioquímica que culmina na activação celular (e consequente síntese de citocinas e proliferação). Para a correcta transdução do sinal através do TCR/CD3, é necessária a presença de tirosinoquinases como a *fyn*, *lck* ou ZAP-70. Mitógenos como a fitohemaglutinina (PHA) utilizam o TCR para a transdução do sinal de activação. Por outro lado, ésteres de forbol (PMA) associados a inomicina, ultrapassam a cascata bioquímica inicial e conduzem à activação celular.

factor crucial para o desenvolvimento intra-tímico de células T CD8<sup>+</sup> mas não T CD4<sup>+</sup><sup>6</sup>, embora seja importante para a activação de células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup><sup>8</sup>. Não parece afectar funcionalmente outras células, embora também seja expressa em células NK<sup>6,8</sup>. Apesar do pequeno número de casos diagnosticado, o padrão de transmissão genética parece ser autossómico recessivo<sup>4,5</sup>. Apresenta-se o que julgamos ser o primeiro caso de défice de ZAP-70 descrito em Portugal.

## CASO CLÍNICO

Criança do sexo feminino, com atraso de crescimento desde os três meses de idade, apresentando valores inferiores ao percentil 5 para a altura e peso. Aos quatro meses de idade, teve um episódio de infecção respiratória superior febril, com boa resposta à amoxicilina (oito dias). Dois dias após suspensão da antibioterapia, surgiu quadro de dispneia não sibilante, febril, associada a má-perfusão periférica, necessitando de recorrer ao

Serviço de Urgência do Hosp. Pediátrico. A radiografia do tórax apresentava padrão compatível com pneumonia

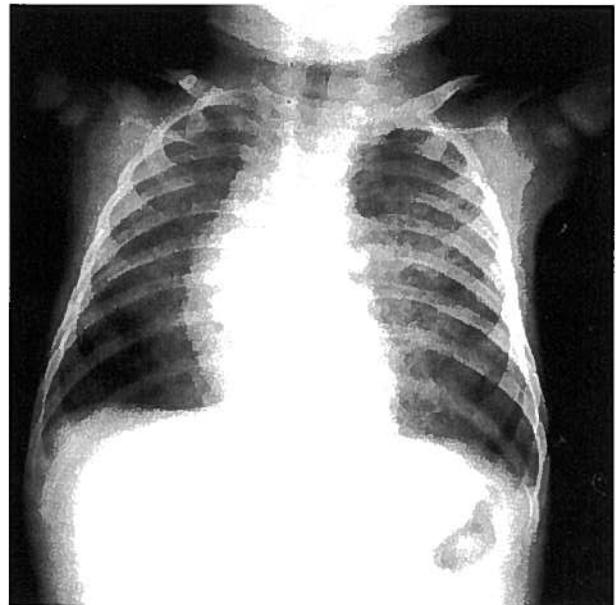


Fig. 2 - Radiografia torácica mostrando infiltrado intersticial bilateral, posteriormente comprovado corresponder a pneumonia por *Pneumocystis carinii*.

intersticial bilateral (Figura 2). O exame da expectoração foi francamente positivo para *Pneumocystis carinii* e *Mycoplasma hominis*. A virologia das secreções respiratórias foi negativa para Influenza A e B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Adenovirus e RSV. Iniciou-se terapêutica com claritromicina, com boa resposta. Foi igualmente diagnosticada estomatite herpética a 4 Jan. 97, que resolveu com acyclovir. No sétimo dia de internamento, surgiu um episódio de diarreia febril, sem muco ou pus. O exame directo das fezes foi negativo para *Giardia*, e as coproculturas foram negativas para *Cryptococcus*. Sob cotrimoxazol, verificou-se resolução do quadro. Teve alta, assintomática, após 12 dias de internamento. Uma semana depois, surgiu novo episódio de estomatite (que resolveu com desinfecção local) e febre elevada em quadro de CRS. As culturas das secreções respiratórias foram positivas para *S. aureus*. Boa resposta a amoxicilina + ácido clavulânico. Três dias depois, teve episódio de dispneia sibilante moderada, com boa resposta a nebulização de salbutamol. Um mês depois, desenvolveu quadro de gastroenterite aguda associada a otite média aguda. Boa resposta ao cotrimoxazol. A 7 de Abril de 1997, apesar de isolada em casa, não indo ao infantário por iniciativa dos pais, surgiu quadro exuberante de varicela, sem complicações orgânicas, mas demonstrando uma resposta lenta ao acyclovir. O caso desta criança

foi discutido para avaliação de um provável déficit imunitário. É de referir que, ao exame objectivo, eram palpáveis gânglios linfáticos, havia amígdalas de tamanho normal e cicatriz de BCG visível.

IV Gesta; II Para. Parto eutócico. Sem problemas neonatais. Vacinada com BCG no período neonatal. Havia sido vacinada com a primeira dose de DTP e VAP. Os pais eram jovens, não consanguíneos. Mãe com história de três abortos de repetição. Irmão mais velho falecido aos dez meses de idade por pneumonia grave, anemia e má-nutrição, após vários episódios de infecções pulmonares; foram excluídas as hipóteses de fibrose quística, doença celíaca, linfoma, leucemia, parasitose ou malformação intestinal e SIDA.

Os hemogramas, mostraram leucocitose (12,000 a 20,000 células/mm<sup>3</sup>) linfocítica franca, mesmo na ausência de manifestações clínicas; neutropenia ligeira, sem anemia ou trombocitopenia. Bioquímica demonstrando *perfis* hepático e renal e ionograma, proteinémia total e albuminémia normais. Serologia para HIV, CMV e Toxoplasma: Negativa. C3, C4 e CH100: Normal.

Imunoglobulinas séricas (7/1/97; 4M de idade): níveis baixos de IgG (2.0 g/l; N=3-10), com valores normais de IgG1 (1.6 g/l), mas baixos de IgG2 (<0.08 g/l; N=0.23-1.47), IgG3 (0.03 g/l; N=0.04 a 1.00), e IgG4(0.01 g/l; N=0.01 a 0.14). Estes valores eram normais aos 10 M. Isohemaglutininas (7/1/97) (doente: A Rh+): títulos normais de anticorpos anti-B. Imunoglobulinas de superfície (23/1/97): k (38.4%) e l (59.9%): normais; IgG (2.3%) normal. Linfócitos B do sangue periférico: Sem alterações totais ou percentuais. Expressão normal de moléculas de activação (CD23). Expressão normal de HLA-DR.

Expressão de moléculas HLA classe I: Normal

Estudos fenotípicos no sangue periférico: Linfócitos T totais (CD3+) = 60.5 % (N) ; Linfócitos T CD4+ = 60 % (N = 37 - 46); Linfócitos T CD8+ = 0.9 % (N = 26 - 36); relação CD4/CD8 = 67 % (N = 0.9 to 2.3); Células CD16/CD56 (NK): normais.

Proliferação celular T: Baixa proliferação em resposta ao mitogénio fitohemaglutinina (PHA):- 303 cintilações por minuto (c.p.m.); testemunha - 47,096. Proliferação normal com ésteres de forbol (PMA) + ionomicina (13.738 c.p.m.). Expressão do receptor para a IL-2 (CD25) (Figura 3): a estimulação com PHA + IL-2 não induziu expressão de CD25, ao contrário da estimulação com PMA + ionomicina, a qual induziu um aumento significativo de expressão. Expressão de interleucina-2 (IL-2) intracelular: a estimulação celular com PHA + IL-2 não induziu alterações detectáveis na expressão de IL-2,

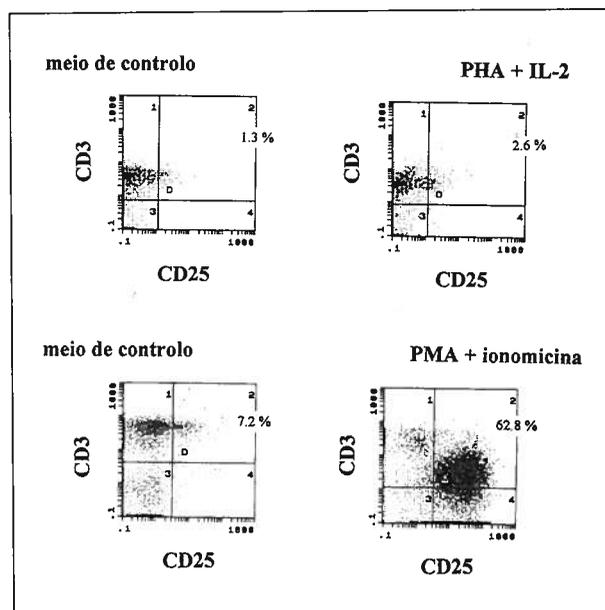


Fig. 3 - Análise por citometria de fluxo da expressão de um marcador de activação celular T (CD25) em células T CD3+. Incubação com meio de controlo (painéis A e C), PHA e IL-2 (painel B), ou PMA e ionomicina (painel D). O quadrante 2 de cada painel corresponde a células CD3+ positivas para CD25, cuja percentagem é mostrada.

em relação ao meio testemunha; no entanto, a estimulação com PMA + ionomicina aumentou significativamente a expressão de IL-2.

No Serviço de Alain Fischer (Imunologie et Hématologie, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris), Claire HIVROZ realizou os seguintes estudos (Junho/Julho 1997):

Estudos de citólise por células NK: Normais. Immunoblotting de lisados de células T: detecção das tirosinoquinases p56lck e p59fyn, e da cadeia  $\zeta$  de CD3, mas ausência de expressão da tirosinoquinase ZAP-70 (Figura 4). Estudos de fosforilação em células T: muito baixos níveis de fosforilação após estimulação com anticorpos anti-CD3. Estudos de mobilização de cálcio intracelular: sem mobilização após estimulação com anticorpos anti-CD3. Sequenciação de cDNA de ZAP-70 clonado: revelou uma mutação consistindo em deleção de 13 pares de bases.

Os resultados dos exames efectuados confirmaram o diagnóstico de imunodeficiência primária combinada por déficit de ZAP-70. O único tratamento curativo é o transplante de medula óssea. Iniciou administração endovenosa de imunoglobulinas em altas doses (IEAD) e antibioterapia à mínima suspeita, até à realização de transplante de medula, o qual foi efectuado no Serviço de Alain Fischer em Agosto de 1997. A evolução tem sido

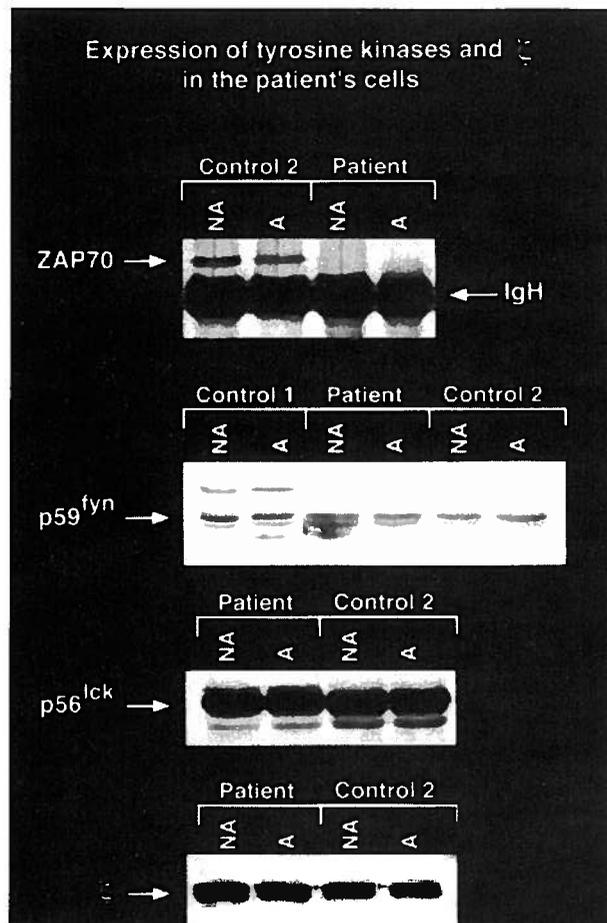


Fig. 4 - Immunoblotting de lisados de células mononucleares do sangue periférico demonstrando ausência de expressão correspondente à tirosinoquinase ZAP-70 na criança em estudo. A expressão das outras tirosinoquinases p59<sup>fyn</sup> e p56<sup>lck</sup>, bem como da cadeia z do complexo TCR/CD3 era semelhante à encontrada em células T de controlos normais. IgH: cadeia pesada de imunoglobulinas.

favorável, embora mantenha discretos sinais cutâneos, compatíveis com reacção de enxerto-contra-hospedeiro, sem componente sistémico e com boa resposta à corticoterapia. Houve já re-estabelecimento periférico de todas as linhas celulares hematológicas, e é positiva a expressão de ZAP-70. Dada a transmissão autosómica recessiva, foi feito aconselhamento genético à família.

## DISCUSSÃO

Perante o quadro clínico desta criança, particularmente a pneumonia bilateral por *P. carinii* e o episódio exuberante e arrastado de varicela, bem como o compromisso celular T, considerámos a hipótese de uma imunodeficiência primária (IDP) combinada celular B e T, após exclusão de imunodeficiência secundária, p.e. SIDA. O facto de haver uma quase ausência selectiva de células T

CD8+, orientou o diagnóstico para a possibilidade de um défice de ZAP-70<sup>1</sup> ou de TAP-2<sup>2</sup>. No entanto, tivemos de considerar diagnósticos alternativos, de outros tipos de IDP combinada, visto os níveis de imunoglobulinas estarem baixos e haver neutropenia ligeira, nas primeiras observações.

A expressão normal de HLA classe I nas células desta criança excluiu a hipótese da linfopenia CD8 ser devida a um défice de TAP-2<sup>2</sup>. Pensámos nesta situação, porque a ausência de expressão de moléculas HLA de classe I impede a apresentação de antígenos a células T CD8+, o que leva a grande redução dos seus valores. De qualquer forma, esta situação é extremamente rara na ausência de alterações concomitantes da expressão de HLA classe II, o que levaria a redução do número de células CD4+ circulantes<sup>2</sup>. Nesta criança, não havia linfopenia CD4 e a expressão de HLA classe II era normal.

Por outro lado, a ausência de expressão de ZAP-70 nos lisados de linfócitos T desta criança sugeriu fortemente o diagnóstico deste défice, tendo sido posteriormente confirmado por análise de sequenciação de cDNA clonado, a qual permitiu detectar a mutação envolvida nesta deficiência. A colaboração do Serviço de Fischer foi crucial para a confirmação do diagnóstico. Tal como em todos os casos de défice de ZAP-70 previamente descritos<sup>1,3-5</sup>, havia franca linfopenia de células T CD8+ no sangue periférico e alterações funcionares em células T CD4+ e CD8+. No entanto, tratando-se de um subtipo de imunodeficiência combinada, será de esperar algum défice funcional das imunoglobulinas produzidas, mesmo que em termos quantitativos tenham valores normais. No caso desta criança, os níveis de anticorpos naturais funcionais (p.e. isohemaglutininas) eram normais, mas não foi possível avaliar respostas específicas a novas imunizações. Optou-se então por administrar imunoglobulinas endovenosas em altas doses.

No défice de ZAP-70, a transdução do sinal de activação através do complexo TCR/CD3 não se efectua quando se usam anticorpos anti-CD3, ou antígenos ou mitogénios que se liguem a este complexo (Figura 1)<sup>3,7</sup>. Não houve, por isso, expressão de CD25, síntese de IL-2 ou proliferação celular T, quando se estimularam as células com fitohemaglutinina (com ou sem IL-2), como observado nesta doente (Figura 2). No entanto, se se ultrapassarem os primeiros passos da transdução do sinal, com ésteres de forbol (PMA) e ionomicina, há transdução normal (Figuras 1 e 2). A falha na transdução precoce deve-se à falta selectiva de ZAP-70, pois a expressão das restantes tirosinoquinases era normal nesta doente (Figura 4).

É interessante o facto de a vacinação com agentes vivos nesta doente (BCG e VAP) não ter estado associada a complicação por infecção sistémica por estes agentes, como descrito noutras imunodeficiências celulares. A incidência de infecções disseminadas é de facto superior na população com imunodeficiências celulares T ou combinadas<sup>9</sup>. No entanto, a possibilidade de função imunológica residual, através da activação das células T por mecanismos que não usem o TCR/CD3, bem como a ausência de alteração funcional nas células NK poderão explicar a vacinação sem complicações. Em casuísticas anteriores, verificou-se infecção disseminada por BCG apenas em 20% a 35% de doentes com IDP combinadas<sup>10,11</sup>, e parecem ser menos frequentes no caso de vacina anti-poliomielite<sup>11</sup>.

Não tratada, a deficiência de ZAP-70 conduz à morte por infecções graves de repetição, nomeadamente respiratórias e suas complicações. Isto poderá ter sucedido ao irmão mais velho da doente. O tratamento final deverá ser o transplante de medula, que se tem associado a bons resultados, como parece ser o caso desta criança.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Ângelo Barroso, Helena Estevão e Coelho, a sua relevante contribuição para a discussão deste caso clínico, bem como ao pessoal de enfermagem e à secretária clínica (D. Ana) pelo valioso trabalho de apoio.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ROIFMAN CM, HUMMEL D, MARTINEZ-VALDEZ H et al: Depletion of CD8+ cells in human thymic medulla results in selective immune deficiency. *J Exp Med* 1989; 170: 2177-82
2. GRISCELLI C, LISOWSKA-GROSPIERRE B, MACH B: Combined immunodeficiency with defective expression in MHC class II genes. *Immunodef Rev* 1989; 1: 135-53
3. ELDER ME, HOPE TJ, PARSLOW TG, UMETSU DT, WARA DW, COWAN MJ: Severe combined immunodeficiency with absence of peripheral blood CD8+ T cells due to ZAP-70 deficiency. *Cell Immunol* 1995; 165: 110-7
4. CHAN AC, KADLECEK TA, ELDER ME et al: ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994; 264: 1599-601
5. ARPAIA E, SHAHAR M, DADI H, COHEN A, ROIFMAN CM: Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking ZAP-70 kinase. *Cell* 1994; 76: 947-58
6. ROIFMAN CM: A mutation in ZAP-70 protein tyrosine kinase results in a selective immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1995; 15 (Suppl.): 52S-62S
7. HATADA MH, LU X, LAIRD ER et al: Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 1995; 377: 32 - 8
8. GELFAND EW, WEINBERG K, MAZER BD et al: Absence of ZAP-70 preventssignalling through the antigen receptor on peripheral blood T cells but not on thymocytes. *J Exp Med* 1995; 182: 1057-66
9. Department of Health, Welsh Office, Scottish Office Department of Health, DHSS (Northern Ireland). Indications and Contraindications. In: Salisbury D.M., Begg N.T., eds. 1996 Immunisation against Infectious Diseases. London: HMSO 1996: 19-28
10. GRUMACH AS, DUARTE AJ, BELLINATI-PIRES R et al: Brazilian report on primary immunodeficiencies in children: 166 cases studied over a follow-up time of 15 years. *J Clin Immunol* 1997; 17: 340-345
11. STEPHAN JL, VLEKOVA V, LE DEIST F et al: Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients. *J Pediatr* 1993; 123: 564-572