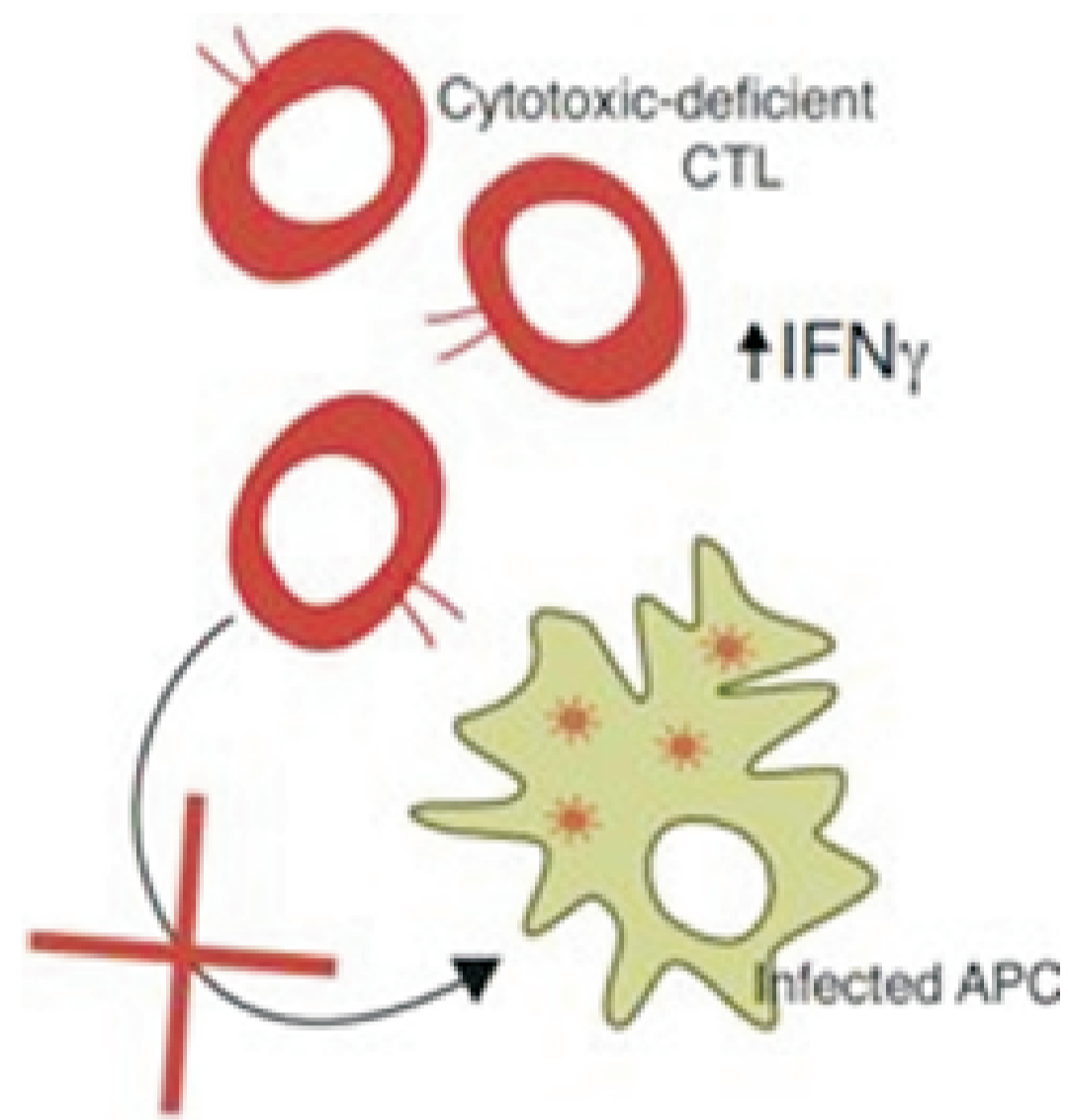


## INTRODUÇÃO

- Linfohistiocitose hemofagocítica (HLH) é uma imunodeficiência rara e fatal, caracterizada pela ativação exacerbada de linfócitos/macrófagos, células-T CD8 e NK deficientes;
- HLH ocorre de duas formas, (i) primária, mais rara e a mais precoce clinicamente e, (ii) secundária, com perfil clínico mais tardio na infância.
- HLH primária é na sua grande maioria de origem familiar e está associada a mutações nos genes *PRF1*, *UNC13D*, *STX11* e *STXBP2* associados à citotoxicidade de linfócitos, afetando o transporte de perforina ou vesículas intracelulares (Figura 1).
- HLH secundária é desencadeada por várias condições, como infecções, imunodeficiências, doenças reumáticas e neoplasias. (Henter et al., 2007; LIMA et al., 2018).



- FHL2
  - FHL3
  - FHL4
  - FHL5
- PRF1*  
*UNC13D*  
*STX11*  
*STXBP2*

Figura 1: Linfócitos deficientes para eliminar as células infectadas e/ou apresentadoras de antígenos induz ativação persistente de linfócitos-T CD8 e a secreção de altos níveis de IFN-γ e ativação de macrófagos na HLH (Sepulveda & de Saint Basile, 2017)

Tabela 1: Critérios para diagnóstico de HLH

Febre persistente
Hepatosplenomegalia
Bicitopenia
- Hemoglobina (<9g/dL)
- Plaquetas (< 100 x 10 <sup>9</sup> /L)
- Neutrófilos (<1 x 10 <sup>9</sup> /L)
Hipertrigliceridemia (>265 mg/dL) ou hipofibrinogenemia (<150 mg/dL)
Presença de hemofagocitose no baço, medula óssea, linfonodos ou fígado
Redução ou ausência da atividade de NK
Ferritina > 500 ug/L
Elevação de CD25s (sérico)

Tabela 2: Características clínicas e demográficas dos pacientes analisados para o gene *PRF1*.

Características	N (%)
<b>Idade(meses)</b>	<b>35 (100)</b>
< 6	4 (11,4)
6 ~ 12	5 (14,2)
> 12	26 (74,2)
<b>Sexo</b>	
Masculino	22 (62,8)
Feminino	13 (37,1)
<b>Leucometria (x10<sup>9</sup>/L)</b>	
< 5	15 (42,8)
5 ~ 10	7 (20)
≥10	12 (34,2)
<b>Hemoglobina</b>	
< 9	4 (11,4)
≥ 9	30 (85,7)
<b>Plaquetas</b>	
< 100000	25 (71,4)
≥ 100000	9 (25,7)
<b>Hepatosplenomegalia</b>	
Yes	22 (62,8)
No	13 (37,1)
<b>Região</b>	
Nordeste	25 (71,4)
Centro-Oeste	7 (20)
Sudeste	2 (5,7)
Sul	1 (2,8)

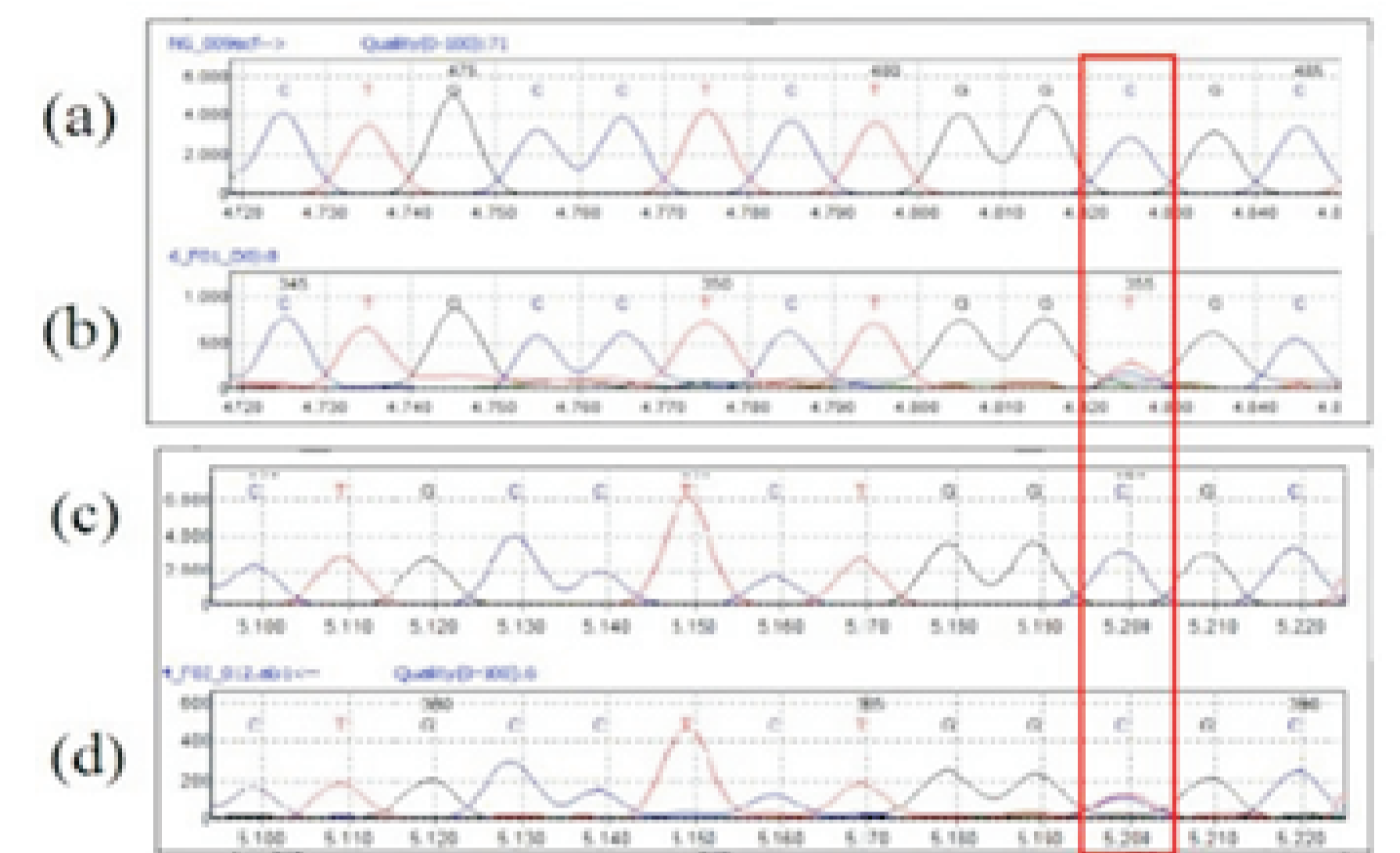


Figura 3: Sequenciamento de Sanger do exon 2 no gene *PRF1*, apresentando a alteração rs35947132, conferindo c.272 C>T e A91V. (a) Sequência referência da fita F (b) Sequência F do paciente 1. (c) Sequência referência da fita R. (d) Sequência R do paciente 1.

Tabela 3: Distribuição dos percentuais das populações celulares. NR: Não Realizado.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<b>Linfócitos Totais</b>	29	NR	56,9	10,5	45	3,4
<b>Linfócitos T (CD3 +)</b>	58	0,9	55,4	52,5	72,1	68,2
<b>CD4+</b>	58,2	NR	50,2	34	24,2	52,8
<b>CD8+</b>	37,3	NR	41,9	57,4	66,1	43
<b>CD4+CD8+</b>	0,4	NR	0,3	2,3	1,1	0,1
<b>CD4-CD8-</b>	3,4	NR	7,6	5,3	8,6	3,9
<b>NKs Totais</b>	17,9	NR	11	13,2	14,4	1
<b>NK1</b>	0,6	NR	7,8	2,9	0,7	NR
<b>NK2</b>	0,4	NR	2,1	0,4	1,1	NR
<b>NK3</b>	2,4	NR	4,6	9,6	7,0	NR
<b>NK4</b>	56,1	NR	78	40,2	60,5	NR
<b>NK5</b>	40,4	NR	7,5	46,9	30,7	NR
<b>Linfócitos B</b>	7,8	NR	34,8	2,2	11,8	29,5
<b>Monócitos</b>	1,7	NR	6	1,5	3,2	0,4
<b>Neutrófilos</b>	41,1	NR	23,8	68,2	20,3	53
<b>Eosinófilos</b>	2,2	NR	Ausente	0,4	0,2	Ausente

**Expressão de Perforina:** Houve redução da expressão de perforina em linfócitos CD8+ em P1, P2, P5 e P6. Além disso, redução da expressão de perforina células NK em P1, P2, P4, P5 e P6.

**Ensaio de degranulação NK:** Houve redução na capacidade de degranulação em P4.

Tabela 4: Expressão dos percentuais de Perforina em células T CD8+ e NK e de CD107a em células NK. NR: Não Realizado.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<b>CD8+ Perforina+</b>	1,5	0,9	61,1	23,9	0,2	1,8
<b>NK Perforina+</b>	29,8	64,5	84,7	43,4	0,9	55,6
<b>NK CD107a+</b>	NR	25	NR	7,1	NR	19

## CONCLUSÃO PARCIAL

Foi identificada uma alteração em *PRF1* em um paciente incluído em nossa série de casos. Também identificamos pacientes com expressão reduzida de Perforina em linfócitos T CD8 + e células NK, além de capacidade reduzida de degranulação de NK.

## PERSPECTIVAS

Analisar os pacientes com expressão reduzida de Perforina ou degranulação de NK em relação às mutações no *PRF1*;

Estudar as outras alterações moleculares nos genes *UNC13D*, *STX11* e *STXBP2*.

## OBJETIVOS

- Identificar mutações germinativas em *PRF1*, *UNC13D*, *STX11* e *STXBP2* em crianças brasileiras com suspeita de HLH, para estimar a frequência de distribuição de alelos variantes nessa população;
- Estabelecer um algoritmo de testes imunofenotípicos e funcionais para identificar as distribuições de populações celulares no sangue periférico (NK, monócitos, linfócitos, granulócitos e eosinófilos) e a ativação de células NK e T CD8;

## MATERIAL E MÉTODOS

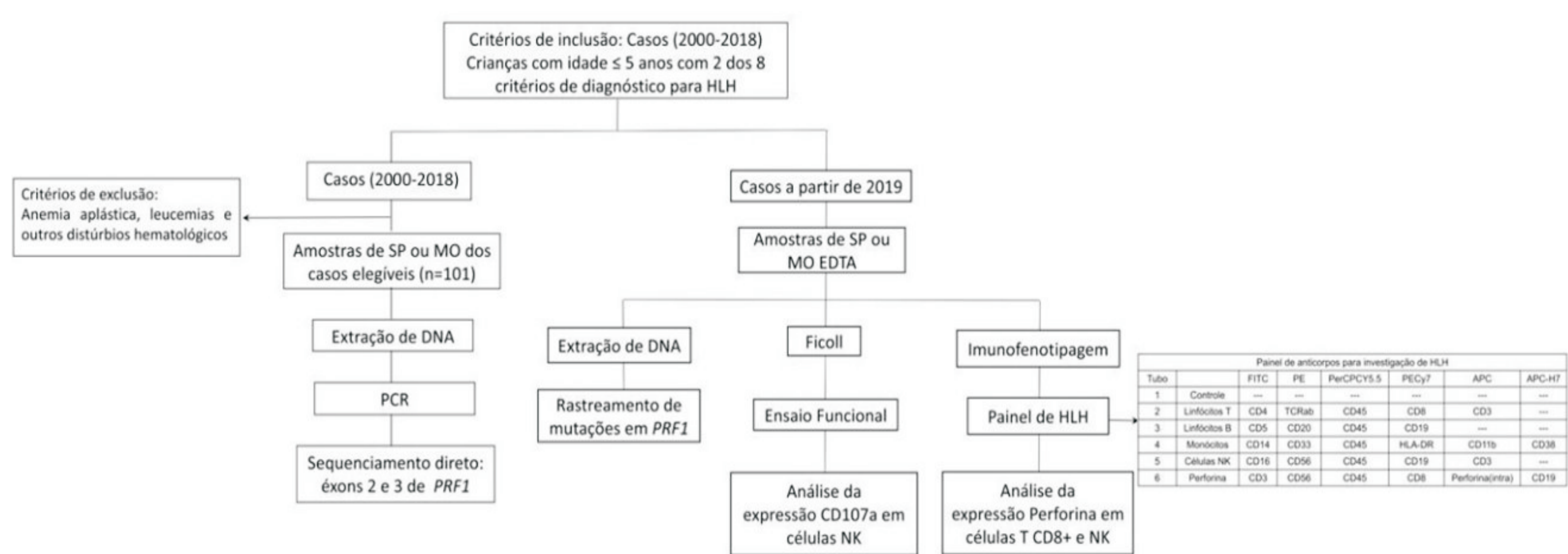


Figura 2: Fluxograma do estudo

## RESULTADOS

**Sequenciamento:** 35 pacientes foram avaliados quanto a presença de alterações em *PRF1*. As características clínicas dos pacientes estão descritas na Tabela 2. O sequenciamento identificou um paciente com a variante rs35947132. Essa mutação, no códon 272 consiste em uma troca de citosina por timina (c.272 C>T) que resulta em uma substituição de alanina por valina no aminoácido 91. Essa variante é descrita como associada à HLH (HOUSE et al., 2015) (Figura 3).