



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Daniela Figueiredo Pinto

Relatórios de Estágios e Monografia intitulada “Síndrome Wiskott-Aldrich: alterações da função das células do sistema imunológico” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Mariana Mergulhão, da Dra. Ana Leite e Silva e da Professora Doutora Maria Celeste Lopes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2020



# UNIVERSIDADE D COIMBRA

Daniela Figueiredo Pinto

Relatórios de Estágios e Monografia intitulada “Síndrome Wiskott-Aldrich: alterações da função das células do sistema imunológico” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Mariana Mergulhão, da Dra. Ana Leite e Silva e da Professora Doutora Maria Celeste Lopes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Outubro 2020

Eu, Daniela Figueiredo Pinto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015247861, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Síndrome Wiskott-Aldrich: alterações da função das células do sistema imunológico” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 20 de outubro de 2020.

Daniela Figueiredo Pinto

(Daniela Figueiredo Pinto)

## AGRADECIMENTOS

A Coimbra.  
A cidade que vou levar comigo para sempre.

Aos meus pais, por serem os melhores pais do mundo. Pelo apoio nos momentos bons e menos bons e por acreditarem sempre em mim.  
Às minhas irmãs, as melhores amigas que podia ter, pela infinita cumplicidade.  
Amo-vos.

À Bárbara, à Catarina, à Rute, pela amizade sem fim. Por todas os momentos, aventuras, dramas e conversas. Por estarem sempre lá. Tenho a certeza que estes cinco anos foram apenas o início.  
À Patrícia, por me mostrar o que é uma amizade pura e me motivar a ser uma pessoa melhor.  
À Inês Maia, pela presença, apoio e amizade incondicional. Uma afilhada para a vida.  
À Nicole e às Mestres, as eternas caloiras, pela companhia e bons momentos.  
À Inês Cruz, pelos nossos caminhos se terem cruzado.  
À Renata, por tudo e por nada.

A todos os meus amigos, pelos momentos vividos.  
A vida fica mais fácil com vocês.

À Professora Doutora Maria Celeste Lopes, pela compreensão e orientação.  
Às equipas da Labialfarma e da Farmácia Coimbra, pela partilha de conhecimentos e momentos inesquecíveis.

A todos vós,  
Obrigado.

## ÍNDICE

### **PARTE I - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA.....6**

Lista de Abreviaturas .....	7
1. Introdução.....	8
2. Labialfarma - Laboratório de produtos farmacêuticos e nutracêuticos S.A. ....	8
3. Análise SWOT .....	9
3.1. Ponto Fortes .....	9
3.1.1. Rotatividade pelas diferentes secções.....	9
3.1.2. Versatilidade/qualidade das tarefas .....	10
3.1.3. Aplicação prática de imensos conhecimentos teóricos do micf.....	11
3.1.4. Receção e integração numa equipa competente e acolhedora .....	11
3.1.5. Confiança/autonomia .....	11
3.2. Pontos Fracos .....	12
3.2.1. Duração em cada secção .....	12
3.2.2. Plano de estágio na produção .....	12
3.3. Oportunidades.....	13
3.3.1. Empresa especializada no mercado dos suplementos alimentares e produtos nutracêuticos.....	13
3.3.2. Extenso portfólio de produtos e formas farmacêuticas.....	13
3.3.3. Visitas de clientes.....	14
3.4. Ameaças .....	14
3.4.1. Pouco contacto com farmacêuticos na indústria farmacêutica .....	14
3.4.2. Pandemia.....	14
4. Conclusão.....	15
5. Referências bibliográficas .....	16

### **PARTE II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA .....17**

Lista de Abreviaturas .....	18
1. Introdução.....	19
2. Farmácia Coimbra .....	19
3. Análise SWOT .....	20
3.1. Pontos Fortes.....	20
3.1.1. Estruturação do plano de estágio.....	20
3.1.2. Horário de estágio.....	21
3.1.3. Integração numa equipa profissional e acolhedora .....	21
3.1.4. Autonomia/confiança .....	22
3.2. Pontos Fracos .....	22
3.2.1. Ausência da preparação de manipulados .....	22
3.3. Oportunidades.....	23
3.3.1. Realização de formações.....	23
3.3.2. Grande afluência e heterogeneidade de utentes .....	23
3.3.3. Prescrições manuais .....	23
3.4. Ameaças .....	24
3.4.1. Reduzida proximidade com o utente .....	24
3.4.2. Encerramento de alguns serviços farmacêuticos .....	24

4. Conclusão.....	25
<b>PARTE III - “SÍNDROME WISKOTT-ALDRICH: ALTERAÇÕES DA FUNÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO” .....</b>	<b>26</b>
Lista de Abreviaturas .....	27
Resumo .....	28
Abstract .....	29
1. Introdução.....	30
2. Síndrome Wiskott Aldrich .....	31
2.1. Caracterização genética .....	31
2.2. Correlação genótipo/fenótipo .....	31
2.3. Manifestações clínicas .....	33
2.4. Proteína do Síndrome de Wiskott Aldrich (WASp): Estrutura e função .....	34
3. WASp no sistema imunológico .....	36
3.1. WASp nas células de linhagem mielóide.....	37
3.2. WASp nas células dendríticas (DC) .....	39
3.3. WASp nas células natural killer (NK) .....	39
3.4. WASp nos linfócitos T .....	41
3.4.1. WASp nos linfócitos t auxiliares reguladores ( ) .....	43
3.4.2. WASp nos linfócitos t auxiliares foliculares (Tfh).....	44
3.5. WASp nos linfócitos B.....	45
3.5.1. WASp nos linfócitos B10.....	47
4. Estratégias terapêuticas.....	48
4.1. Terapêutica na imunodeficiência .....	48
4.2. Terapêutica na autoimunidade.....	49
4.3. Transplante de células estaminais hematopoéticas (HSCT).....	49
4.4. Terapia gênica .....	51
5. Conclusão.....	53
6. Referências bibliográficas .....	54

# PARTE I

## RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CQ** - Controlo de Qualidade

**IF** - Indústria Farmacêutica

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência

**IPC** – Controlo em Processo



## **I. INTRODUÇÃO**

Em concordância com o vasto leque de saídas profissionais que esta profissão oferece, o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) tem um plano curricular bastante diversificado, proporcionando aos futuros profissionais de saúde todas as ferramentas necessárias para desempenharem devidamente as suas funções, em qualquer que seja a área do setor farmacêutico. Para além da base teórica, o plano de estudos engloba na reta final do curso, a realização de um estágio curricular que permite aplicar todos os conhecimentos teóricos adquiridos, melhorar as aptidões técnicas, e acima de tudo, preparar os estudantes para a passagem do mundo académico para a realidade do mercado de trabalho.

No seguimento da diversificação, a FFUC permite-nos não só a realização de um estágio em farmácia comunitária, mas também um segundo estágio numa outra área que não esta. Assim sendo, de modo a experienciar outras realidades para além da tradicional, optei pela área da indústria.

Desta forma, surgiu a oportunidade de estagiar durante três meses numa indústria farmacêutica, a Labialfarma - Laboratório de produtos Farmacêuticos e Nutracêuticos, S.A., na qual estagiei no departamento do Controlo de Qualidade e no da Produção, sob orientação da Dra. Mariana Mergulhão.

Este relatório, essencialmente sob forma de análise SWOT, destina-se a expor, de forma crítica, a minha experiência enquanto estagiária na Labialfarma identificando os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças.

## **2. LABIALFARMA - LABORATÓRIO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E NUTRACÊUTICOS S.A.**

O FERRAZ GROUP é um grupo privado de empresas portuguesas que iniciou a sua atividade em 1981. A sua sede está situada no centro de Portugal, na Felgueira. Atualmente, o Grupo é constituído por cinco empresas: Labialfarma, Ferraz Pharma, LiqFillCaps Internacional, Ferraz Sciencis, que desenvolvem atividades aplicadas à indústria farmacêutica e nutracêutica e ainda a Gesconsulting que presta serviços de gestão, de consultoria fiscal e de contabilidade<sup>1</sup>.

Este grupo rege-se pela seguinte máxima: “Nós acreditamos que desafiando o Status Quo através da inovação científica, desenvolvemos produtos com mais eficácia, qualidade e segurança. Acreditamos que juntando à inovação científica novos conceitos tecnológicos,

conseguimos fazer chegar ao consumidor produtos com design elegante, de utilização fácil e intuitiva e que promovam melhor saúde e bem-estar”<sup>1</sup>.

A Labialfarma é a empresa mãe do grupo e está vocacionada para a pesquisa, desenvolvimento e fabrico de produtos e formas farmacêuticas inovadoras. A qualidade dos produtos e serviços é uma preocupação, tendo sido implementado um Sistema de Qualidade suportado pelas normas ISSO 9001, ISSO 14001, HACCP, ISSO 13485, pelas Boas Práticas de Fabrico e pelo cumprimento da legislação aplicável em vigor<sup>1</sup>.

### 3. ANÁLISE SWOT

<b>Pontos Fortes</b>	<b>Pontos Fracos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Rotatividade pelas diferentes secções.</li><li>- Versatilidade/Qualidade das tarefas propostas.</li><li>- Aplicação prática dos conhecimentos teóricos do MICF.</li><li>- Receção e integração numa equipa competente e acolhedora.</li><li>- Confiança/Autonomia.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Duração em cada setor.</li><li>- Qualidade das tarefas propostas.</li></ul>
<b>Oportunidades</b>	<b>Ameaças</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Empresa especializada no mercado dos suplementos alimentares e produtos nutracêuticos.</li><li>- Extenso portfólio de produtos e formas farmacêuticas.</li><li>- Visitas de clientes.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Baixo número de farmacêuticos na Indústria Farmacêutica.</li><li>- Pandemia.</li></ul>

#### 3.1. Ponto Fortes

##### 3.1.1. Rotatividade pelas diferentes secções

Nos primeiros dois meses, integrei a equipa do departamento de CQ, no qual tive a oportunidade de acompanhar todas as secções. Já no departamento de Produção, onde permaneci durante as últimas três semanas, pude acompanhar a secção de embalagem, cápsulas moles, sólidos e líquidos/semi-sólidos.

Penso que este ponto é o que atribui ao meu estágio a sua maior característica: a versatilidade. Ao ter rodado por entre as secções, pude aprender um pouco sobre todas elas e assim, expandir os meus conhecimentos acerca do funcionamento de uma indústria farmacêutica.

Para além de ter aprendido sobre cada secção individualmente, o facto de ter passado por dois departamentos diferentes, neste caso o CQ e a Produção, permitiu-me constatar o elevado nível de interligação existente entre eles<sup>1</sup>.

### **3.1.2. Versatilidade/Qualidade das tarefas**

O facto da Labialfarma me ter proporcionado um estágio tão versátil permitiu-me executar um vasto leque de tarefas.

Na secção das análises às matérias primas realizei tarefas como a preparação de soluções, determinação de pH e densidades, reações de identificação, determinação da solubilidade, doseamentos, determinação do teor de humidade com o *Karl Fisher* e determinação de uniformidade em cápsulas moles e cápsulas duras. Já na microbiologia tive a oportunidade de preparar material estéril na autoclave, preparar meios de cultura, realizar passagens e respetivos registos e auxiliar no controlo microbiológico do ar e água das salas. Ao nível das análises instrumentais, auxiliiei na preparação de fases móveis, amostras, soluções tampão e no enchimento dos *vials* para análise no HPLC. No controlo do material de embalagem tanto calculei gramagens em acondicionamentos secundários, como analisei acondicionamentos primários como bisnagas e frascos de vidro âmbar. Nas análises às plantas determinei a densidade aparente, a compactada, a presença de elementos estranhos, o índice de peróxidos e ácidos e realizei cromatografias em camada fina. Por fim, no IPC pude contactar com ensaios de desagregação, friabilidade, estanquicidade e determinação das dimensões.

A nível da produção, as atividades passavam por auxiliar os colaboradores em pequenas funções à medida que acompanhava as várias etapas. Conheci em detalhe várias etapas nos sólidos, como a mistura das matérias primas, granulação, calibração, secagem, compressão, encapsulação e revestimento, bem como algumas etapas nos líquidos/semissólidos como a mistura de matérias primas de suspensões e de cremes, e respetivos enchimentos. Nas cápsulas moles auxiliiei na preparação de misturas de enchimento e da gelatina, no enchimento das cápsulas e na sua escolha. Pude ainda, participar no embalamento do acondicionamento primário e secundário de todas estas formas farmacêuticas.

Toda a equipa, para além de me explicar a base teórica dos procedimentos, confiava-me algumas tarefas de modo a consolidar os conhecimentos e a melhorar as competências técnicas. A maioria das atividades propostas eram desafiantes pelo que as desenvolvi com entusiasmo, facilitando o processo de aprendizagem.

### **3.1.3. Aplicação prática de imensos conhecimentos teóricos do MICF**

Este ponto acaba por ir ao encontro dos dois anteriores, na medida em que é uma consequência quer da variedade de setores, quer da realização de tarefas.

Ao longo do estágio, ao passar pelas várias secções, as atividades com que me deparei levaram-me a cruzar os conteúdos de várias unidades curriculares como química analítica, microbiologia, bacteriologia, métodos instrumentais de análise, farmacognosia, tecnologia farmacêutica, entre outras. Deste modo, pude comprovar a abrangência da preparação que é dada no MICF.

### **3.1.4. Receção e integração numa equipa competente e acolhedora**

A Labialfarma conta com uma equipa multidisciplinar que prima pelo profissionalismo e competência, não abdicando de um ambiente acolhedor, bem-disposto e com enorme espírito de entreatajuda. Ser recebida neste ambiente, foi sem dúvida um dos pontos mais fortes, senão o mais forte, uma vez que desde o início toda a equipa se mostrou bastante disponível para me explicar pormenorizadamente todos os processos, assim como, me colocou à vontade para esclarecer qualquer dúvida que tivesse.

É de notar a motivação, entusiasmo e conhecimento que a maioria dos colaboradores demonstrou ao explicar as tarefas desempenhadas e o funcionamento das secções, acabando por me contagiar e motivar acerca da indústria farmacêutica.

Desta forma, o facto de toda a equipa me ter recebido, integrado e transmitido o seu conhecimento de forma tão excepcional foi fundamental para a minha adaptação a esta nova fase do meu percurso académico.

### **3.1.5. Confiança/Autonomia**

Durante o estágio, a equipa ia-me explicando as tarefas: o objetivo; o fundamento teórico; o modo de realização; os pontos críticos; e os cuidados a ter na execução. Por fim, era encorajada a realizar essas mesmas tarefas. Numa primeira fase era supervisionada, porém, com o avançar do estágio pude realizar algumas atividades de forma independente.

Quando cometia algum erro ou o resultado não era o esperado, havia uma preocupação por parte dos profissionais em perceber e explicar o que é que tinha corrido mal, no entanto, logo de seguida era incentivada a repetir, transmitindo-me uma sensação de confiança. Ao sentir que a equipa confiava em mim para desempenhar certas funções, eu mesma ganhava confiança para as desempenhar tornando-me mais autónoma.

Considero que este estágio teve a dose ideal de autonomia, na medida em que a equipa estava sempre disponível a esclarecer qualquer dúvida e a ajudar, mas ao mesmo tempo me dava a oportunidade de realizar as tarefas, cometer erros e aprender com eles.

Sendo a autonomia uma qualidade fundamental em qualquer profissional, considero este um ponto fortíssimo no estágio que vai, com certeza, ser uma mais valia no meu futuro.

## **3.2. Pontos Fracos**

### **3.2.1. Duração em cada secção**

O estágio curricular na indústria farmacêutica tem a duração de 3 meses. Como já referi anteriormente, este período foi dividido por várias secções sendo o tempo de permanência em cada uma cerca de uma ou duas semanas. Apenas a passagem pela secção dos sólidos e líquidos foi mais curta devido a uma situação externa à empresa.

Relativamente à divisão do tempo, considero que a duração em cada posição me permitiu adquirir muitas noções e desempenhar muitas tarefas. No entanto, devido à elevada especificidade de cada secção considero que não foi tempo suficiente para as conhecer na sua plenitude, nem para conseguir desempenhar todas as tarefas de uma forma autónoma.

Considero este um ponto menos positivo do estágio, contudo, compreendo que ao ter a oportunidade de estagiar em várias secções, a duração em cada uma seria reduzida. É, portanto, um ponto fraco que, a meu ver, se torna necessário uma vez que num primeiro contacto, considero mais vantajoso ter conhecido uma multiplicidade de secções de forma abrangente, do que apenas uma de forma pormenorizada.

### **3.2.2. Plano de estágio na Produção**

O plano de estágio das várias secções da Produção consistia em observar os processos que estavam a acontecer. Ao longo do estágio acompanhei os operadores que me explicaram, atenciosamente, as funções que desempenhavam, o funcionamento dos equipamentos e os registos necessários. Apesar de reconhecer que esta aprendizagem é absolutamente indispensável para um farmacêutico desempenhar as suas funções numa indústria, considero que permaneci mais tempo do que o necessário a acompanhar alguns processos. Por várias vezes, segui o mesmo equipamento durante horas sendo que ao fim de algum tempo o operador já tinha explicado como tudo funcionava e esclarecido todas as questões, restando apenas observar o equipamento a funcionar. Desta forma, o que para mim foi o ponto mais

fraco do estágio foram esses momentos de observação demasiado longos que acabavam por se tornar cansativos e desmotivadores.

### **3.3. Oportunidades**

#### **3.3.1. Empresa especializada no mercado dos suplementos alimentares e produtos nutracêuticos**

O mercado dos suplementos alimentares tem vindo a mostrar um grande crescimento em Portugal<sup>2</sup>. Face a esta tendência, a Labialfarma especializou-se neste ramo ocupando, atualmente, uma posição de destaque neste mercado, não deixando de parte a produção de medicamentos. Ao apostar nestes mercados distintos, a Labialfarma proporcionou-me uma maior perceção das diferenças de legislação entre eles, especialmente a nível do CQ. Para além disso, o facto de grande parte da produção estar direcionada para os suplementos alimentares e produtos nutracêuticos, dos quais a maioria é à base de plantas, permitiu-me contactar com técnicas específicas destes produtos.

#### **3.3.2. Extenso portfólio de produtos e formas farmacêuticas**

A Labialfarma produz um leque variadíssimo de produtos e formas farmacêuticas.

O facto de ter assistido à produção, embalagem e controlo de tantos produtos diferentes contribuiu para que conhecesse muitos deles que desconhecia e que aprendesse acerca da sua composição e indicação terapêutica. Para além da grande variedade de produtos, esta indústria também me proporcionou o contacto com uma multiplicidade de formas farmacêuticas, nomeadamente, comprimidos revestidos; cápsulas de gelatina dura com pós, granulados e líquido; cápsulas de gelatina mole; pós; granulados; pomadas; cremes; geles; soluções e suspensões. Tanta variedade contribuiu para que a nível da produção me deparasse com diferentes processos de fabrico e respetivos equipamentos e que a nível de CQ conhecesse as especificações características de cada forma farmacêutica.

É de destacar a oportunidade que me foi dada de assistir à produção de cápsulas de gelatina mole e cápsulas duras com conteúdo líquido e semi-sólido, uma vez que, a produção destas formas farmacêuticas, em Portugal, ocorre exclusivamente na Labialfarma. O mesmo acontece com o *smartPACKAGING* exclusivo da Labialfarma, onde pude conhecer o *FUSIONPACK* e *TRiPACK*.

### **3.3.3. *Visitas de clientes***

Sendo a Labialfarma uma empresa que exporta para mais de 30 países nos cinco continentes, conta naturalmente com um vasto portfólio de clientes que visitam as instalações da indústria. Durante o estágio pude assistir a várias visitas de clientes e analisar toda a logística inerente a estas.

Esta oportunidade deu-me a conhecer uma vertente diferente do mundo profissional, na medida em que pude testemunhar que os farmacêuticos não desempenham exclusivamente funções que estão ligadas à área das ciências farmacêuticas, necessitando de uma diversidade de competências.

## **3.4. Ameaças**

### **3.4.1. *Pouco contacto com farmacêuticos na Indústria Farmacêutica***

Uma vez que a indústria farmacêutica é constituída por uma equipa multidisciplinar, tive a oportunidade de trabalhar com bioquímicos; farmacêuticos; químicos; biólogos; engenheiros das mais diversas áreas; entre outros, com os quais aprendi imenso. Apesar de ter acompanhado alguns farmacêuticos, achei que no geral havia poucos e que a sua presença se concentrava em cargos da direção e chefia das secções, o que condicionava o meu contacto com esta classe profissional.

Do meu ponto de vista pessoal, encaro esta situação como uma ameaça, dado que, ao não ter acompanhado de perto muitos farmacêuticos, não fiquei totalmente esclarecida quanto às funções que estes desempenham numa IF. No entanto, reconheço que primeiramente se deve conhecer e perceber o funcionamento das secções, para mais tarde, se compreender as funções desempenhadas pelos cargos ocupados por farmacêuticos.

### **3.4.2. *Pandemia***

No final de 2019, foi identificado pela primeira vez o vírus SARS-CoV-2, cuja doença foi chamada de COVID-19. Surgiu na cidade chinesa de Wuhan, mas rapidamente se disseminou por todo o mundo tendo sido confirmado o primeiro caso em Portugal a 2 de março. A 11 de março, a Organização Mundial da Saúde qualificou a COVID-19 como uma pandemia face ao nível alarmante de propagação que se fazia notar. Poucos dias depois, tornou-se necessário adotar algumas medidas para combater esta calamidade pública, pelo que o Presidente da República declarou estado de emergência. Face a esta situação, os estágios curriculares foram cancelados terminando mais cedo do que o previsto.

Devido à declaração de estado de emergência, o estágio foi concluído prematuramente, levando a que a minha passagem por duas secções apenas tivesse a duração de dois dias. Obviamente que esse tempo foi manifestamente insuficiente para contactar com as secções, sendo que acabei por ter uma ideia mais superficial do funcionamento das mesmas.

#### **4. CONCLUSÃO**

Terminado o estágio na Labialfarma S.A. o balanço final é, sem dúvida, bastante positivo.

Os três meses de estágio revelaram-se bastante enriquecedores, dando-me a oportunidade de consolidar conhecimentos, aprimorar técnicas e aprender novos conteúdos. Para além destas competências, o estágio preparou-me para outras aptidões igualmente necessárias no mercado de trabalho como trabalhar em equipa, gerir o tempo e as tarefas e cumprir prazos. Posto isto, considero que esta etapa de intensa aprendizagem foi um passo importantíssimo no caminho para me tornar uma profissional competente.

Este primeiro contacto com uma indústria farmacêutica tornou-se bastante revelador, uma vez que me permitiu compreender a organização e o funcionamento de uma indústria, bem como, os vários papéis desempenhados pelos farmacêuticos. Nesse sentido, apercebi-me que uma das principais tarefas desempenhadas é gerir recursos e colaboradores, pelo que, apesar de reconhecer que o curso de MICEF proporciona um plano curricular completo que fornece todos os conhecimentos necessários à prática da profissão, considero que seria benéfico ter uma unidade curricular no plano curricular direccionada à área da gestão.

Terminado o estágio, resta-me agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela oportunidade de poder optar por um estágio numa IF; ao Grupo Ferraz por me proporcionar este desafio, e a todos os colaboradores, em particular à equipa do CQ, pela fantástica integração e preparação, que não só contribuíram para o meu crescimento profissional, mas também pessoal.



## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Sítio na *internet* do grupo Labialfarma [Consultado a 11 de abril 2020] Disponível em: [www.labialfarma.com](http://www.labialfarma.com)
2. Sítio na *internet* do SNS - Suplementos alimentares [Consultado a 15 de abril 2020]  
Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2016/08/18/suplementos-alimentares/>

## **PARTE II**

### **RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA**



farmácia coimbra

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**FFUC** - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**SWOT** - *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## **I. INTRODUÇÃO**

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) conta com um plano de estudos que culmina na realização de um estágio curricular na área da Farmácia Comunitária de natureza obrigatória. Este estágio, constitui, para a maioria dos alunos, o primeiro contato com o mundo profissional, colocando à prova os conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico.

Na Farmácia Comunitária, o farmacêutico contacta diretamente com o utente, prestando aconselhamento qualificado relativamente ao medicamento e parâmetros clínicos e promovendo a utilização racional do medicamento. Assim sendo, o estágio curricular permite não só adquirir conhecimentos técnicos e científicos, mas também competências sociais, que considero valências fundamentais para o exercício da profissão farmacêutica.

Assim, tive a oportunidade de realizar o estágio curricular na Farmácia Coimbra sob a orientação da Dra. Ana Leite e Silva e de uma equipa profissional e acolhedora. Este período de aprendizagem teve início a 9 de maio de 2020 e terminou a 31 de agosto do mesmo ano, perfazendo um total de 670 horas.

Com este relatório sob a forma de análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) pretendo expor de forma crítica os que considero serem os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças sentidas no decorrer desta formação.

## **2. FARMÁCIA COIMBRA**

A Farmácia Coimbra encontra-se situada no CoimbraShopping que, por sua vez, está rodeado por zonas de residência, escolas, o Instituto Superior de Engenharia de Coimbra e uma unidade de saúde. A sua localização leva a que o grupo de utentes que frequenta a farmácia seja bastante heterogéneo, desde idosos a estudantes, fidelizados ou de passagem. O facto de se localizar dentro de um centro comercial influencia a afluência de utentes, que se revela elevada.

Para além disso, a Farmácia Coimbra funciona em regime de horário alargado. Atualmente, devido à questão da pandemia, o horário de funcionamento é das 9h às 23h, todos os dias da semana, inclusive feriados.

### 3. ANÁLISE SWOT

<b>Ponto Fortes</b>	<b>Pontos Fracos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Estruturação do plano de estágio.</li><li>- Horário do estágio.</li><li>- Integração numa equipa profissional e acolhedora.</li><li>- Confiança/Autonomia.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Reduzida preparação de manipulados.</li></ul>
<b>Oportunidades</b>	<b>Ameaças</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Realização de formações.</li><li>- Afluência e heterogeneidade de utentes.</li><li>- Prescrições manuais.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Reduzida proximidade com o utente.</li><li>- Encerramento de alguns serviços farmacêuticos.</li></ul>

#### 3.1. Pontos Fortes

##### 3.1.1. Estruturação do plano de estágio

A estrutura do plano de estágio mostrou-se lógica e faseada o que permitiu uma aprendizagem gradual e contínua.

Como tal, numa primeira fase foi realizado, essencialmente, serviço de *back-office*. Assim sendo, comecei por fazer a receção de encomendas utilizando o *software* Sifarma 2000® e posteriormente, efetuar a arrumação dos medicamentos. Estas atividades permitiram tomar conhecimento dos fornecedores existentes e dos horários de entrega, bem como, conhecer os produtos que fazem parte do *stock* da farmácia e os locais de armazenamento de cada um. Além disso, também me foi dada a oportunidade de rececionar produtos com reserva, separá-los e arrumá-los, o que me permitiu perceber a dinâmica em torno destes. Para além destas tarefas, participei no controlo periódico de *stock*, que consistiu na contagem física e verificação dos prazos de validade dos produtos para verificar se o *stock* real estava em conformidade com o *stock* registado no sistema.

Posteriormente a esta fase introdutória, seguiu-se uma fase que encaro como uma transição para o atendimento na qual, a par com o trabalho de *back-office*, me foi permitido observar os atendimentos. Deste modo, consegui familiarizar-me com o módulo de atendimento do Sifarma 2000®, com o sistema de acumulação de pontos nas fichas dos utentes (YClient®) e ainda, observar e escutar o aconselhamento prestado em diversas situações.

A fase de atendimento ao público foi a mais desafiante do estágio. Numa primeira instância, fui acompanhada por uma farmacêutica da equipa, que gradualmente me permitiu

realizar o atendimento de forma autónoma. Aqui, pude colocar à prova os conhecimentos adquiridos no MICF, bem como aqueles que obtive na fase de *back-office* e na observacional.

Em retrospectiva, reconheço que iniciar o estágio pelo trabalho de *back-office* é fundamental para ganhar bases para as tarefas que sucedem, culminando num atendimento mais funcional e de qualidade para os utentes. Desta forma, encaro o plano de estágio como um ponto forte que me permitiu estar em constante e gradual aprendizagem.

### **3.1.2. Horário de estágio**

Como referido anteriormente neste relatório, a farmácia Coimbra funcionou num horário alargado, estando aberta todos os dias da semana inclusive feriados, das 9h às 23h.

A equipa da farmácia organizou-se por turnos de 10h, nomeadamente, o da abertura, o intermédio e o de fecho, como eram vulgarmente distinguidos. Cerca de metade do meu estágio funcionou em horários similares. Esta oportunidade permitiu-me experienciar situações diferentes e conhecer a logística inerente à abertura e fecho de uma farmácia. Para além disso, considero que ter feito estes horários, apesar de, por vezes, se tornar cansativo, me fez crescer a nível profissional e pessoal, preparando-me para o mundo do mercado de trabalho.

O facto de ter estagiado durante a semana, fins de semana e feriados permitiu-me constatar diferentes realidades, essencialmente, a diferença do fluxo de utentes bem como o tipo de utentes, e assim os quadros clínicos apresentados. Desta forma, pude vivenciar situações diferentes como momentos de grande afluência em que sentia pressão para fazer um atendimento rápido, porém, com igual qualidade, ou dias em que aquela farmácia era a das poucas abertas e recebia imensos utentes que não eram fidelizados.

Por último, gostaria de deixar o meu agradecimento e realçar a flexibilidade demonstrada em relação ao meu horário de estágio, pela possibilidade de fazer alterações quando foi necessário.

### **3.1.3. Integração numa equipa profissional e acolhedora**

A equipa da Farmácia Coimbra consta como um ponto forte uma vez que influenciou, positivamente, o meu percurso enquanto estagiária. Esta equipa conta com profissionais dinâmicos e bem-dispostos, que primam pelo bom ambiente, não descurando da competência e profissionalismo.

Desde o primeiro dia, toda a equipa se demonstrou bastante compreensível face à minha inexperiência, colocando-me à vontade para esclarecer qualquer dúvida que surgisse, mesmo que não parecesse relevante. Quando cometia algum erro, sentia que havia a preocupação em me explicarem o porquê de modo a que pudesse corrigir e melhorar.

Concluo assim que pertencer a uma equipa como a da Farmácia Coimbra foi uma mais valia e que me proporcionou uma maior aprendizagem e crescimento a nível profissional.

#### **3.1.4. *Autonomia/Confiança***

No início do estágio, o atendimento ao balcão e o contacto com os utentes era um momento de grande ansiedade e insegurança. Numa primeira instância, quando comecei a realizar atendimentos, era acompanhada por uma farmacêutica que me ensinava como o fazer e corrigia qualquer engano. De forma gradual foi-me permitido atender sozinha, no entanto, o facto de saber que tinha uma equipa de profissionais dispostos a intervir sempre que necessário foi fundamental para ganhar confiança.

O voto de confiança que me foi dado acarretou com ele muitas responsabilidades que me fizeram crescer enquanto profissional. Ao realizar os atendimentos de forma autónoma, consegui, aos poucos, sentir-me menos insegura e ganhar confiança de modo a melhorar a minha destreza a atender.

Assim sendo, para mim este é o ponto mais forte que me fez ultrapassar algumas limitações enquanto profissional e enquanto pessoa.

### **3.2. Pontos Fracos**

#### **3.2.1. *Ausência da preparação de manipulados***

Um dos serviços prestados a nível da farmácia comunitária é a preparação de manipulados. No entanto, a Farmácia Coimbra integra um grupo de farmácias distribuídas pelo país, no qual os pedidos de preparação são todos encaminhados para uma farmácia na cidade do Porto, onde são executadas. Como tal, não foi possível observar nem realizar nenhuma preparação de manipulados.

É um ponto fraco do meu estágio, uma vez que me impossibilitou de aplicar os conhecimentos galénicos adquiridos durante o meu percurso académico e adquirir competências práticas no campo dos manipulados.

### **3.3. Oportunidades**

#### **3.3.1. Realização de formações**

As farmácias comunitárias recebem delegados de informação médica que dão formações de forma a expor e explicar os produtos das suas marcas. Estes momentos formativos são bastante uteis para manter os profissionais atualizados. Enquanto estagiária, as formações permitiram-me conhecer vários produtos e as suas especificações, o que me proporcionou uma maior capacidade e segurança no momento do atendimento. Desta forma, considero a realização de formações uma oportunidade neste estágio, uma vez que, foram momentos de aprendizagem bastante enriquecedores.

Devido à pandemia vivenciada, o número de formações presenciais foi reduzido, porém, foram realizadas formações online para colmatar essa situação.

#### **3.3.2. Grande afluência e heterogeneidade de utentes**

Como já foi referido, a Farmácia Coimbra está situada dentro do CoimbraShopping que tem nos seus arredores o Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, zonas de residência, escolas e uma unidade de saúde. Como tal, não é surpreendente a grande afluência e heterogeneidade de utentes que se faz sentir todos os dias. Esta característica da farmácia proporcionou numerosos atendimentos, com diferentes tipos de utentes e com situações clínicas muito distintas. Desta forma, consegui ganhar muita experiência e desenvolver a minha capacidade de adaptação a cada tipo de utente.

#### **3.3.3. Prescrições Manuais**

Atualmente, a grande maioria das receitas que surge na farmácia apresenta formato eletrónico, podendo o utente receber estas receitas através de SMS ou email. No entanto, ainda se verifica a prescrição de medicamentos pela via manual, excecionalmente em caso de falência do sistema informático, inadaptação fundamentada do prescriptor, prescrição ao domicílio ou até um máximo de 40 receitas médicas por mês.

No momento da dispensa, as receitas manuais exigem uma atenção redobrada uma vez que existe um elevado número de elementos a conferir tais como: a presença da vinheta do prescriptor, a justificação de utilização, os dados do utente, o organismo de participação, a assinatura do prescriptor e a data de prescrição. Para além disso é necessário verificar a existência de rasuras ou de caligrafias diferentes. Assim sendo, os atendimentos tornam-se mais morosos e com um maior risco de erros durante a sua realização.



No decorrer do estágio pude contactar com um número considerável deste tipo de receitas, o que me proporcionou a oportunidade de aprender todas as regras e especificidades inerentes a este tipo de prescrição.

### **3.4. Ameaças**

#### ***3.4.1. Reduzida proximidade com o utente***

Atualmente, o farmacêutico ocupa a linha da frente no contacto com o público sendo um dos profissionais de saúde mais próximo dos utentes e que consegue criar uma ligação com estes.

Contudo, devido à pandemia vivenciada nos dias de hoje, foram adotados comportamentos de distanciamento social e implementados certos equipamentos necessários à segurança e proteção quer dos utentes, quer dos profissionais de saúde. Nesse sentido foram colocados acrílicos nos balcões, interrompidos alguns serviços farmacêuticos e implementado o uso obrigatório de máscara.

Na minha opinião pessoal, a adoção destas medidas, apesar de indiscutivelmente essenciais, dificultaram a comunicação entre farmacêutico e utente no ato do atendimento, comprometendo a proximidade característica desta profissão.

#### ***3.4.2. Encerramento de alguns serviços farmacêuticos***

Como mencionado no ponto 3.4.1., face à situação de pandemia vivenciada foi necessário interromper alguns serviços farmacêuticos, nomeadamente, a medição de parâmetros bioquímicos e avaliação da pressão arterial. Estes serviços eram prestados num gabinete de apoio ao utente, o que conferia outro nível de privacidade aos utentes, levando-os a falar mais abertamente e estabelecer uma ligação com o farmacêutico.

Para além da questão da proximidade com o utente nestes momentos, o encerramento destes serviços limitou a minha formação relativamente a estes. Penso que teria sido uma excelente oportunidade para aplicar em prática certos conhecimentos adquiridos, quer na execução do serviço, quer na avaliação dos resultados. Considero, ainda, que teria sido benéfico para desenvolver a minha capacidade social, uma vez que iria aprender e perceber a melhor forma de comunicar e interagir com os utentes de modo a que estes confiassem e aplicassem o aconselhamento dado.

#### **4. CONCLUSÃO**

Depois de terminado o estágio, acredito que este é uma peça fundamental no percurso académico do farmacêutico. Esta experiência revelou-se essencial para consolidar e aplicar na prática todo o conhecimento teórico adquirido ao longo do curso, bem como para adquirir novas competências, tanto científicas como sociais.

O estágio na Farmácia Coimbra, com todas as suas características, proporcionou-me as condições ideais para uma extensa aprendizagem. Não só os pontos fortes e as oportunidades foram fundamentais para a minha evolução enquanto profissional, mas também as ameaças me permitiram ganhar capacidade de me adaptar face a realidades diferentes. Portanto, com o concluir desta etapa, sinto-me mais capacitada profissionalmente e com uma maior consciência acerca do papel e da importância do farmacêutico na sociedade.

Desta forma, gostaria de expressar o meu agradecimento à Farmácia Coimbra pela oportunidade de estágio e a toda a equipa pela integração e partilha de conhecimentos que, com certeza, farão de mim uma melhor profissional.

**PARTE III**

**MONOGRAFIA**

**“Síndrome Wiskott-Aldrich: alterações da função das células do sistema imunológico”**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADCC** - Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

**APC** - Célula apresentadora de antígenos

**BCL6** - Linfoma 6 de linfócitos B

**BCR** - Recetor dos linfócitos B

**CD** - *Cluster of Differentiation*

**CXCR5** - Recetor de quimiocina C-X-C tipo 5

**DC** - Célula dendrítica

**DECH** - Doença do enxerto contra o hospedeiro

**HLA** - Antígeno Leucocitário Humano

**HSCT** - Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas

**IL** - Interleucina

**MHC-I** - Moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I

**MHC-II** - Moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II

**MZ-B** - Linfócitos B da zona marginal

**NK** - Natural Killer

**TCR** - Recetor dos Linfócitos T

**Tfh** - Linfócitos T auxiliares foliculares

**Treg** - Linfócitos T auxiliares reguladores

**WAS** - Síndrome Wiskott Aldrich

**WASp** - Proteína da Síndrome de Wiskott- Aldrich

**XLN** - Neutropenia ligada ao X

**XLT** - Trombocitopenia ligada ao X

## RESUMO

Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) caracteriza-se por uma imunodeficiência associada a um quadro clínico distinto constituído principalmente por eczema, microtrombocitopenia e imunodeficiência com infeções recorrentes. Está também associada ao aumento da incidência de doenças autoimunes e malignidades. Este síndrome está incluído nas doenças raras e tem origem numa grande variedade de mutações no gene que codifica para a proteína do Síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp), conduzindo a alterações na sua expressão e funções nas células do sistema imunológico.

WASp é uma proteína citoplasmática expressa, exclusivamente, em células hematopoiéticas. Esta proteína desempenha uma função essencial na regulação da polimerização da actina, que é a chave para a reorganização do citoesqueleto, desempenhando um papel fundamental no controlo da morfologia e da motilidade celular. A ausência de WASp funcional resulta num variadíssimo leque de defeitos funcionais da resposta da imunidade inata e adaptativa, como a migração celular, adesão, proliferação, fagocitose de patogénios invasores e formação de sinapses imunológicas.

Nesta patologia, WAS, estão alteradas diversas funções do sistema imunitário, especificamente as células da linhagem mielóide, células dendríticas, células NK e os vários tipos de linfócitos. Se a origem biológica deste síndrome não for precocemente identificado e tratado, a situação clínica pode evoluir para quadros manifestamente graves e conduzir à morte do doente.

O transplante de células estaminais hematopoiéticas é o tratamento de escolha para fenótipos mais graves do síndrome de Wiskott-Aldrich, sendo que nos fenótipos menos severos tende-se a optar pelo tratamento das manifestações clínicas. Mais recentemente, a terapia génica tornou-se uma opção alternativa, embora ainda se encontre em investigação.

**Palavras-chave:** Síndrome Wiskott Aldrich; WASp; mutações; actina; citoesqueleto; sistema imunológico; estratégias terapêuticas.

## **ABSTRACT**

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), is characterized by an immunodeficiency associated with a distinct clinical picture, which consists mainly in the appearance of eczema, microthrombocytopenia and immunodeficiency with recurrent infections. Also, it's associated to an increased incidence of autoimmune diseases and comorbidities. This syndrome is included in the class of rare diseases and has its origin in a wide variety of mutations in the gene that codes the Wiskott-Aldrich syndrome (WASp) protein, leading to changes in its expression and function towards the cells of the immune system.

WASp is a cytoplasmic protein expressed exclusively in hematopoietic cells. This specific protein plays an essential role in the regulation of actin polymerization, which is the key to the reorganization of the cytoskeleton that plays an underlying role in the control of cell morphology and motility. The absence of functional WASp results in a wide range of functional defects, relatable to the innate and adaptive immunity response, such as: cell migration, adhesion, proliferation, phagocytosis associated with invading pathogens and formation of immune synapses.

In this pathology, WAS, several functions of the immune system are altered, specifically the cells of the myeloid lineage, dendritic cells, NK cells and the various types of lymphocytes. If the biological origin of this syndrome is not identified and treated early, the clinical situation can evolve to manifestly severe conditions and lead to the patient's death.

Hematopoietic stem cell transplantation is the treatment of choice for the most severe phenotypes of the Wiskott-Aldrich syndrome, with less severe phenotypes tending to treat clinical manifestations. More recently, gene therapy has become an alternative option, although is still under investigation.

**Keywords:** Wiskott Aldrich Syndrome; WASp; Mutations; actin; cytoskeleton; immune system; therapeutic strategies.

## I. INTRODUÇÃO

A patologia designada por Síndrome Wiskott-Aldrich (WAS) teve esta designação devido ao nome dos dois pediatras que inicialmente a descreveram: Dr. Alfred Wiskott (1937) e Dr. Robert Aldrich (1954). Este síndrome apresenta um quadro clínico característico constituído principalmente por eczema, microtrombocitopenia e imunodeficiência com infeções recorrentes. Está também associada ao aumento da incidência de doenças autoimunes e malignidades<sup>1</sup>.

WAS é classificada como condição rara, uma vez que a estimativa da taxa de incidência é de um afetado em cem mil nascimentos. Em 2015, o WAS representava cerca de 3% de todas as Imunodeficiências Primárias registadas na Sociedade Europeia de Imunodeficiências Primárias. No entanto, esta condição pode estar a ser subnotificada devido ao diagnóstico incorreto de casos mais brandos como sendo púrpura trombocitopénica idiopática<sup>2</sup>.

Este síndrome tem origem numa grande variedade de mutações no gene que codifica a Proteína do Síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp). A WASp é expressa, exclusivamente, em células estaminais hematopoiéticas que são precursoras de todas as células do sistema imunológico. Desta forma, é inevitável que a deficiência ou ausência da WASp prejudique a resposta imune<sup>3</sup>.

A WASp desempenha um papel importante na regulação da polimerização da actina, que é fundamental para a formação do citoesqueleto. Desta forma, a deficiência de WASp resulta na perda de integridade do citoesqueleto celular que leva a diversos defeitos na resposta imune ao comprometer a migração celular, adesão, proliferação, fagocitose de patógenos invasores e formação de sinapses imunológicas<sup>4</sup>.

Esta monografia tem como principal objetivo conhecer a WAS e compreender as suas implicações na função das células do sistema imunológico, bem como, as estratégias terapêuticas existentes.

## 2. SÍNDROME WISKOTT ALDRICH

### 2.1. Caracterização genética

O gene responsável pelo WAS está localizado no braço curto do cromossoma X, na zona Xp11.22-11.23 e contém 12 exões<sup>5</sup>. A sua localização no cromossoma X juntamente com o facto de ser uma condição recessiva, leva a que a WAS se manifeste maioritariamente no sexo masculino. No entanto, já foram descritos casos desta condição em mulheres, embora sejam muito raros. Nestes casos está envolvida a herança do cromossoma materno com o gene alterado e de um cromossoma X de origem paterna que sofreu uma mutação<sup>6</sup>.

A clonagem e sequenciamento do gene que codifica a WASp não forneceu apenas novas informações sobre a função da proteína, como também conduziu à descoberta de ferramentas poderosas que permitem confirmar molecularmente o diagnóstico. Este passo é importante na confirmação de diagnósticos em indivíduos masculinos sintomáticos, mas também na identificação de mulheres portadoras de mutações no gene WASp. As mulheres grávidas de que se saiba, ou exista suspeita de que sejam portadoras da mutação WASp podem também fazer um despiste genético pré-natal, por forma a identificarem precocemente o genótipo do filho e assim prevenir atrasos no diagnóstico e tratamento<sup>7</sup>.

### 2.2. Correlação Genótipo/Fenótipo

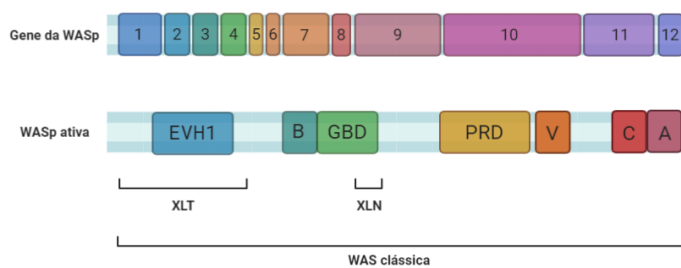
Desde que o gene que codifica a WASp foi identificado, já foram encontradas centenas de mutações que resultam em variadas alterações a nível da função e da expressão da proteína. Consequentemente, estas alterações conduzem a uma grande heterogeneidade de quadros clínicos bem como a diferentes graus de severidade. Estão descritas três variações do síndrome (WAS clássica, XLT e XLN) que, em grande parte, embora não exclusivamente, dependem da mutação. Em regra geral, as mutações mais extremas estão associadas a um nível mais baixo de WASp e, naturalmente, a um fenótipo mais grave<sup>8</sup>.

Apesar de haver algumas exceções, as mutações *nonsense*, *frameshift*, inserções, deleções ou defeitos no *splicing* estão geralmente associadas ao quadro clínico mais grave: a WAS clássica. Nesta variação do síndrome, as células hematopoiéticas perdem a capacidade de expressão da WASp ou a sua expressão é truncada devido às terminações prematuras. Este quadro corresponde à tríade clínica de eczema, microtrombocitopenia e imunodeficiência que conduz a infeções recorrentes, para além do aumento da incidência de autoimunidade e malignidades<sup>8</sup>.



As mutações *missense* estão associadas à trombocitopenia associada ao cromossoma X (XLT). Neste caso, as mutações tanto podem resultar numa expressão proteica diminuída, mas com a totalidade da sua capacidade funcional como numa expressão quantitativa normal, mas comprometida funcionalmente. Este tipo de mutações conduz, geralmente, a um síndrome atenuado, com melhor prognóstico, caracterizado principalmente por trombocitopenia e, em alguns casos, associado a eczema ou imunodeficiência mais leve<sup>9</sup>.

Mais recentemente, foi demonstrado que algumas mutações *missense* na zona do domínio GBD (*GTPase binding domain*), um dos 5 domínios da proteína, resultam numa ativação desregulada do WASp originando um fenótipo clínico e biologicamente distinto da WAS, caracterizado por neutropenia e mielodisplasia. Esta condição denomina-se neutropenia ligada ao X (XLN). Até ao momento, apenas um pequeno número de doentes foi relatado, apresentando um fenótipo surpreendentemente variável<sup>10</sup>.



**Figura 1. Representação esquemática do gene WAS e da WASp.** No gene estão identificados 12 exões. Os domínios da proteína estão representados exatamente em baixo do respetivo exão. A maioria das mutações *missense* ocorre entre o exão 1 e 4, dando origem ao XLT. As mutações no gene relativo ao C-terminal do domínio GBD, dão origem à XLN. As mutações *nonsense*, deleções, inserções e mutações complexas associadas à WAS clássica, estão distribuídas ao longo do gene. WAS; Wiskott Aldrich Syndrome; WASp, Wiskott Aldrich Syndrome protein; EVH1, Ena Vasp Homology 1; B, basic domain; GBD, GTPase binding domain; PRD, Proline-Rich Domain; V, Verprolin homology domain; C, Central region; A, Acidic region. (Adaptado de <sup>3</sup>)

Numa tentativa de quantificar as características clínicas associadas às diversas variações de síndrome, foi proposto um sistema de pontuação de 1 a 5 baseado na gravidade da doença. Este sistema auxilia a correlação dos fenótipos com os respetivos genótipos. Uma forma mais moderada de WAS está associada a uma pontuação de 2, enquanto que um fenótipo grave de WAS clássico estará associado a uma pontuação entre 3-5, com base na gravidade das infeções, coexistência de eczema, complicações autoimunes, entre outros. A pontuação de 0 está reservada para situações em que o doente apresenta mutações associadas ao XLN. A evolução da pontuação está mais frequentemente associada a indivíduos nos quais não é detetada a presença da WASp, em comparação com os indivíduos com quantidades reduzidas, mas detetáveis, da proteína<sup>11</sup>.

**Tabela I. Genótipo e Fenótipo das três variações do Síndrome de Wiskott Aldrich**

	<i>WAS clássica</i>	<i>XLT</i>	<i>XLN</i>
<b>Mutação</b>	<i>Nonsense, Frameshift, Inserções, Deleções, Splicing</i>	<i>Missense</i>	<i>Missense</i>
<b>Efeito da mutação</b>	Perda de função	Perda de função	Disfunção do estado autoinibido
<b>Expressão da WASp</b>	Normalmente ausente	Normalmente presente em baixas quantidades	Presente
<b>SCORE</b>	3-5	1-2, ou superior*	0
<b>Manifestações clínicas</b>	Microtrombocitopenia, eczema e imunodeficiência	Trombocitopenia, eczema ligeiro e imunodeficiência ligeira	Neutropenia e mieloplasia
<b>Complicações</b>	Autoimunidade e Malignidade	Autoimunidade	Indeterminado

\*Normalmente os doentes com XLT têm um SCORE entre 1 e 2, porém, podem ocorrer complicações que o façam evoluir.

Casos descritos com um fenótipo mais suave do que o previsto pelo genótipo podem sugerir a existência de alterações compensatórias como eventos de reversão genética ou de mutações que resultam na restauração de uma sequência génica, dando assim vantagem seletiva às células hematopoiéticas com expressão normal de WASp<sup>12</sup>.

No entanto, apesar da correlação fenótipo-genótipo estabelecida, existem várias exceções que, associadas ao grande número de mutações, bem como à grande variabilidade de fenótipos descritos, torna difícil fazer um prognóstico clínico preciso com base apenas no genótipo.

### **2.3. Manifestações Clínicas**

As manifestações clínicas aparecem, geralmente, nos primeiros meses da vida e apresentam grande heterogeneidade. O síndrome afeta vários sistemas, em especial, o sistema imunológico, que se encontra diretamente relacionado com a imunodeficiência e a autoimunidade. Estas apresentações clínicas encontram-se na grande maioria dos doentes afetados<sup>13</sup>.

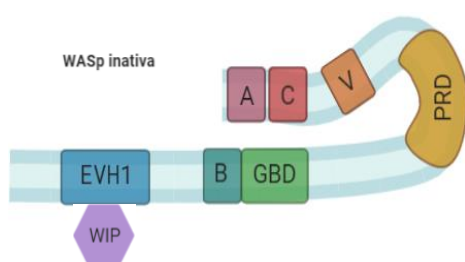
A imunodeficiência aumenta a suscetibilidade a infeções por agentes bacterianos, virais e fúngicos. As infeções sinopulmonares como a otite média crónica e as infeções do trato respiratório inferior são geralmente as complicações infecciosas mais comuns e problemáticas, assim como sepse (7% dos casos) e meningite (4% dos casos). Os doentes com WAS podem

desenvolver formas severas e disseminadas de infecções virais causadas pelo vírus herpes simplex I ou II (6% dos casos) e da varicela (3% dos casos). Apesar de relatados, infecções com fungos não ocorrem com tanta frequência<sup>13</sup>.

Estimativas sugerem que mais de 40% dos doentes com WAS desenvolvem autoimunidade e que tal manifestação é responsável por mais de 20% das complicações pós transplante de células estaminais hematopoiéticas. Citopenias autoimunes são as manifestações mais relatadas, seguidas de artrite (10%), vasculite (13%), doença inflamatória intestinal e doença renal (12%)<sup>13</sup>.

## 2.4. Proteína do Síndrome de Wiskott Aldrich (WASp): Estrutura e função

O conhecimento da estrutura de WASp facilita a identificação da função de cada um dos seus cinco domínios funcionais. A estrutura molecular da proteína encontra-se representada na Figura 2.

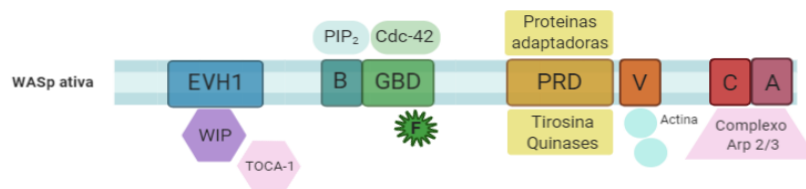


**Figura 2. Estrutura de WASp na sua forma inativa.** Neste esquema a proteína encontra-se em repouso, no seu estado autoinibido, no qual o domínio VCA forma um pseudodomínio com GBD, impossibilitando a interação com o complexo Arp2/3. A molécula WIP ligada ao domínio EVH1 atua estabilizando esta conformação inativa. EVH1, *Ena Vasp Homology 1*; B, *basic domain*; GBD, *GTPase binding domain*; PRD, *Proline-Rich Domain*; V, *Verprolin homology domain*; C, *Central region*; A, *Acidic region*; WIP, *WASp interacting protein*. (Adaptado de <sup>3</sup>)

Na extremidade N-terminal encontra-se o domínio WHI/EVHI (*WASP homology I/Ena Vasp Homology I*) seguido do domínio básico (B), o domínio central GBD, a região rica em prolinas (PRD) e o domínio VCA, formado pela região homóloga de verprolina (V), região central (C) e região ácida (A) na extremidade C-terminal<sup>14</sup>.

No estado de repouso, o domínio VCA forma um pseudo-domínio com o GBD, que mantém a proteína autoinibida, uma vez que, a zona de ligação ao complexo Arp2/3 fica oculta impossibilitando a polimerização de actina<sup>15</sup>. Para manter a estabilidade desta conformação, a proteína interage com a WIP (*WASP Interacting Protein*) que se liga ao domínio EVHI<sup>16</sup>.

Após a ativação celular, a WASp é recrutada para o local de sinalização da membrana. Consoante o microambiente em que a proteína foi recrutada, um ou mais sinais vão resultar na sua ativação. Esses sinais são, nomeadamente, várias moléculas que ao se ligarem à proteína alteram a sua conformação, como representado na Figura 3<sup>15</sup>.

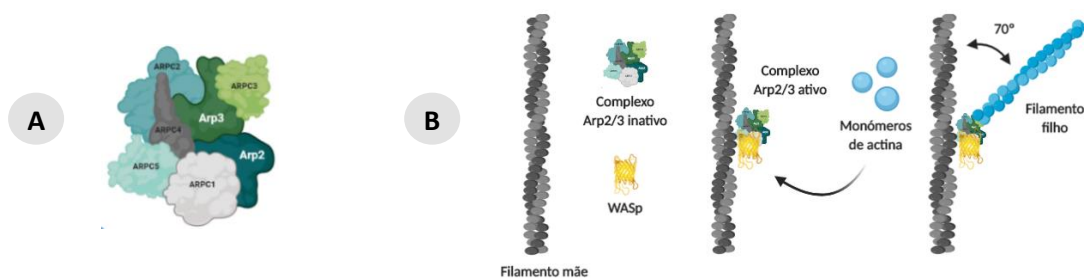


**Figura 3. Estrutura de WASp e as diferentes conformações.** A proteína encontra-se ativada após mediação por vários sinais, nomeadamente o Cdc-42, o PIP<sub>2</sub>, TOCA-1 e a fosforilação de Y291. Após ativação, a proteína desdobra-se deixando o domínio VCA livre para interagir com o complexo Arp2/3 e os monómeros de actina. EVH1, *Ena Vasp Homology 1*; B, *basic domain*; GBD, *GTPase binding domain*; PRD, *Proline-Rich Domain*; V, *Verprolin homology domain*; C, *Central region*; A, *Acidic region*; WIP, *WASp interacting protein*; TOCA-1, *Transducer of CDC42-dependent actin assembly 1*; Cdc-42, *Cell Division Cycle 42*; PIP<sub>2</sub>, *Phosphatidylinositol(4,5)-biphosphate*; F, Fosforilação; Arp2/3: *Actin related protein 2/3*. (Adaptado de <sup>3</sup>)

A molécula TOCA-1 (*transducer of Cdc42-dependent actin assembly*) atua a nível da WIP, porém não se conhece ao certo o seu mecanismo. Teoricamente, consideram-se duas hipóteses: a TOCA-1 atua alterando a conformação do WIP levando à perda da sua função estabilizadora ou atua destruindo o complexo WIP-WAS<sup>17</sup>. Para além disso, esta molécula contribui para a ativação da WASp através da PIP<sub>2</sub> (*phosphatidylinositol (4,5) biphosphate*) e da Cdc-42 (*Cell Division Cycle 42*). A molécula Cdc42-GTP pertencente à família Rho de GTPases e a molécula PIP<sub>2</sub> têm a capacidade de se ligarem, respetivamente, ao domínio GBD e B, e ativar a proteína. A ativação da WASp pode ainda ser mediada por várias moléculas como é o caso das tirosina quinases (Fyn, Lyn, Lck, Hck, Btk) e as proteínas adaptadoras (NCK, CRKL, Grb2) que se ligam ao domínio PRD<sup>15</sup>.

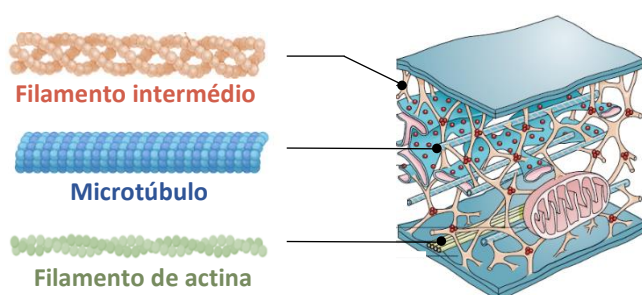
Uma vez ativada, a proteína é estabilizada através da fosforilação de um resíduo de tirosina na posição 291 (Y291) no domínio GBD<sup>18</sup> e dois resíduos de serina na posição 483 e 484 (S483 e S484) no domínio VCA<sup>19</sup>. Para além de estabilizadoras, estas fosforilações conduzem ao aumento da capacidade de ativação do complexo Arp2/3<sup>18,19</sup>.

Após ativação da proteína, esta altera a sua conformação expondo o domínio VCA, e consequentemente, a zona de ligação do complexo Arp2/3<sup>15</sup>, cuja estrutura está representada na Figura 4A.



**Figura 4. Complexo Arp2/3.** A. O complexo Arp2/3 é uma estrutura estável composta por sete proteínas diferentes (Arp2, Arp3, Arpc1, Arpc2, Arpc3, Arpc4, Arpc5). B. Esquema da polimerização de actina mediada pelo complexo Arp 2/3. Arp; *Actin Related Protein*; WASp; *Wiskott Aldrich Syndrome Protein*. (Adaptado de <sup>20</sup>)

O complexo Arp2/3 liga-se às regiões C e A ficando também ele ativado e desencadeando uma ligação a filamentos de actina já existentes (filamento mãe). No ponto da ligação, encontra-se a Arp2 e a Arp3 que por serem homologas da actina formam um núcleo onde se tornam as primeiras duas subunidades do novo filamento de actina (filamento filho) que faz um ângulo de 70 graus em relação ao filamento pré-existente. À região V ligam-se monómeros de actina, que vão posteriormente ser adicionados ao filamento-filho para dar início ao alongamento do ramo de actina. Deste modo, formam-se filamentos de actina ramificados que vão constituir o citoesqueleto<sup>20</sup>.



**Figura 5. Citoesqueleto celular.** O citoesqueleto é um sistema altamente complexo organizado em várias estruturas como: filamentos intermédios, microtúbulos e microfilamentos. (Adaptado de <sup>21</sup>)

O citoesqueleto constitui a estrutura mecânica das células, sendo a principal força motriz para o seu movimento. Portanto, as células para se moverem, contam com o citoesqueleto para produzir forças de empurrão (protrusivas) e forças de tração (contráteis) através da combinação dinâmica da montagem e desmontagem dos filamentos de actina. Ambos os tipos de força são particularmente importantes para o citoesqueleto regular múltiplos aspectos do comportamento celular, incluindo o controlo da morfologia da célula e dos organelos e da motilidade celular e intracelular<sup>22,23</sup>.

A perda de integridade do citoesqueleto celular causa defeitos em quase todos os aspectos na resposta da imunidade ao prejudicar a migração celular, adesão, proliferação, fagocitose de patógenos invasores e formação de sinapses imunológicas<sup>24</sup>.

### 3. WASp NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

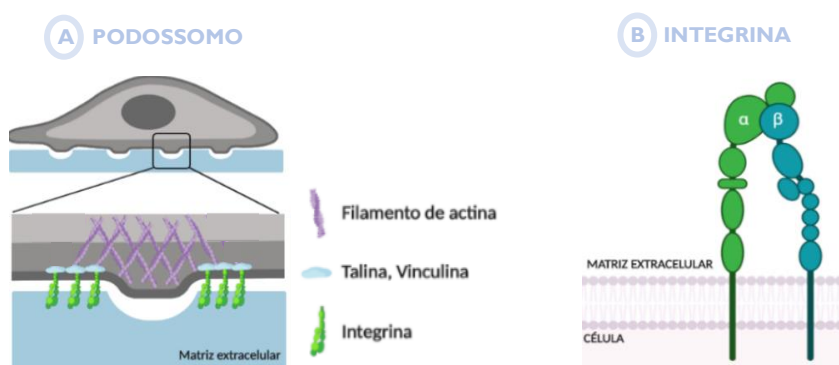
A proteína de WAS é fundamental para diversas funções nas células estaminais hematopoiéticas, pelo que a sua deficiência ou ausência resulta num variadíssimo leque de defeitos funcionais em todas as linhagens. A combinação da função defeituosa de várias células imunes como as células de linhagem mielóide, as células dendríticas, as células NK e os linfócitos T e B, leva à desregulação geral da função imune que se manifesta com infeções recorrentes, respostas inflamatórias anormais, autoimunidade e suscetibilidade a malignidades.

### 3.1. WASp nas células de linhagem mielóide

Muitos defeitos do sistema imunológico em doentes com WAS foram descobertos em células da linhagem mielóide. Esta linhagem é constituída por monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos e megacariócitos/plaquetas. A maioria das células mielóides atuam no sistema imune inato, destacando-se os monócitos/macrófagos e os neutrófilos, que apresentam capacidade fagocítica. Estas células detetam as células invasoras e migram até elas, onde libertam moléculas de sinalização e metabolitos tóxicos. Posteriormente, fagocitam o invasor destruindo-o<sup>21</sup>.

Uma vez que o citoesqueleto constitui a estrutura mecânica celular torna-se evidente que a sua deficiente reorganização compromete a locomoção das células. A resposta quimiotática (locomoção orientada e unidirecional face a um gradiente químico) nos macrófagos de doentes com WAS, encontra-se deficiente quando comparada com células saudáveis. Esta resposta anormal verifica-se apesar dos macrófagos apresentarem uma expressão normal dos recetores dos agentes quimiotáticos<sup>25</sup>. Os neutrófilos e monócitos também vêm a sua resposta quimiotática comprometida<sup>26,27</sup>. Em alguns estudos, determinou-se que a região de WASp mínima necessária para ocorrer quimiotaxia é a região VCA. Coincidentemente, a região mínima necessária para estimular a polimerização de actina é a mesma, o que fortalece a correlação entre os defeitos causados pela WAS e a desregulação do citoesqueleto<sup>28</sup>.

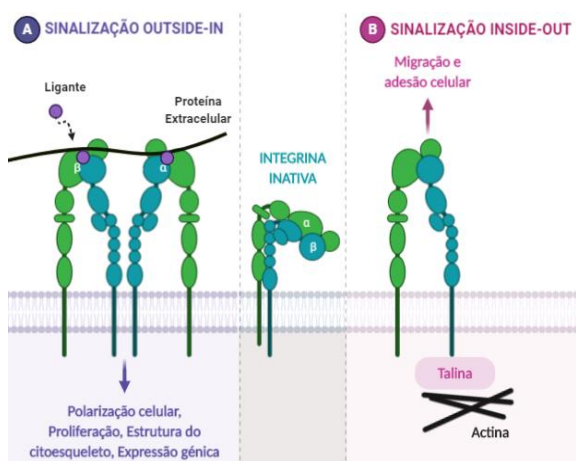
Os doentes com WAS apresentam monócitos/macrófagos com défice de podossomos<sup>29</sup>. Estas estruturas são um tipo de protusão e estão presentes nas células mielóides. A sua organização é única apresentando dois domínios estruturais: um núcleo formado por vários filamentos de actina; e um anel em torno desse núcleo constituído por proteínas de adesão, como as integrinas e proteínas reguladoras de integrina<sup>30,31</sup>.



**Figura 6. Representação esquemática de um podossomo e as moléculas envolvidas. A.** Os podossomos são compostos por duas estruturas, nomeadamente o núcleo de actina e o anel composto por integrina e proteínas que ligam a actina à integrina. **B.** Estrutura da integrina composta por duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ). (Adaptado de <sup>32</sup>)

As integrinas são elementos da família de moléculas de adesão, e são constituídas por duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ) com ligação não covalente. Cada subunidade conta com uma região extracelular, uma região transmembranar e uma região citoplasmática. As extremidades extracelulares das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  unem-se e formam uma estrutura globular, conhecida por “cabeça”, que é responsável pela ligação aos sinais extracelulares<sup>33,34</sup>.

As integrinas são reconhecidas como moléculas de sinalização capazes de realizar a transdução de sinais entre a célula e a matriz extracelular. Durante a ligação com a matriz extracelular, as integrinas agrupam-se e formam um cluster de integrinas na membrana plasmática que promove o agrupamento de filamentos de actina. Deste modo, são formadas as adesões focais, designação dada ao conjunto das proteínas da matriz extracelular, integrinas e proteínas do citoesqueleto que iniciam o processo de sinalização celular<sup>34,35</sup>. Esta sinalização pode ocorrer em dois sentidos, como representado na figura 7.



**Figura 7. Sinalização mediada por integrinas.** Existem dois caminhos na sinalização da integrina que têm consequências biológicas distintas. **A.** As integrinas atuam como recetores de sinalização para as células através da sinalização *outside-in*. A ligação das integrinas aos seus ligantes extracelulares altera a conformação das integrinas que leva a sinais intracelulares que controlam a polarização celular, a proliferação, a estrutura citoesquelética e expressão gênica. **B.** Durante a sinalização *inside-out*, um ativador intracelular, como a talina, liga-se à subunidade  $\beta$ , o que leva a alterações conformacionais da integrina que resultam num aumento de afinidade para ligantes extracelulares (ativação da integrina). Esta sinalização é responsável pela migração e adesão celular.

Na sinalização *inside-out*, ou seja, de dentro para fora, a atividade de ligação extracelular das integrinas é regulada internamente na célula. Por sua vez, na sinalização *outside-in*, a ligação de proteínas da matriz extracelular às integrinas promove sinais que são transmitidos para o interior da célula<sup>34</sup>.

A função adesiva e migratória das células é regulada pela sinalização do tipo *inside-out*, que controla a força de adesão e permite interações suficientemente fortes entre as integrinas e as proteínas da matriz extracelular de modo a que as integrinas sejam capazes de transmitir a força necessária para a migração celular<sup>34</sup>.

Embora esteja bem estabelecido que a deficiência de WASp desregula a reorganização do citoesqueleto, é provável que a função das integrinas também seja indiretamente prejudicada. Para corroborar esta hipótese, verificou-se que a família  $\beta 2$  de integrinas, presente nos podossomos das células mieloides, não se agrupa na ausência de WASp, dando origem a

vários defeitos nas funções dependentes de integrinas<sup>36</sup>. No entanto, em vários estudos, quando se reintroduz o gene WAS sem qualquer mutação, a formação de podossomos é restaurada, assim como a migração<sup>37</sup>. Deste modo, torna-se inegável a vinculação da WASp à formação destas estruturas.

### **3.2. WASp nas células dendríticas (DCs)**

As células dendríticas surgem por uma via de hematopoiese linfo-mielóide e diferenciam-se em subconjuntos especializados sob a influência de fatores de transcrição específicos de cada linhagem. Estas células são consideradas uma ponte entre o sistema imunológico inato e adaptativo, atuando em ambos, ao reconhecer e fagocitar o patógeno invasor, bem como a digeri-lo e a apresentar o material antigénico às células especializadas do sistema imune<sup>38</sup>.

A migração das células dendríticas (DCs) para os locais da inflamação encontra-se prejudicada, à semelhança das células de linhagem mielóide<sup>39</sup>. Os podossomos existentes, característicos dessa mesma linhagem, também demonstram ter uma falha na sua formação e na montagem de integrinas<sup>40</sup>. Para além disso, uma vez sendo células fagocitárias, esta capacidade também se encontra comprometida<sup>41</sup>.

A migração retardada nas DCs com WAS pode levar ao seu amadurecimento das mesmas antes destas atingirem o local de inflamação. Nesta situação, a célula madura inicia, precocemente, a libertação de citocinas e quimiocinas dando origem ao recrutamento de células imunes para o local errado desencadeando processos inflamatórios como, por exemplo, o eczema associado à WAS<sup>42</sup>.

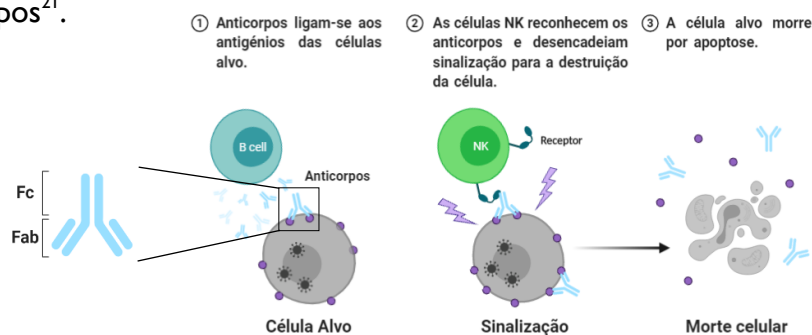
As DCs são células apresentadoras de antígenos (APC), pelo que, não só a migração em resposta aos sinais quimiotáticos é defeituosa, como também a migração até aos linfócitos T nos gânglios linfáticos<sup>43</sup>. Para além disso, estas células apresentam fraca capacidade de apresentação de antígenos<sup>44</sup> e de formação de sinapses imunológicas<sup>45</sup>.

### **3.3. WASp nas células natural killer (NK)**

As células NK são importantes elementos da resposta imune inata que eliminam células afetadas por vírus, parasitas e células tumorais. Apesar de serem consideradas constituintes da imunidade inata, estas células também atuam na imunidade adaptativa através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). As células NK possuem recetores



para a porção Fc das imunoglobulinas, permitindo-lhe interagir com as células alvo revestidas por anticorpos<sup>21</sup>.



**Figura 8. Citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediada por células NK.**

Por outro lado, durante a resposta inata, as células NK são ativadas e migram do sangue para o local de inflamação. Estas células são dotadas de receptores NK que incluem receptores inibitórios e de ativação. Os receptores inibitórios reconhecem as moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), presentes em praticamente todas as células nucleadas, e inibem o ataque por parte das NK. No entanto, tais receptores não são ativados com células infetadas uma vez que estas apresentam níveis de MHC-I reduzidos ou inexistentes. Assim sendo, a resposta das células NK é desencadeada quando os receptores inibitórios não são ativados e quando os receptores de ativação reconhecem ligandos sobre-expressos em células infetadas<sup>21</sup>.

Para além deste mecanismo de ativação, as células NK são também reguladas através de citocinas libertadas pelas células infetadas ou pelas APC. Estes sinais são dependentes de contacto, sendo obrigatória a ocorrência de sinapses imunológicas<sup>21</sup>.

Independentemente do mecanismo de ativação, as células NK ativadas libertam substâncias tóxicas, como as perforinas e granzimas. As perforinas são proteínas com capacidade para produzir pequenos poros na membrana plasmática da célula-alvo, que vão ser penetrados pelas granzimas, que causam a apoptose da célula. Como complemento à ação citotóxica, as células NK produzem citocinas que regulam outras células do sistema imunológico como o interferão *gama* (INF- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral *alfa* e *beta* (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), entre outros<sup>21</sup>.

Em doentes com WAS, as células NK tendem a apresentar valores normais ou elevados<sup>46</sup>, contudo, com alterações a nível funcional incluindo migração comprometida<sup>47</sup>, formação de sinapses imunológicas defeituosas e fraca libertação de grânulos citotóxicos<sup>48</sup>.

As alterações na estrutura da bicamada fosfolipídica assim como a formação das sinapses imunológicas dependem da polimerização de actina que, no caso de doentes com WAS, é deficiente. Logo, as células NK de doentes evidenciam uma fraca capacidade de ligação estável às células e um acúmulo reduzido de actina nessa ligação. As sinapses defeituosas tanto

se sucedem nas ligações NK-células alvo, onde afetam o efeito citotóxico direto, como nas ligações NK-APC, onde desregulam a ativação das NK através das citocinas dependentes de contacto<sup>48</sup>.

A libertação de perforina e granzimas encontra-se defeituosa, uma vez que se gera um acúmulo de perforina no ponto de contato entre as NK e as células alvo, que leva à diminuição da lise das células alvo<sup>48</sup>.

Para além destes defeitos acima descritos, alguns estudos expuseram a ativação do Cdc42 após a ligação das NK às células alvo. O mesmo se verificou aquando a ativação das células NK através da ADCC, para além da fosforilação da tirosina do WASp<sup>46</sup>. Outros estudos demonstraram ainda a vantagem seletiva conferida por mutações espontâneas que reverteram o panorama em doentes com WAS<sup>48</sup>. Todas estas revelações expõem uma inegável ligação entre a WASp e as células NK.

A falta de resposta das células NK face a vírus, em especial, àqueles com potencial oncogénico e a células tumorais é provavelmente a causa do aumento da incidência de malignidade na WAS.

### 3.4. WASp nos linfócitos T

Os linfócitos T fazem parte da imunidade celular, que é um dos mecanismos da imunidade adaptativa. Estas células têm origem na linhagem linfóide das células hematopoéticas da medula óssea. Os precursores dos linfócitos T deixam a medula óssea e migram para o timo, onde ocorre todo o processo de seleção e maturação. Somente após o processo de maturação concluído, é que os linfócitos T maduros deixam o timo e entram na circulação sanguínea<sup>21</sup>.

O processo de maturação dos linfócitos T envolve a expressão de um recetor de células T (TCR) funcional e dos co-recetores CD4 ou CD8. Os TCR presentes na membrana do linfócito T permitem o reconhecimento do complexo MHC/peptídeo. Consoante o tipo de antígeno, a molécula MHC será de classe I ou II, determinando a diferenciação do timócito em linfócito T auxiliar ou linfócito T citotóxico, respetivamente. Por norma, os antígenos exógenos, fagocitados ou endocitados, são associados

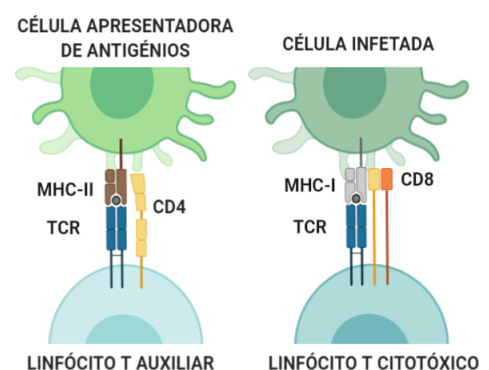
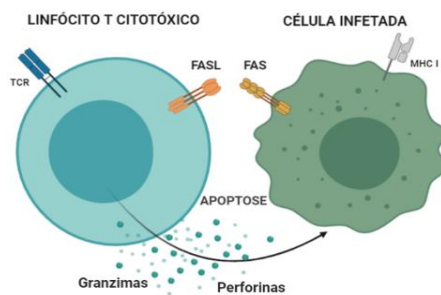


Figura 9. Diferenciação dos linfócitos T. (Adaptado de <sup>21</sup>)

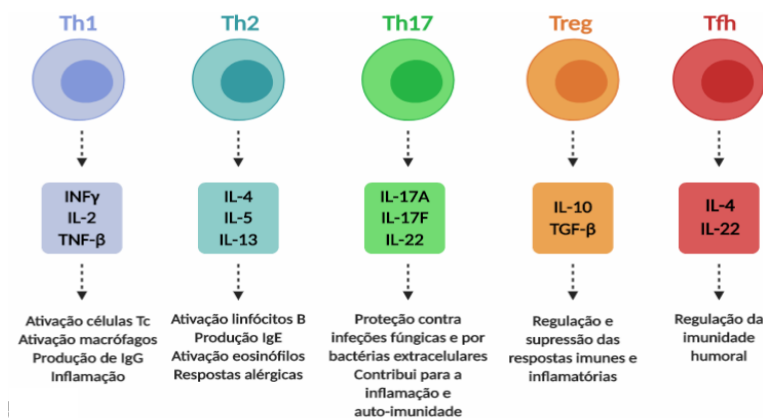
às moléculas de MHC classe II das células apresentadoras de antígenos que interagem com o TCR e a glicoproteína CD4 dando origem a linfócitos T auxiliares. Por sua vez, quando os antígenos são intracelulares, estes são convertidos em peptídeos e acoplados às moléculas de MHC-I. Este complexo é transportado para a superfície celular e apresentado ao TCR e à glicoproteína CD8 facilitando a diferenciação em linfócitos T citotóxicos<sup>21</sup>.

Os linfócitos T citotóxicos após reconhecimento do antígeno por moléculas MHC-I e posterior ativação, proliferam e tornam-se capazes de eliminar por citotoxicidade qualquer célula que apresente esse antígeno específico. Estes linfócitos induzem a apoptose nas células alvo recorrendo a perforinas e granzimas, à semelhança das células NK, ou fazendo-se valer da expressão do recetor FasL que interage com a molécula Fas nas células alvo<sup>21</sup>.



**Figura 10. Destruição de células infectadas mediada por linfócitos T citotóxicos.** (Adaptado de <sup>21</sup>)

Por sua vez, os linfócitos T auxiliares são subdivididos funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem. Embora sejam morfologicamente semelhantes, estas células secretam diferentes padrões de citocinas o que, conseqüentemente, leva a respostas efetoras distintas, como se encontra representado na Figura 11. Os linfócitos T auxiliares são responsáveis por regular a função de outras células do sistema imune, ativando macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e até mesmo, linfócitos T citotóxicos<sup>21</sup>.



**Figura 11. Subconjuntos dos linfócitos T auxiliares, respetivas citocinas produzidas e as suas funções.** IL; interleucinas; TNF, Fator de Necrose Tumoral; TGF, Fator de Transformação de Crescimento. (Adaptado de <sup>21</sup>)

Os doentes com WAS apresentam níveis reduzidos de linfócitos T. A linfopenia manifesta-se na infância e adolescência, ou até mesmo, desde o nascimento, o que sugere uma deficiente produção tímica<sup>49</sup>. Para além disso, foi detetada saída tímica defeituosa<sup>50</sup> e um aumento da frequência de apoptose<sup>51</sup>.

Os linfócitos T doentes exibem protusões anormais e escassez de microvilosidades<sup>52</sup>, e por sua vez, uma capacidade migratória até aos locais de inflamação diminuída. Em 2017 foi identificada uma região única de 30 aminoácidos na WASp que parece desempenhar um papel indispensável na quimiotaxia das células. Essa região não é encontrada na N-WASp (membro da família de fatores promotores da nucleação (NFPs), com mais de 50% de homologia com o WASp) o que pode explicar a incapacidade da N-WASp em compensar funcionalmente o WASp no processo de quimiotaxia<sup>53</sup>.

A sinapse imunológica formada entre o linfócito T e a APC é defeituosa, impossibilitando o reconhecimento ótimo do antígeno e a transdução do sinal<sup>54</sup>. Para além disso, após a ligação do TCR com o APC é, por norma, desencadeada a endocitose do complexo TCR, que neste caso, não se verifica com a devida frequência<sup>55</sup>. Esta internalização é fundamental na modulação da ativação dos linfócitos T, na seleção de timócitos e decisão da linhagem dos linfócitos. A intersectina-2 é uma proteína adaptadora que atua na endocitose do TCR, cuja localização nas células foi determinada como sendo a mesma que a WASp e o Cdc42, confirmando a interação dessas proteínas após a formação da sinapse. Esta evidência pode justificar o facto de doentes com WAS verificarem uma redução significativa da endocitose do TCR nos linfócitos T<sup>56</sup>.

Adicionalmente, os linfócitos T, tanto os auxiliares como os citotóxicos, revelam dificuldades numa das suas principais funções, a secreção de citocinas<sup>57,58</sup>.

### **3.4.1. WASp nos linfócitos T auxiliares reguladores (Treg)**

Os Treg são um subtipo dos linfócitos T auxiliares especializados em atenuar a reação do sistema imunológico face a antígenos que não são próprios e promover a tolerância em relação a antígenos próprios. Ou seja, estas células desempenham um importante papel na manutenção da autotolerância imunológica e no controlo das respostas autoimunes. Estas células com função imunorreguladora apresentam como característica básica a capacidade de produção de citocinas imunossupressoras, como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ )<sup>59</sup>.

Em doentes com WAS, o número e o nível de desenvolvimento das Treg mostram-se normais, ao contrário da sua atividade funcional. A libertação das citocinas Il-10 e TGF- $\beta$  encontra-se comprometida, e conseqüentemente a capacidade em suprimir a resposta imune<sup>60</sup>.

As células Treg necessitam de marcadores que regulem o tráfego celular como CD103, P-seletina, E-seletina e CCR4 o que se encontra defeituoso na ausência de WASp. Daí, os doentes com WAS evidenciam uma quantidade quase inexistente de Treg nos tecidos periféricos inflamados e um menor número nos tecidos linfóides secundários<sup>61</sup>.

Os linfócitos Treg induzem a apoptose dos linfócitos B através da libertação de granzima B. Através de alguns estudos foi possível detetar em doentes com WAS uma redução significativa da secreção da granzima B, e por consequência, uma fraca indução da apoptose de linfócitos B<sup>62</sup>.

A inaptidão dos linfócitos Treg, deficientes em WASp em controlar os linfócitos T efetores e os linfócitos B pode explicar parcialmente a propensão à desregulação autoimune em doentes com WAS. De modo a fortalecer esta relação, alguns estudos mostraram que a reexpressão do WASp após uma mutação de reversão num doente demonstrou uma vantagem seletiva na população Treg com uma diminuição correspondente na doença autoimune e melhoria da condição clínica<sup>61</sup>.

#### **3.4.2. WASp nos linfócitos T auxiliares foliculares (Tfh)**

Os linfócitos T auxiliares foliculares são um subconjunto das células T auxiliares que colaboram na regulação da resposta humoral. São células especializadas em promover a formação de centros germinativos, regular a proliferação e diferenciação dos linfócitos B, e subsequentemente, a maturação de anticorpos<sup>63</sup>.

A diferenciação em Tfh é um processo multifatorial que envolve várias etapas. O linfócito T auxiliar naive interage com uma molécula apresentadora de antígenos que leva à expressão da interleucina 21 (IL-21) e da proteína do linfoma 6 de linfócitos B (Bcl6). A IL-21 para além de se ligar à superfície dos linfócitos B e auxiliar na produção de anticorpos de alta afinidade, também contribui para a expressão do BCL6 atuando de forma autócrina. A proteína BCL6 é o principal fator de transcrição que atua como repressor transcrricional, reprimindo fatores de transcrição que induzem a diferenciação de outros fenótipos de linfócitos T auxiliares, direcionando a diferenciação para os linfócitos Tfh. Uma vez diferenciado, o Tfh expressa o recetor de quimiocina C-X-C tipo 5 (CXCR5) que faz com que a célula migre até

à fronteira entre a zona dos linfócitos B e T, de modo a que ocorra a ligação com os linfócitos B. Essa interação leva à formação de centros germinativos, à maturação dos linfócitos B e à sua diferenciação. Para além disso, certas citocinas libertadas pelas Tfh promovem a mudança de classes de imunoglobulinas nos linfócitos B. Posteriormente à resposta imune, as células Tfh tornam-se células de memória capazes de reagir mais prontamente em caso de reexposição aos antígenos<sup>63</sup>.

A contribuição dada pelas células Tfh para a patogênese da WAS ainda não está bem definida. No entanto, todos os doentes com expressão deficiente de WASp evidenciam uma frequência claramente reduzida de células Tfh, com atividade irregular, fraca proliferação, diferenciação defeituosa e apoptose aumentada. A expressão do fator de transcrição BCL6 e do CXCR5 também se encontra diminuída, assim como a quantidade de linfócitos Tfh de memória. Contudo, o mecanismo pelo qual a deficiência do WASp leva a estas alterações não está totalmente identificado<sup>64</sup>.

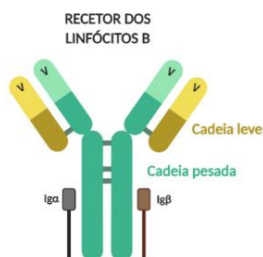
A nível dos centros germinativos constatou-se uma diminuição progressiva dos mesmos assim como regiões mais reduzidas de linfócitos T e linfócitos B<sup>64</sup>. Estas perturbações juntamente com os defeitos gerais dos linfócitos Tfh, evidentemente, prejudicam a resposta humoral, contudo, os linfócitos B também têm defeitos intrínsecos.

### **3.5. WASp nos linfócitos B**

Os linfócitos B são células pertencentes à linhagem linfoide. As células precursoras permanecem na medula óssea durante todos os estágios de maturação (Pró-B, Pré-B, linfócitos imaturos, linfócitos B maduros). Uma vez maduros, os linfócitos migram até aos órgãos linfoides secundários onde podem dar início a uma resposta imunológica ou re-circular pelo sangue ou linfa<sup>21</sup>.

Estas células estão incluídas no sistema imunológico adaptativo, estando encarregues da imunidade humoral, que se caracteriza pela produção e libertação de anticorpos com capacidade para neutralizar ou destruir os respetivos antígenos<sup>21</sup>.

Para que tal aconteça, os linfócitos B têm de ser ativados, o que ocorre através da ligação do recetor das células B (BCR) com o epítipo antigénico das células alvo. Os BCRs são constituídos por uma imunoglobulina presente na membrana plasmática responsável pelo reconhecimento do antígeno. Para além disso, os BCRs incluem duas cadeias peptídicas, Igα e Igβ, cuja função é dar início à cascata de sinalização intracelular após a ligação ao antígeno<sup>65</sup>.



**Figura 12. Estrutura dos receptores dos linfócitos B.** Os BCRs são constituídos por uma imunoglobulina e duas cadeias peptídicas, Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ . A imunoglobulina tem duas cadeias pesadas idênticas, com uma região variável (assinalada com V) e três ou quatro regiões constantes. As duas cadeias leves também apresentam uma região variável, porém, só têm uma região constante. O antígeno liga-se ao receptor nas regiões variáveis de ambas as cadeias. (Adaptado de <sup>21</sup>)

De modo a alcançar a sinalização ideal em resposta ao antígeno, o linfócito B experimenta alterações morfológicas de alongação e contração do BCR. Os linfócitos expandem o seu contato com o antígeno através da polimerização de actina na borda da zona de contato do BCR<sup>65</sup>.

A ativação dos linfócitos B pode derivar de dois caminhos distintos: a resposta T independente e a resposta T dependente. No caso da resposta T dependente, a ativação dos linfócitos B requer a colaboração das células T auxiliares foliculares, como referido anteriormente no ponto 3.4.2.. Este tipo de resposta desencadeia uma série de eventos intracelulares que levam à proliferação e diferenciação destas células em plasmócitos com produção de imunoglobulinas com alta afinidade para o epítipo antigênico que originou a resposta e em linfócitos B de memória<sup>21</sup>.

Por outro lado, a resposta T independente faz parte da imunidade inata, acabando por preencher a lacuna temporal necessária até à produção e libertação de anticorpos de alta afinidade pela resposta T dependente. Este tipo de resposta é mediado, em parte, pela população especializada de linfócitos B nas zonas marginais do baço, os MZ-B. Este subtipo de linfócitos B reage a estímulos antigênicos, normalmente polissacarídeos, e diferencia-se em plasmócitos de curta duração. Tais plasmócitos, libertam anticorpos únicos, os IgM, apresentando baixa afinidade<sup>21</sup>.

Os doentes com WAS apresentam valores anormalmente baixos de células Pré-B, de linfócitos B imaturos e maduros. À semelhança das células imunológicas acima descritas, estes linfócitos B também revelam protusões defeituosas, e conseqüentemente, dificuldade na migração. As alterações na motilidade podem explicar vários defeitos encontrados, tais como o número reduzido de linfócitos B no sangue e a morfologia anormal do baço e dos gânglios linfáticos<sup>66</sup>.

De igual forma, a migração defeituosa parece ser a causa aparente do défice de linfócitos MZ-B na zona marginal do baço, contudo, a fraca retenção das células nessa zona também parece estar envolvida. A retenção destes linfócitos é mediada por integrinas, que na

ausência de WASp, são afetadas, como já foi referido no ponto 3.1.. A redução de linfócitos B é consistente com a resposta comprometida que se faz notar face a antígenos polissacarídeos<sup>66</sup>.

A sinalização através do BCR encontra-se prejudicada, o que resulta numa deficiente formação de sinapses imunológicas e consequentes falhas na ativação dos linfócitos B. A reduzida resposta dos linfócitos B face à polarização por parte dos linfócitos T pode justificar os defeitos detetados em relação à diferenciação dos linfócitos e à mudança anormal da classe de imunoglobulina. A quantidade de linfócitos B de memória encontra-se reduzida, assim como a de alguns anticorpos produzidos pelos plasmócitos<sup>66</sup>.

A autoimunidade é, maioritariamente, associada às células Treg porém, alguns estudos demonstraram que a deleção seletiva do gene WAS nas células B pode levar à hiperproliferação de autoanticorpos. Desta forma, é possível afirmar que a disfunção intrínseca dos linfócitos B é suficiente para estabelecer a autoimunidade<sup>66</sup>.

### **3.5.1. WASp nos linfócitos B10**

Recentemente foram detetados linfócitos B reguladores que inibem as respostas imunes inflamatórias. Um dos mecanismos mais descrito pelo qual estes linfócitos suprimem a inflamação é a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10, daí a designação de linfócitos B10. Ao produzir IL-10, os linfócitos B10 medeiam a supressão da inflamação através de vários mecanismos, incluindo a regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ . Estas células desempenham funções imunes significativas, incluindo a manutenção da tolerância periférica, a regulação da eliminação de patógenos e a modulação da resposta imune antitumoral<sup>67</sup>.

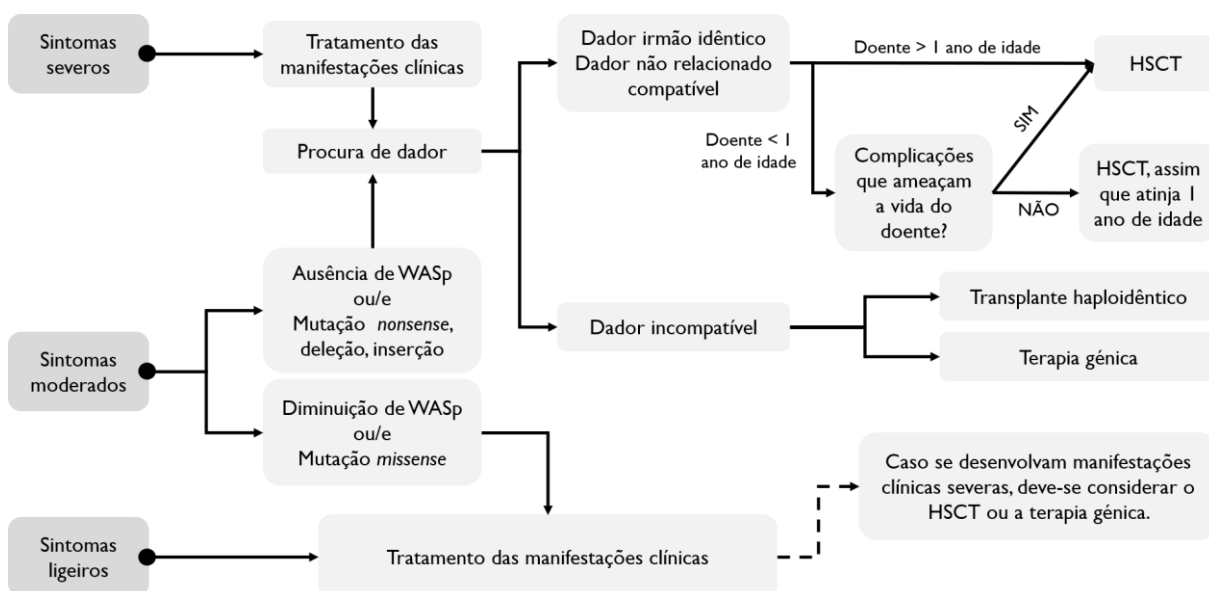
À semelhança dos linfócitos B, os linfócitos B10 recebem sinais externos através do BCR, que levam à ativação da WASp e posterior reorganização do citoesqueleto. Este processo é crucial para a migração e adesão das células que são fundamentais para a ativação, desenvolvimento e função dos linfócitos B10. A defeituosa sinalização do BCR, juntamente com a anormal migração e adesão, parece explicar os níveis reduzidos destas células em doentes com WAS<sup>68</sup>.

Embora o papel das células B10 ainda não esteja claramente definido, é possível especular que a sua deficiência possa contribuir para os distúrbios autoimunes.



## 4. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

A abordagem de tratamento em doentes com WAS é adaptada às manifestações clínicas e ao grau de gravidade. Em casos menos severos, onde o risco das opções de tratamento definitivas é considerado demasiado elevado, pode ser usado o tratamento destinado a gerir as manifestações clínicas individuais. Neste caso, o tratamento não é curativo, porém, é o suficiente para preservar a qualidade de vida do doente. Quando possível, o tratamento de escolha é o transplante de células estaminais hematopoiéticas (HSCT). Como alternativa, pode-se recorrer à terapia génica, sobre a qual foram reportados avanços recentes. Esta terapia ainda se encontra sob investigação, pelo que, apenas é utilizada nos casos em que não se encontra nenhum dador compatível para o HSCT<sup>69</sup>.



**Figura 13. Algoritmo de tratamento para doentes com WAS e XLT.** Os algoritmos de tratamento para doentes com WAS/XLT dependem do quadro clínico, da expressão da proteína e da mutação genética. (Adaptado de <sup>69</sup>)

### 4.1. Terapêutica na imunodeficiência

A prevenção e o tratamento imediato de infeções são um dos pilares de um tratamento eficaz nos doentes com WAS. Nos casos específicos em que se está a considerar o HSCT, é ainda mais necessário a atenção à prevenção e tratamento de complicações infecciosas de modo a limitar a morbilidade pré-HSCT<sup>70</sup>.

Em doentes com sinais ou sintomas clínicos de infeção, é fundamental uma avaliação e tratamento imediatos. A avaliação deve ser exaustiva até que a fonte da infeção seja descoberta, podendo incluir avaliações invasivas. Na maioria dos casos, é necessário recorrer ao tratamento antibiótico parenteral empírico<sup>70</sup>.

A decisão acerca do início da quimioprofilaxia e da inclusão de medicamentos antivirais, antibacterianos e/ou antifúngicos, depende da frequência, gravidade e tipo de infeções identificadas em cada doente individualmente. Ou seja, no caso de doentes que tiveram infeções virais significativas, pode-se considerar o uso de agentes antivirais profiláticos. Assim como, no caso de doentes com infeções sinopulmonares bacterianas recorrentes, pode-se recorrer ao uso de antibióticos profiláticos. Para além disso, na situação de doentes que foram submetidos a esplenectomia, todos os doentes devem ser medicados com antibiótico profilático para o resto da vida<sup>70</sup>.

Doentes com infeções recorrentes, níveis quantitativos de imunoglobulinas anormais ou respostas defeituosas de anticorpos devem iniciar o tratamento de reposição de Ig. Devido à tendência de sangramento na WAS, a maioria dos médicos prescreve a terapia com imunoglobulina intravenosa em vez de injeções de imunoglobulina subcutânea<sup>71</sup>.

#### **4.2. Terapêutica na autoimunidade**

As complicações autoimunes requerem uma terapia imunossupressora, o que pode ser desafiante devido à imunodeficiência presente em doentes com WAS. Alguns casos de autoimunidade podem ser secundários e estar associados a patógenos infecciosos, sendo bastante importante fazer um correto diagnóstico<sup>72</sup>.

Os corticosteroides são amplamente utilizados, no entanto, apenas 10% dos doentes são sensíveis a monoterapia com corticosteroides. Dado a este facto, é frequente a associação a outros medicamentos imunossupressores, como a ciclofosfamida, azatioprina e ciclosporina. Para além disso, pode-se recorrer à utilização de anticorpos monoclonais como é o caso do rituximab (anti-CD20) que leva à destruição de linfócitos B, revelando-se um complemento útil à terapia imunossupressora<sup>72</sup>.

Em doentes com WAS, nos quais está a ser considerado o HSCT é necessária uma atenção redobrada uma vez que a autoimunidade pré-HSCT parece estar associada a um risco aumentado de autoimunidade pós-HSCT<sup>72</sup>.

#### **4.3. Transplante de células estaminais hematopoéticas (HSCT)**

O transplante com células estaminais hematopoéticas é o único tratamento curativo para o síndrome de Wiskott-Aldrich. Apesar do risco de complicações pós-transplante, existe um consenso de que doentes com WAS clássica, com um score igual ou superior a 3, devem

ser transplantados. Já o uso do HSCT num fenótipo menos severo, como no XLT, ainda é controverso devido à excelente sobrevida com o tratamento sintomático. No caso de doentes com XLT que apresentem complicações, o HSCT pode ser considerado, especialmente se houver um dador irmão com HLA (Antigénio Leucocitário Humano) idêntico. Portanto, a decisão de realizar ou não o HSCT em casos mais leves do síndrome, é tomada caso a caso<sup>73</sup>.

A taxa de sobrevivência após o HSCT é elevada, porém qualquer doente sujeito a um transplante é exposto a complicações pós- HSCT, como a doença aguda ou crônica do enxerto contra o hospedeiro (DECH) que é observada especialmente no primeiro ano após o transplante<sup>74</sup>.

Vários critérios afetam o nível de sucesso do HSCT, dos quais os mais importantes são o regime de condicionamento, a fonte dadora, a idade, o estado clínico do recetor no momento do HSCT e a fonte do enxerto<sup>75</sup>.

O procedimento do HSCT tem início num regime de condicionamento mieloablativo, no qual se destrói irreversivelmente a medula óssea. Para o efeito, recorre-se, por norma, ao bussulfano. Para além deste fármaco, é ainda administrado um imunossupressor, como a ciclofosfamida, que visa evitar a rejeição após o transplante. As altas doses de quimioterapia a que o doente é submetido podem trazer complicações, pelo que estão a ser realizados vários estudos de modo a descobrir regimes de condicionamento menos tóxicos<sup>76,77</sup>.

O tipo de dador é um fator a ter em consideração na utilização do HSCT em doentes com WAS. Como esperado, os melhores resultados de transplante são obtidos com dadores irmãos com HLA idênticos e dadores não relacionados compatíveis enquanto que as menores taxas de sobrevida estão associadas a dadores não relacionados incompatíveis<sup>73</sup>. Historicamente, os dados relativos a transplantes haploidênticos, nos quais, a compatibilidade recetor/dador é de apenas 50%, não são favoráveis devido à alta mortalidade associada à DECH. Porém, atualmente, conseguiu-se superar essa complicação e na falta de dadores compatíveis, pode-se recorrer a um dador haploidêntico<sup>78</sup>.

No cenário da WAS, a idade do recetor no momento do HSCT é um fator importante. Doentes com idade mais avançada, isto é, com mais de 5 anos de idade, no momento do transplante estão associados a uma sobrevida inferior. Os doentes submetidos ao HSCT com dador não relacionado compatível em idades mais jovens apresentam resultados comparáveis aos transplantes com dadores irmãos com HLA idêntico, provando que a idade é um fator crítico. No entanto, o transplante não é recomendado em doentes com menos de 1 ano,

devido à falta de informação. Nesta situação, o transplante só deve ser considerado caso o doente apresente complicações que ameacem a sua sobrevivência<sup>78,79</sup>.

Relativamente ao estado clínico, os doentes que se encontram em melhores condições clínicas revelam uma menor taxa de complicações pós- HSCT<sup>75</sup>.

A maioria da experiência clínica no HSCT em doentes com WAS está associada ao uso da medula óssea. Esta fonte de enxerto fornece resultados excelentes, à semelhança de transplantes que recorrem ao sangue do cordão umbilical. No entanto, outras fontes de células dadoras, como células estaminais do sangue periférico, também podem ser consideradas, embora exista um risco maior de DECH<sup>75</sup>.

#### **4.4. Terapia génica**

Em média, o HSCT de dadores familiares idênticos ao HLA apenas está disponível para uma quantidade relativamente baixa de doentes transplantados, rondando os 20%. Embora o HSCT esteja em constante aperfeiçoamento, a morbidade e mortalidade associada ao transplante de dadores incompatíveis justifica a investigação de tratamentos alternativos como a terapia génica<sup>1</sup>.

A terapia génica tem por base a inserção de um gene funcional dentro das células do doente de forma a substituir o gene defeituoso e promover a correta produção de proteínas. Para que o gene seja colocado no interior da célula, é necessária a utilização de um vetor, que normalmente é um vírus devido à sua capacidade de entrar na célula humana e inserir os seus genes<sup>80</sup>.

Esta estratégia terapêutica oferece várias vantagens em relação ao transplante. Primeiramente, a terapia génica é um tratamento disponível a todos os doentes. Em segundo, o risco de rejeição do enxerto é mais reduzido, o que se traduz numa necessidade menor de regime de condicionamento e imunossupressão pós-transplante eliminando as possíveis complicações que poderiam advir desses procedimentos<sup>1</sup>.

As primeiras tentativas de terapia génica na WAS, que recorreram a um vetor retroviral, melhoraram substancialmente os parâmetros imunológicos, contudo, apresentaram uma percentagem elevada de doentes que desenvolveram leucemia aguda<sup>81</sup>.

Esses valores levaram os investigadores a utilizar outro vetor, nomeadamente o vetor lentiviral (LV) derivado do vírus da imunodeficiência humana (HIV). A terapia génica revelou ser eficaz no tratamento de WAS, com estudos a demonstrar uma reconstituição imunológica

adequada, capaz de fornecer proteção contra infecções e controlo da autoimunidade na maioria dos doentes. Porém, a trombocitopenia revelou-se persistente em vários doentes, embora de forma mais branda e principalmente assintomática<sup>80</sup>.

A toxicidade limitada e a ausência de mortalidade nos doentes tratados com terapia génica com vetor lentiviral contrasta com o potencial de morbilidade, mortalidade e complicações a longo prazo em doentes tratados com HSCT, o que leva a que a terapia génica pareça uma opção mais favorável. Contudo, ao contrário da terapia génica, os dados sobre o HSTC derivam de observações de centenas de doentes, o que induz um nível mais alto de confiança neste tipo de tratamento<sup>82</sup>. Atualmente, a experiência com terapia génica apenas demonstra segurança e eficácia a curto e médio prazo, sendo o acompanhamento mais longo de aproximadamente 9 anos. O tempo relatado de ocorrência de leucemia no estudo retroviral foi entre os 1 e 5 anos, sendo que, até ao momento, nenhum doente desenvolveu neoplasias. Todavia, é crucial manter o acompanhamento ao longo da vida de todos os doentes tratados com terapia genica<sup>80</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

O Síndrome Wiskott Aldrich caracteriza-se por imunodeficiência e autoimunidade, sendo possível identificar alterações na função das células do sistema imunológico. As anomalias detetadas são, essencialmente, na migração, adesão, proliferação, fagocitose e sinalização celular, que são funções dependentes do citoesqueleto. Estas descobertas são consistentes com a deficiência em WASp, uma vez que esta proteína está intimamente envolvida na polimerização de actina.

Embora tenha sido feito um amplo progresso no entendimento das bases fisiopatológicas desta patologia, a WAS continua a ser um desafio clínico e a requerer uma abordagem multidisciplinar. É de esperar que à medida que as pesquisas avançam, o entendimento sobre os mecanismos seja mais aprofundado e que seja possível aprimorar a precisão do diagnóstico, bem como a eficácia dos tratamentos.

Na década de 60, a expectativa de vida em doentes com WAS era bastante reduzida motivada pelas graves complicações da patologia. Atualmente, mesmo na ausência do tratamento curativo (HSCT), a expectativa de vida aumentou até à idade adulta, graças às modernas opções de profilaxia e de tratamento das manifestações clínicas. A evolução em direção à aplicação da terapia génica como tratamento fornece algum otimismo, porém, são necessários mais estudos e períodos de observação mais longos para determinar se este tipo de tratamento pode oferecer uma cura definitiva para os doentes afetados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Candotti, F. - **Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott-Aldrich Syndrome.** *Journal of Clinical Immunology* vol. 38 13–27 (2018).
2. Stray-Pedersen, A., Abrahamsen, T. G. & Frøland, S. S. - **Primary immunodeficiency diseases in Norway.** *J. Clin. Immunol.* 20, 477–485 (2000).
3. Massaad, M. J., Ramesh, N. & Geha, R. S. - **Wiskott-Aldrich syndrome: A comprehensive review.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1285, 26–43 (2013).
4. Moulding, D. A., Record, J., Malinova, D. & Thrasher, A. J. - **Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency.** *Immunol. Rev.* 256, 282–299 (2013).
5. Kwan, S. P. *et al.* - **Genetic mapping of the Wiskott-Aldrich syndrome with two highly-linked polymorphic DNA markers.** *Genomics* 3, 39–43 (1988).
6. Boonyawat, B. *et al.* - **Combined de-novo mutation and non-random X-chromosome inactivation causing Wiskott-Aldrich syndrome in a female with thrombocytopenia.** *J. Clin. Immunol.* 33, 1150–1155 (2013).
7. Siminovitch, K. A. - **Prenatal diagnosis and genetic analysis of Wiskott-Aldrich syndrome.** *Prenatal Diagnosis* vol. 23 1014–1016 (2003).
8. Imai, K., Nonoyama, S. & Ochs, H. D. - **WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype.** *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 3, 427–436 (2003).
9. Notarangelo, L. D. *et al.* - **Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia.** *Blood* 99, 2268–2269 (2002).
10. Keszei, M. *et al.* - **Constitutive activation of WASp in X-linked neutropenia renders neutrophils hyperactive.** *J. Clin. Invest.* 128, 4115–4131 (2018).
11. Buchbinder, D., Nugent, D. J. & Phillipovich, A. H. - **Wiskott-Aldrich syndrome: Diagnosis, current management, and emerging treatments.** *Application of Clinical Genetics* vol. 7 55–66 (2014).
12. Davis, B. R. & Candotti, F. - **Revertant somatic mosaicism in the Wiskott-Aldrich syndrome.** *Immunologic Research* vol. 44 127–131 (2009).
13. Sullivan, K. E., Mullen, C. A., Blaese, R. M. & Winkelstein, J. A. - **A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome.** *J. Pediatr.* 125, 876–885 (1994).
14. Ochs, H. D. & Notarangelo, L. D. - **Structure and function of the Wiskott-Aldrich syndrome protein.** *Current Opinion in Hematology* vol. 12 284–291 (2005).

15. Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A. & Rosen, M. K. - **Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein.** *Nature* 404, 151–158 (2000).
16. Sasahara, Y. - **WASP-WIP complex in the molecular pathogenesis of Wiskott-Aldrich syndrome.** *Pediatrics International* vol. 58 4–7 (2016).
17. Ho, H. Y. H. *et al.* - **Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex.** *Cell* 118, 203–216 (2004).
18. Cory, G. O. C., Garg, R., Cramer, R. & Ridley, A. J. - **Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation.** *J. Biol. Chem.* 277, 45115–45121 (2002).
19. Cory, G. O. C., Cramer, R., Blanchoin, L. & Ridley, A. J. - **Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP.** *Mol. Cell* 11, 1229–1239 (2003).
20. Wear, M. A., Schafer, D. A. & Cooper, J. A. - **Actin dynamics: Assembly and disassembly of actin networks.** *Current Biology* vol. 10 (2000).
21. Bruce, A. *et al.* - **Biologia Molecular da Célula.** Artmed, (2017).
22. Svitkina, T. - **The actin cytoskeleton and actin-based motility.** *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a018267 (2018).
23. Rottner, K., Faix, J., Bogdan, S., Linder, S. & Kerkhoff, E. - **Actin assembly mechanisms at a glance.** *J. Cell Sci.* 130, 3427–3435 (2017).
24. Thrasher, A. J. & Burns, S. O. - **WASP: A key immunological multitasker.** *Nature Reviews Immunology* vol. 10 182–192 (2010).
25. Zicha, D. *et al.* - **Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome.** *Br. J. Haematol.* 101, 659–665 (1998).
26. Mantovani, A. *et al.* - **Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Chemoattractant Protein-1 and Polarization in Response to Monocyte Reduced Chemotaxis and Lack of Cell Monocytes from Wiskott-Aldrich Patients Display.** <http://www.jimmunol.org/content/161/> (2020).
27. Zhang, H. *et al.* - **Impaired Integrin-Dependent Function in Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-Deficient Murine and Human Neutrophils.** *Immunity* 25, 285–295 (2006).



28. Yazar, D., Wayne, T., Arie, A. & Welch, M. D. - **The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex.** *Curr. Biol.* 9, 555–558 (1999).
29. Linder, S. & Kopp, P. - **Podosomes at a glance.** *J. Cell Sci.* 118, 2079–2082 (2005)
30. Luxenburg, C., Winograd-Katz, S., Addadi, L. & Geiger, B. - **Involvement of actin polymerization in podosome dynamics.** *J. Cell Sci.* 125, 1666–1672 (2012).
31. Luxenburg, C. *et al.* - **The Architecture of the Adhesive Apparatus of Cultured Osteoclasts: From Podosome Formation to Sealing Zone Assembly.** *PLoS One* 2, e179 (2007).
32. **Proposition de représentation schématique d'un podosome de cellule...** | Download Scientific Diagram. <https://www.researchgate.net/figure/Proposition-de-representation-schematique-dun-podosome-de-cellule-monocytaire-A-et-fig3-24037449>
33. Campbell, I. D. & Humphries, M. J. - **Integrin structure, activation, and interactions.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* vol. 3 1–14 (2011).
34. Kadry, Y. A. & Calderwood, D. A. - **Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins.** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1862 183206 (2020).
35. Wehrle-Haller, B. - **Structure and function of focal adhesions.** *Current Opinion in Cell Biology* vol. 24 116–124 (2012).
36. Burns, S. *et al.* - **Maturation of DC Is Associated with Changes in Motile Characteristics and Adherence.** *Cell Motil. Cytoskeleton* 57, 118–132 (2004).
37. Jones, G. E., Zicha, D., Dunn, G. A., Blundell, M. & Thrasher, A. - **Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 806–815 (2002).
38. Collin, M. & Ginhoux, F. - **Human dendritic cells.** *Seminars in cell & developmental biology* vol. 86 1–2 (2019).
39. De Noronha, S. *et al.* - **Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein.** *Blood* 105, 1590–1597 (2005).
40. Olivier, A. *et al.* - **A partial down-regulation of WASP is sufficient to inhibit podosome formation in dendritic cells.** *Mol. Ther.* 13, 729–737 (2006).
41. Leverrier, Y. *et al.* - **Cutting Edge: The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Is Required for Efficient Phagocytosis of Apoptotic Cells.** *J. Immunol.* 166, 4831–4834

- (2001).
42. Moulding, D. A., Record, J., Malinova, D. & Thrasher, A. J. - **Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency.** *Immunol. Rev.* 256, 282–299 (2013).
  43. De Noronha, S. *et al.* - **Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein.** *Blood* 105, 1590–1597 (2005).
  44. Westerberg, L., Wallin, R. P. A., Greicius, G., Ljunggren, H. G. & Severinson, E. - **Efficient antigen presentation of soluble, but not particulate, antigen in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein.** *Immunology* 109, 384–391 (2003).
  45. Bouma, G. *et al.* - **Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming.** *Blood* 118, 2492–2501 (2011).
  46. Gismondi, A. *et al.* - **Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: Ability of IL-2 to correct NK cell functional defect.** *Blood* 104, 436–443 (2004).
  47. Stabile, H. *et al.* - **Impaired NK-cell migration in WAS/XLT patients: Role of Cdc42/WASp pathway in the control of chemokine-induced  $\beta$ 2 integrin high-affinity state.** *Blood* 115, 2818–2826 (2010).
  48. Orange, J. S. *et al.* - **Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11351–11356 (2002).
  49. Park, J. Y. *et al.* - **Early deficit of lymphocytes in Wiskott-Aldrich syndrome: Possible role of WASP in human lymphocyte maturation.** *Clin. Exp. Immunol.* 136, 104–110 (2004).
  50. Li, W. *et al.* - **Defective thymic output in WAS patients is associated with abnormal actin organization.** *Sci. Rep.* 7, 11978 (2017).
  51. Rawlings, S. L. *et al.* - **Spontaneous apoptosis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome: Correlation of accelerated cell death and attenuated Bcl-2 expression.** *Blood* 94, 3872–3882 (1999).
  52. Kenney, D. *et al.* - **Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich Syndrome.** *Blood* 68, 1329–1332 (1986).
  53. Jain, N. & Thanabalu, T. - **Molecular difference between WASP and N-WASP**

- critical for chemotaxis of T-cells towards SDF-1 $\alpha$ . *Sci. Rep.* 5, 15031 (2015).
54. Dupré, L. *et al.* - **Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation.** *Immunity* 17, 157–166 (2002).
  55. Zhang, J. *et al.* - **Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes.** *J. Exp. Med.* 190, 1329–1341 (1999).
  56. McGavin, M. K. H. *et al.* - **The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis.** *J. Exp. Med.* 194, 1777–1787 (2001).
  57. Morales-Tirado, V. *et al.* - **Cutting Edge: Selective Requirement for the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein in Cytokine, but Not Chemokine, Secretion by CD4 + T Cells .** *J. Immunol.* 173, 726–730 (2004).
  58. Trifari, S. *et al.* - **Defective Th1 Cytokine Gene Transcription in CD4 + and CD8 + T Cells from Wiskott-Aldrich Syndrome Patients .** *J. Immunol.* 177, 7451–7461 (2006).
  59. Shevyrev, D. & Tereshchenko, V. - **Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis.** *Frontiers in Immunology* vol. 10 (2020).
  60. Marangoni, F. *et al.* - **WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4 +CD25+FOXP3+ natural regulatory T cells.** *J. Exp. Med.* 204, 369–380 (2007).
  61. Humblet-Baron, S. *et al.* - **Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis.** *J. Clin. Invest.* 117, 407–418 (2007).
  62. Adriani, M. *et al.* - **Defective inhibition of B-cell proliferation by Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient regulatory T cells.** *Blood* 117, 6608–6611 (2011).
  63. Crotty, S. - **T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases.** *Immunity* vol. 50 1132–1148 (2019).
  64. Zhang, X. *et al.* - **Abnormalities of follicular helper T-cell number and function in Wiskott-Aldrich syndrome.** *Blood* 127, 3180–3191 (2016).
  65. Treanor, B. - **B-cell receptor: From resting state to activate.** *Immunology* vol. 136 21–27 (2012).
  66. Sun, X., Wei, Y., Lee, P. P., Ren, B. & Liu, C. - **The role of WASp in T cells and B cells.** *Cellular Immunology* vol. 341 103919 (2019).

67. Tedder, T. F. - **B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset.** *J. Immunol.* 194, 1395–1401 (2015).
68. Du, H. Q., Zhang, X., An, Y. F., Ding, Y. & Zhao, X. D. - **Effects of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Deficiency on IL-10-Producing Regulatory B Cells in Humans and Mice.** *Scand. J. Immunol.* 81, 483–493 (2015).
69. Worth, A. J. & Thrasher, A. J. - **Current and emerging treatment options for Wiskott-Aldrich syndrome.** *Expert Review of Clinical Immunology* vol. 11 1015–1032 (2015).
70. Buchbinder, D., Nugent, D. J. & Phillipovich, A. H. - **Wiskott-Aldrich syndrome: Diagnosis, current management, and emerging treatments.** *Application of Clinical Genetics* vol. 7 55–66 (2014).
71. **Wiskott-Aldrich Syndrome | Immune Deficiency Foundation.** <https://primaryimmune.org/about-primary-immunodeficiencies/specific-disease-types/wiskott-aldrich-syndrome>
72. Mahlaoui, N. *et al.* - **Characteristics and outcome of early-onset, severe forms of Wiskott-Aldrich syndrome.** *Blood* 121, 1510–1516 (2013).
73. Rivers, E., Worth, A., Thrasher, A. J. & Burns, S. O. - **How I manage patients with Wiskott Aldrich syndrome.** *British Journal of Haematology* vol. 185 647–655 (2019).
74. Ramachandran, V., Kolli, S. S. & Strowd, L. C. - **Review of Graft-Versus-Host Disease.** *Dermatologic Clinics* vol. 37 569–582 (2019).
75. Buchbinder, D., Nugent, D. J. & Phillipovich, A. H. - **Wiskott-Aldrich syndrome: Diagnosis, current management, and emerging treatments.** *Application of Clinical Genetics* vol. 7 55–66 (2014).
76. Burroughs, L. M. *et al.* - **Excellent outcomes following hematopoietic cell transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: a PIDTC report.** *Blood* 135, 2094–2105 (2020).
77. Gennery, A. R., Albert, M. H., Slatter, M. A. & Lankester, A. - **Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Primary Immunodeficiencies.** *Frontiers in Pediatrics* vol. 7 (2019).
78. Baumeister, S. H. C., Rambaldi, B., Shapiro, R. M. & Romee, R. **Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation.** *Frontiers in Immunology* vol. 11 191 (2020).

79. Haskoloğlu, Ş. *et al.* - **Clinical Features and Outcome of 23 Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS): A Single-Center Experience.** *Turkish J. Hematol.* (2020)
80. Ferrua, F., Marangoni, F., Aiuti, A. & Roncarolo, M. G. - **Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: History, new vectors, future directions.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 146 262–265 (2020).
81. Braun, C. J. *et al.* - **Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome-long-term efficacy and genotoxicity.** *Sci. Transl. Med.* 6, (2014).
82. Candotti, F. - **Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: here to stay.** *The Lancet Haematology* vol. 6 e230–e231 (2019).