Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria

**Características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com a
Síndrome de Wiskott-Aldrich**

Maria Eduarda Pontes Cunha de Castro

Ribeirão Preto
2018

Maria Eduarda Pontes Cunha de Castro

**Características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com a
Síndrome de Wiskott-Aldrich**

Dissertação apresentada ao Programa de
Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Prof. Dr. Pêrsio Roxo Junior

**Ribeirão Preto
2018**

Maria Eduarda Pontes Cunha de Castro

**Características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com a
Síndrome de Wiskott-Aldrich**

Dissertação apresentada ao Programa de
Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Prof. Dr. Pérsio Roxo Junior

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

**Ribeirão Preto
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATOLOGRÁFICA

Castro, Maria Eduarda Pontes Cunha de
Características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com a síndrome de Wiskott-Aldrich – Maria Eduarda Pontes Cunha de Castro. Ribeirão Preto, 2018.
89 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da criança e do adolescente.

Orientador: Roxo-Junior, Pêrsio

1. Síndromes de deficiência imunológica. 2. Genótipo.
3. Imunologia clínica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Eduarda Pontes Cunha de Castro

Características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com a síndrome de Wiskott-Aldrich

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para obtenção
do título de Mestre em Ciência

Área de Concentração: Saúde
da criança e do adolescente

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

*“The ultimate measure of a man is not where he stands
in moments of comfort and convenience,
but where he stands at times
of challenge and controversy.”
Martin Luther King*

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Ruy e Mercês, que sempre estiveram onipresentes durante toda a minha jornada acadêmica.

Aos meus pais e irmã, pelo suporte que me permitiu alcançar todos meus objetivos acadêmicos.

Ao meu marido, pela companhia e compreensão durante os períodos de ausência e por me fornecer uma nova família, com nossos filhos;

Ao meu orientador e à toda equipe de Alergia e Imunologia da FMRP: Professores, médicos assistentes e residentes, pelos votos de incentivo e pela ajuda ao longo dessa caminhada, em especial à Paula, colega de residência e de pós-graduação;

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Rosane, Veridiana, Beth, Kleiton, Régia e Luciana, que foram essenciais para a obtenção dos resultados dessa dissertação.

RESUMO

Castro MEPC. Características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com a Síndrome de Wiskott-Aldrich. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A síndrome de Wiskott-Aldrich (SWA) é uma imunodeficiência primária rara ligada ao X caracterizada pela presença de eczema, trombocitopenia com ou sem microplaquetas e infecções recorrentes. Mais de 300 tipos de mutações associadas com o gene *WAS* foram descritas, incluindo oito *hotspots*. A diversidade destas mutações pode levar ao aparecimento de grande variabilidade nas apresentações clínicas, o que dificulta a previsão da evolução da doença baseada apenas nas manifestações iniciais. Além disso, há escassez de informações sobre a população brasileira. **Objetivos:** Descrever as características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com diagnóstico clínico de SWA. **Resultados:** Dezoito pacientes foram avaliados. Dezesete pacientes apresentaram os primeiros sintomas no primeiro ano de idade. Idade média para o início dos sintomas foi de 4,5 meses e média de tempo para o diagnóstico foi de 31,2 meses. Três pacientes (16,3%) foram diagnosticados após 10 anos de início dos sintomas. Dezesete pacientes (94,5%) apresentaram eczema. Os níveis plaquetários variaram entre 1.000 e 65.000/mm³ e nove pacientes (50%) apresentaram microtrombocitopenia. Dois pacientes (11,1%) apresentaram macroplaquetas. Dezesesseis pacientes (88,9%) tiveram eventos hemorrágicos ao longo de suas vidas, especialmente sangramentos intestinais, urinários e petéquias. Em relação às manifestações infecciosas, otite média aguda foi a infecção mais frequente, relatada por 13 pacientes (72,2%), seguido por infecções cutâneas (66,7%). Três pacientes

(16,6%) apresentaram manifestações autoimunes, incluindo nefropatia por IgA, trombose isquêmica e vasculite. A maioria dos pacientes (55,5%) não apresentou alterações nos níveis IgG. Níveis elevados de IgA só foram observados em 4 pacientes (23,5%). Redução dos níveis IgM foi observada em 7 pacientes (38,9%). Os pacientes foram classificados de acordo com um escore clínico previamente descrito. A maioria apresentou pontuações de 3 (33,3%) e 4 (27,8%). Quatro pacientes (22,2%) foram classificados com pontuação 5 devido às manifestações autoimunes ou neoplasias. Em relação à análise genética, foram encontradas mutações em 10 pacientes (55,5%). Apenas três das mutações encontradas neste estudo foram descritas previamente. **Conclusão:** As características clínicas dos pacientes brasileiros foram semelhantes às características observadas em outras populações, porém a análise genética revelou mutações ainda não descritas.

Palavras-chave: Síndromes de deficiência imunológica. Genótipo. Imunologia clínica

ABSTRACT

Castro MEPC. Clinical and genetic characteristics of Brazilian patients with Wiskott-Aldrich syndrome. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2018.

Introduction: Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a rare X-linked primary immunodeficiency characterized by eczema, thrombocytopenia with or no small sized platelets and recurrent infections. More than 300 types of mutations associated with the *WAS* gene have been described, including eight hotspots. The diversity of these mutations can lead to the appearance of great variation in the clinical presentations, which makes it difficult to predict the evolution of the disease based only on the initial manifestations. Furthermore, there is paucity of information on WAS from the Brazilian population. **Objectives:** To describe the clinical and genetic characteristics of Brazilian patients with clinical diagnose of WAS. **Results:** Eighteen patients were evaluated. Seventeen patients presented first symptoms within first year of age. Mean age for initiating symptoms was 4,5 months and mean time for diagnosis was 31,2 months. Three patients (16.6%) were diagnosed after 10 years of initiating symptoms. Seventeen patients (94.5%) had eczema. The platelet levels ranged from 1,000 to 65,000/mm³ and nine patients (50%) presented microthrombocytopenia. Two patients (11.1%) had macroplatelets. Sixteen patients (88.9%) had hemorrhagic events throughout their lives, especially intestinal, urinary and petechial bleedings. In relation to infectious manifestations, acute media otitis was the most frequent infection, reported by 13 patients (72.2%), followed by skin infections (66.7%). Three patients (16.6%) had autoimmune manifestations including IgA nephropathy,

ischemic stroke and vasculitis. Most patients (55.5%) did not present alterations in IgG levels. Twelve patients (70.6%) did not present alterations in IgA levels and elevated levels of IgA were only observed in 4 patients (23.5%). Reduction of IgM levels was observed in 7 patients (38.9%). Patients were classified according to a previously described clinical score. Most patients presented scores of 3 (33.3%) and 4 (27.8%). Four patients (22.2%) were classified with score 5 due to autoimmune or neoplastic manifestations. Regarding genetic analysis, mutations were found in 10 patients (55.5%). Only three of mutations found in this study were previously described. **Conclusion:** Clinical characteristics of Brazilian patients were similar to medical features observed in other populations, however genetic analysis showed undescribed mutations yet.

Keywords: Immunologic deficiency syndromes. Genotype. Clinical immunology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do gene <i>WAS</i>	21
Figura 2. Estrutura da WASp.....	22
Figura 3. Distribuição dos pacientes de acordo com escore clínico.....	55
Figura 4. Expressão da WASp.....	55
Figura 5. Cromatograma do paciente WA-02.....	57
Figura 6. Cromatograma do paciente WA-04.....	58
Figura 7. Cromatograma do paciente WA-06.....	59
Figura 8. Cromatograma do paciente WA-07.....	60
Figura 9. Cromatograma do paciente WA-08.....	61
Figura 10. Cromatograma do paciente WA-09.....	62
Figura 11. Cromatograma do paciente WA-12.....	63
Figura 12. Cromatograma do paciente WA-17.....	64
Figura 13. Cromatograma do paciente WA-17 e genitores	64
Figura 14. Cromatograma do paciente WA-19.....	65
Figura 15. Cromatograma do paciente WA-24.....	66
Figura 16. Localização das mutações encontradas no gene <i>WAS</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças fenótipo-genotípicas entre SWA e XLT	24
Tabela 2. Critérios diagnósticos para SWA e XLT.....	29
Tabela 3. Escore clínico para definição do fenótipo clínico na SWA/XLT.....	30
Tabela 4. Lista dos pacientes analisados.....	37
Tabela 5. Sequência de <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene WAS.....	41
Tabela 6. Características clínicas e laboratoriais dos 18 pacientes estudados.....	50
Tabela 7. Características imunológicas dos pacientes com SWA.....	54
Tabela 8. Descrição das mutações encontradas no gene WAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Região ácida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato de desoxinucleotídeo celular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GBD	Domínio ligante de GTPase
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HCC	Hospital de Caridade de Canela
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
IDP	Imunodeficiências primárias
IFN- γ	<i>Interferon-gama</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KDa	Quilodaltons
LASID	<i>Latin American Society for Immunodeficiencies</i>
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Não disponível
NK	<i>Natural-Killer</i>
Pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PRR	Região rica em prolina
SWA	Síndrome de <i>Wiskott-Aldrich</i>
Ta	Temperatura de anelamento
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UFPR	Universidade Federal do Paraná

UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFS	Universidade Federal de Sergipe
WAS	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome</i>
WASp	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>
WH1	Domínio <i>WASP</i> homólogo-1
WH2	Domínio <i>WASP</i> homólogo-2
WIP	<i>WASP Interact Protein</i>
XLT	Trombocitopenia ligada ao X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Base molecular do gene <i>WAS</i>	19
1.2 Manifestações clínicas	25
1.3 Manifestações imunológicas	27
1.4 Diagnóstico	28
1.5 Tratamento e prognóstico	31
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo principal	35
2.2 Objetivos secundários	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Casuística	37
3.1.1 Critérios de inclusão	38
3.1.2 Critérios de não-inclusão	38
3.2 Métodos	38
3.2.1 <i>Western Blotting</i>	38
3.2.2 Extração de DNA	40
3.2.3 Reação em cadeia de polimerase (PCR)	40
3.2.4 Sequenciamento de DNA genômico	42
3.3 Análise estatística	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÃO	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
7. ANEXOS	82
ANEXO A. Protocolo clínico	83
ANEXO B. Termo de Consentimento	87
ANEXO C. Aprovação no Comitê de Ética	89

1.INTRODUÇÃO

A síndrome de Wiskott-Aldrich (SWA) é uma imunodeficiência primária rara ligada ao cromossomo X, que se caracteriza pela tríade clássica de imunodeficiência grave, microtrombocitopenia e eczema, além de maior propensão para o desenvolvimento de autoimunidade e malignidade (WISKOTT, 1937; ALDRICH et al., 1954; SULLIVAN et al., 1994). Apresenta incidência estimada de 4 a 10 casos para cada 1.000.000 de recém-nascidos do sexo masculino de acordo com estudos realizados em diversos países (PERRY et al., 1980; RYSER et al., 1988). Nos EUA, os casos de SWA correspondem a 4% do total de pacientes diagnosticados com defeitos primários do sistema imunológico (USIDNET, 2015).

Os dados epidemiológicos dessa doença no Brasil e na América Latina são escassos. De acordo com a atualização mais recente (2014) do Registro Latino-Americano de Imunodeficiências Primárias (LASID), na América Latina foram cadastrados 142 casos de SWA, sendo 63 com confirmação genética e 79 casos sem confirmação, o que corresponde a 2% de todas as imunodeficiências registradas. O Brasil forneceu dados provenientes de 43 centros de referência, correspondendo a 21,89% dos pacientes registrados, totalizando aproximadamente 31 pacientes com SWA no país. Este número está muito aquém quando se compara à incidência encontrada em outros países, sugerindo subdiagnóstico no país (RYSER et al., 1988; STRAY-PEDERSEN et al., 2000).

A doença foi primeiramente descrita por Wiskott (1937), que relatou o caso de três irmãos que apresentavam trombocitopenia, eczema, diarreia sanguinolenta e otites de repetição. Aldrich et al. (1954) descreveram seis gerações de uma família em que os homens apresentavam quadro clínico

semelhante ao relatado por Wiskott, sugerindo herança ligada ao X (WISKOTT, 1937; ALDRICH et al., 1954).

A SWA é causada por mutações no gene *WAS*, localizado no braço curto do cromossomo X. O gene *WAS* é responsável por codificar a proteína WASp, importante para a polimerização da actina e organização do citoesqueleto das células hematopoiéticas (OCHS et al., 2006). As mutações presentes no gene *WAS* podem levar tanto a alterações na função como na expressão da WASp, resultando em três fenótipos clínicos distintos: a SWA clássica, a trombocitopenia ligada ao X (XLT) e a neutropenia congênita ligada ao X. Existe uma forte correlação entre os níveis de WASp e a gravidade da doença. Sendo assim, a completa ausência da WASp leva a defeitos na função de diversas linhagens de células hematopoiéticas, resultando no fenótipo mais grave, a SWA (JIN et al., 2004; OCHS et al., 2006).

1.1 Base Molecular do gene *WAS*:

O gene *WAS* foi identificado em 1994 através de clonagem posicional e localiza-se no braço curto do cromossomo X na posição Xp11.22–p11.23 (DERRY et al., 1994). Formado por 12 exons, contém 1823 pares de bases e codifica 5 domínios da proteína WASp: domínio WASP-homólogo 1 (WH1), domínio ligante de GTPase (GBD), região rica em prolina (PRR), domínio WH2 e região ácida (AR) (ZHU et al., 1997; IMAI et al., 2003).

O domínio WH1 é codificado pelos aminoácidos 57 ao 137, que correspondem aos exons 2, 3 e a extremidade 5' do exon 4, localizando-se na porção amino-terminal do gene e é um frequente sítio de mutações,

principalmente do tipo *missense* e *nonsense*. Apresenta um domínio de ligação da *chaperona* *WIP* (*WASP Interact Protein*), cuja ligação é importante para o início da polimerização da actina. O GBD é codificado pela extremidade 3' do exon 7 e pelo exon 8, compreendendo os aminoácidos 237 ao 257. Esse domínio interage com uma GTPase da família Rho chamada Cdc42, importante para a ativação da WASp (KIM et al., 2000). Portanto mutações na região codificante do GBD levam a alterações na função da WASp. Mutações *missense* nessa região causam o fenótipo da neutropenia ligada ao X (DEVRIENDT et al., 2001; ANCLIFF et al., 2006).

A região rica em prolina (PRR) é formada pelos aminoácidos 311 ao 422, que correspondem a $\frac{3}{4}$ do exon 10. Essa região é crucial para a localização da WASp para sinapse imunológica ao se ligar com domínio SH3 presente em diversas tirosinas cinases (BADOUR et al., 2003). O domínio WH2 é codificado pela extremidade 3' do exon 10, com os aminoácidos 423 ao 449. Nessa região são encontradas diversas mutações associadas principalmente a quadros mais graves, com comprometimento do sistema imunológico (KIRCHHAUSEN, 1998). A região ácida (AR), encontrada na região carboxiterminal, é formada pelos aminoácidos 485 ao 502 e codificada pelo exon 12 (SCHWARZ, 1996). Junto com o domínio WH2, faz parte do domínio rico em verprolina e cofilina (domínio VCA), que medeia a ação da WASp na polimerização da actina através de ligação com o complexo Arp2/3 (BADOUR et al., 2003).

A estrutura do gene pode ser vista na Figura 1.

Figura 1. Estrutura do gene WAS.

*Modificado de VILLA et al, 1995. NT: Nucleotídeo; WH1: WASP-Homólogo 1; GBP: Domínio ligante de GTPase; PRR: Região rica em prolina; AR: Região ácida.

O gene *WAS* é responsável por codificar a proteína WASp, que apresenta aproximadamente 66 KDa, é formada por 502 aminoácidos e pertence à família de promotores da nucleação da actina. É uma proteína citoplasmática presente exclusivamente em células hematopoiéticas, importante tanto na organização do citoesqueleto como na sinalização celular (OCHS et al., 2006; BOSTICARDO et al., 2009). Nas células em repouso, encontra-se em estado inativo e apresenta conformação em *loop*, que tem ação auto inibitória (BUCHBINDER et al., 2014). Essa conformação é estabilizada pela ligação da *chaperona* *WIP* na região amino-terminal (OCHS et al., 2009). A ativação da WASp ocorre após liberação dessa ligação, com retorno à conformação linear da proteína e ligação do domínio GBD à proteína Cdc42 (Figura 2). Membro da família Rho das GTPases, a Cdc42 regula a formação de filopodia, controlando a quimiotaxia e a polaridade celular. Após ativação da WASp, o complexo Arp2/3 medeia a polimerização da actina, através da regulação da estrutura de seus filamentos (KIM et al., 2000).

Figura 2. Estrutura e ativação da WASp*.

A. Conformação da WASp em repouso. Percebe-se ligação do domínio WH2 com domínio GBD e ligação da região ácida (AR) com a região básica (BR). A estabilidade se dá através da ligação da WIP com o domínio WH1. **B.** Ativação da WASp, com ligação da molécula Cdc42 aos domínios centrais. A ligação da ARP 2/3 aos domínios na extremidade aminoterminal leva ao início do processo de polimerização da actina.

*Adaptado de THRASHER, 2002

A ativação da WASp ocorre quando da apresentação de antígenos aos linfócitos T (NOTARANGELO et al., 2003; OCHS et al., 2009), sendo a reorganização do citoesqueleto um passo essencial para a interação das células apresentadoras de antígenos com as células T assim como dos linfócitos T citotóxicos e células NK com células-alvo (IMAI et al., 2003). Essa reorganização permite que haja transdução de sinais entre a superfície celular e o citoesqueleto de actina, que é um processo fundamental para a habilidade do sistema imunológico de responder a sinais de crescimento e diferenciação, participando inclusive dos mecanismos de adesão e migração celular (THRASHER, 2002; NOTARANGELO et al., 2008; BOSTICARDO et al., 2009).

Alterações na expressão da proteína WASp explicam a susceptibilidade para infecções que os pacientes com SWA apresentam. Assim, os mecanismos biológicos responsáveis pela fisiopatologia da SWA estão diretamente associados à polimerização irregular de actina em células hematopoiéticas, decorrente principalmente da ausência de expressão da WASp (MASSAD et al., 2014).

Mutações no gene *WAS* podem resultar em três fenótipos clínicos distintos: a SWA clássica, a trombocitopenia ligada ao X (XLT) e a neutropenia congênita ligada ao X, caracterizando uma forte tendência de correlação genótipo-fenótipo (OCHS et al., 2009). As mutações que comprometem totalmente a expressão da proteína WASp ocasionam o fenótipo da SWA clássica, enquanto mutações que levam à diminuição da expressão da proteína resultam na XLT, que se caracteriza por um fenótipo mais leve. Por outro lado, mutações do tipo ganho de função na região codificadora do sítio de ligação do Cdc42 resultam em fenótipo caracterizado por neutropenia congênita e ausência de defeito plaquetário (DEVRIENDT et al., 2001; JIN et al., 2004; ANCLIFF et al., 2006). As principais diferenças fenótipo-genotípicas entre SWA e XLT podem ser vistas na Tabela 1.

Tabela 1 - Diferenças fenótipo-genotípicas entre SWA e XLT (THRASHER et al., 2000)

FENÓTIPO	SWA	XLT
Trombocitopenia	+	+
Microplaquetas	+/-	+/-
Eczema	+/++/+++	-/+
Imunodeficiência	+/++	-/+
Infecção	+/++	-/+
Autoimunidade e/ou neoplasia	Frequente	Possível
GENÓTIPO	SWA	XLT
Mutações no gene WAS	<i>Nonsense</i> , deleções, inserções, alterações de <i>splicing</i>	<i>Missense</i> (exons 1-3)
Expressão de WASp	Ausente	Reduzida

+: Leve; ++: Moderado; +++: Grave

Diversos tipos de mutações estão associados ao gene *WAS*. Mutações em que há substituição de um par de bases nitrogenadas por outro, levando à formação de aminoácido diferente em relação à sequência de referência, são chamadas de mutações *missense* e, na SWA, predominam na região aminoterminal, sendo associadas a quadros mais leves. Por sua vez, mutações *nonsense*, em que há a substituição da codificação de um aminoácido por um códon de parada, estão mais associadas a quadros graves, assim como inserções e deleções (IMAI et al., 2003). Mutações do tipo inserção ou deleção, quando ocorrem em sequência codificante, podem modificar o quadro de leitura dos códons, resultando em alteração no ponto de início da leitura do material genético, sendo classificadas como mutações de mudança de matriz de leitura ou *frameshift*. Além de mutações em regiões codificadoras, podem ser encontradas mutações que alterem os sítios de *splicing*. O processo de *splicing* é importante para a produção do RNAm, que ocorre através da retirada dos íntrons de um RNA precursor. Esse tipo de mutação é frequentemente encontrada no gene *WAS*, sendo associada à síndrome clássica (ZHANG et al., 2010). Regiões frequentemente acometidas por mutações podem ser

considerados *hotspots*. Até o momento, já foram descritos 8 *hotspots* no gene WAS, que foram definidos como mutações idênticas ou *missense* em mesmo aminoácido que ocorreram em mais de 2,5% dos pacientes não-aparentados estudados (JIN et al., 2004; LIU et al., 2015).

Atualmente mais de 300 tipos de mutações associadas ao gene WAS já foram descritas. A diversidade dessas mutações pode levar à grande variação nas apresentações clínicas relacionadas aos fenótipos já descritos, o que torna difícil prever a evolução da doença baseada somente na apresentação clínica inicial. Dessa maneira, o entendimento de mecanismos biológicos e moleculares da SWA é um passo crítico para o desenvolvimento de estratégias específicas e eficazes para o tratamento de pacientes com a síndrome clássica e seus fenótipos variantes (ZHANG et al., 2010).

1.2 Manifestações Clínicas da SWA:

Dentre os sinais e sintomas da SWA, a mais precoce manifestação clínica é a hemorragia, que se manifesta geralmente como sangramento cutâneo (petéquias), oral, digestivo (hematêmese ou melena) ou diarreia sanguinolenta e que ocorrem devido à presença de trombocitopenia congênita. Geralmente, manifestações hemorrágicas surgem ao nascimento ou nos primeiros meses de vida. A trombocitopenia geralmente representa contagens de três mil a 70.000/mm³ e diversas anormalidades morfológicas e funcionais, sendo a diminuição do volume plaquetário a alteração morfológica mais comum (SULLIVAN et al., 1994). Apesar de a presença de microplaquetas ser um importante marcador da síndrome, existem relatos na literatura de casos com

volume plaquetário normal ou aumentado. É importante ressaltar que a ausência de microplaquetas não descarta o diagnóstico (PATEL et al., 2011; SKORIC et al., 2014; YOONESSI et al., 2015).

Outra manifestação frequente é o eczema, sendo este uma característica importante para o diagnóstico diferencial entre SWA e a trombocitopenia idiopática. Entretanto, é válido ressaltar que pacientes portadores de XLT podem apresentar eczema transitório. Casos mais leves de XLT podem não apresentar eczema (CANALES et al., 1967) e por isso muitos pacientes com XLT recebem diagnóstico de trombocitopenia idiopática, o que retarda o diagnóstico (OCHS et al., 2006). Nos casos mais graves, o eczema é resistente ao tratamento e pode persistir até o início da idade adulta, além de contribuir para maior predisposição ao desenvolvimento de infecções cutâneas secundárias, que podem ter evolução crônica e grave (OCHS, 2002).

Devido às alterações no sistema imunológico causadas pelas mutações no gene *WAS*, uma das principais manifestações da SWA é o risco elevado de infecções recorrentes. Infecções bacterianas como otite média, sinusite, meningite, sepse e pneumonia são frequentes, especialmente otite média aguda, iniciando-se nos primeiros 6 meses de vida. Ademais, podem ocorrer infecções virais recorrentes por herpes simples e varicela. Infecções fúngicas por *Candida sp* acometem cerca de 10% dos pacientes (SULLIVAN et al., 1994).

Estudos mostraram susceptibilidade para autoimunidade em cerca de 40%-72% dos pacientes, com desenvolvimento de anemia hemolítica, vasculite não específica e poliartrite inflamatória (SULLIVAN et al., 1994; DUPUIS-GIROD et al., 2003). Esta susceptibilidade pode ser explicada por defeitos de células T reguladoras, verificada em estudos *in vitro* (BUCHBINDER et al., 2014).

Pacientes com SWA clássica também apresentam um risco elevado de desenvolvimento de neoplasias, especialmente quando adolescentes e adultos jovens. Dentre as principais neoplasias destaca-se o linfoma de células B. Uma possível explicação para a maior susceptibilidade às neoplasias é a ineficiência das células T citotóxicas na liberação de grânulos citotóxicos contra células tumorais (IMAI et al., 2004).

1.3 Manifestações Imunológicas da SWA:

Os pacientes com SWA podem apresentar comprometimento nas imunidades humoral e celular, sendo o comprometimento da imunidade celular a principal alteração observada. No entanto, pacientes com XLT não costumam apresentar alterações imunológicas (CANALES et al., 1967). Os pacientes com a síndrome clássica podem apresentar linfopenia, que se manifesta durante a infância e adolescência, devido ao desenvolvimento anormal das células T e maior taxa de apoptose. Essas alterações ocorrem devido a defeitos na arquitetura do esqueleto de actina das células T, ocasionados pela baixa expressão da proteína WASp (BUCHBINDER et al., 2014).

Em relação à imunidade humoral, existe uma redução no número de células B, especialmente na zona marginal dos gânglios linfáticos. Em relação à produção de imunoglobulinas, os níveis de IgG geralmente estão normais, enquanto os níveis de IgM podem estar diminuídos e os de IgA e IgE, aumentados. Sendo assim, a gravidade da imunodeficiência pode variar de caso a caso (BUCHBINDER et al., 2014).

Mesmo em pacientes com níveis normais de IgG e IgM, a resposta vacinal geralmente encontra-se alterada, principalmente as respostas dependentes de células T (SULLIVAN et al., 1994; ALBERT et al., 2010). Mais de 80% dos pacientes apresentam títulos baixos de isohemaglutininas, enquanto cerca de 62% apresentam resposta anormal ao antígeno tetânico e 69% apresentam resposta inadequada à vacinação pneumocócica (SULLIVAN et al., 1994; BUCHBINDER et al., 2014).

1.4 Diagnóstico:

O diagnóstico deve ser suspeitado em qualquer criança do sexo masculino, na presença da tríade trombocitopenia, eczema e susceptibilidade para infecções. Entretanto este conjunto de manifestações encontra-se presente em apenas 1/3 dos casos. Desta forma, com a finalidade de melhorar a acurácia e precisão diagnóstica, foram criados critérios diagnósticos para a SWA e XLT, que se encontram resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Critérios diagnósticos para SWA e XLT* (THRASHER et al., 2000)

Diagnóstico Definitivo

Pacientes do sexo masculino com trombocitopenia congênita, microplaquetopenia e, pelo menos, uma das alterações:

- Mutação no gene *WAS*
- Ausência de expressão do mRNA *WAS*
- Ausência da proteína WASp em células mononucleares do sangue periférico
- História familiar materna de SWA ou XLT

Diagnóstico Provável

Pacientes do sexo masculino com trombocitopenia congênita, microplaquetopenia e, pelo menos, uma das alterações:

- Eczema
- Infecções recorrentes bacterianas, virais ou oportunistas
- Doença autoimune
- Doença linfoproliferativa
- Títulos baixos de hemaglutininas ou resposta vacinal ineficiente a antígenos polissacarídeos

Diagnóstico Possível

Pacientes do sexo masculino com trombocitopenia congênita e microplaquetopenia ou paciente esplenectomizado em decorrência de trombocitopenia, que apresentar pelo menos uma das alterações:

- Eczema
- Infecções recorrentes bacterianas, virais ou oportunistas
- Doença autoimune
- Doença linfoproliferativa

*Adaptado de Thrasher et al., 2000.

Outra frequente dificuldade frente a uma criança do sexo masculino com trombocitopenia de início precoce é o diagnóstico diferencial entre SWA e XLT. Neste sentido foi criado um sistema de escore clínico, que pode ser visualizado na Tabela 3 (OCHS, 2002). Pacientes com escores clínicos de 1 a 2 são classificados como XLT e pacientes com escores clínicos de 3 a 5 são classificados como SWA.

Tabela 3 - Escore clínico para definição do fenótipo clínico na SWA/XLT* (OCHS, 2002)

ESCORE CLÍNICO	XLT			WAS	
	1	2	3	4	5
Trombocitopenia	+	+	+	+	+
Eczema	-				
Leve		+	+		
Grave				+	+
Infecções	-	-			
Pouco frequentes			+		
Recorrentes				+	+
Autoimunidade	-	-	-	-	+/-
Neoplasia	-	-	-	-	+/-

*Adaptado de Ochs, 2002.

Os pacientes podem evoluir com piora do escore clínico ao longo dos anos, apresentando escores menores nos primeiros anos de vida (BUCHBINDER et al., 2014). Os fatores de risco e mecanismos que levam a essa mudança ainda são desconhecidos, porém alterações epigenéticas podem ter papel importante nesse processo (BUCHBINDER et al., 2014).

Nem sempre todos os sintomas sugestivos da SWA estão presentes desde o nascimento, o que pode retardar o diagnóstico. O fenótipo do paciente pode, inclusive, ser alterado ao longo do tempo, inclusive com relatos na literatura de reversão de mosaicismos. Por isso, reavaliação clínica ao longo do acompanhamento é necessária (BUCHBINDER et al., 2014).

A expressão da WASp pode ser avaliada através do método de *Western Blotting* ou por citometria de fluxo, através da detecção da proteína por um anticorpo anti-WASp. Este teste tem a finalidade de *screening* para diagnóstico diferencial entre os dois fenótipos, SWA e XLT (OCHS et al., 2006), além de indicar indivíduos portadores e avaliar quimerismos em pacientes transplantados (BUCHBINDER et al., 2014; YAMAGUSHI et al., 2002; YAMADA et al., 2000).

Apesar da importância da detecção de WASp para o diagnóstico, a análise genética continua sendo o principal método laboratorial para confirmar a SWA, sendo importante por auxiliar na determinação do prognóstico, orientação do tratamento e aconselhamento genético (OCHS et al., 2006).

1.5 Tratamento e prognóstico:

Os pacientes mais graves com SWA, não submetidos a tratamento específico, evoluem para o óbito. Pacientes com mutações que resultam no fenótipo mais grave, com ausência na expressão da WASp, apresentam expectativa de vida menor do que 17,5 anos (IMAI et al., 2004). As principais causas de morte são infecção, hemorragias e malignidade (SULLIVAN et al., 1994).

A terapia convencional para a SWA é direcionada ao quadro clínico. Corticosteroides ou imunossupressores tópicos estão indicados para os quadros graves de eczema (OCHS et al., 2009). Em casos de infecções recorrentes, com dosagem anormal de imunoglobulinas ou produção de anticorpos reduzida a antígenos, está indicada a reposição de Imunoglobulinas em doses convencionais. Pacientes com infecções sinopulmonares de repetição devem receber antibioticoprofilaxia. O uso de agentes antivirais pode ser indicado profilaticamente para pacientes com infecções virais de repetição. Vacinas de agentes atenuados devem ser evitadas para todos os pacientes (BUCHBINDER et al., 2014).

A trombocitopenia pode ser corrigida após esplenectomia em casos graves e refratários. No entanto, pacientes esplenectomizados apresentam maior risco de

desenvolvimento de quadros infecciosos graves, especialmente por bactérias encapsuladas. Todos esses pacientes devem receber antibioticoprofilaxia com penicilina ou agente semelhante (BUCHBINDER et al., 2014). Pacientes que serão submetidos ao transplante de células tronco-hematopoiéticas também apresentam maiores complicações infecciosas quando esplenectomizados (OZSAHIN et al., 2008). As manifestações hemorrágicas, decorrentes da trombocitopenia acentuada, podem ser controladas com transfusões de plaquetas irradiadas. Entretanto estes procedimentos devem ser evitados ao máximo para minimizar os riscos de sensibilização. Sendo assim, transfusões de plaquetas devem ser realizadas somente em casos graves de sangramento, como por exemplo, sangramento intracraniano (LUM et al., 1980; MULLEN et al., 1993). Ademais, todos hemoderivados devem ser irradiados e obtidos de doadores não portadores de citomegalovírus (THRASHER et al., 2000). Fármacos que interferem com a função plaquetária devem ser evitados (OCHS et al., 2006).

O tratamento considerado padrão-ouro é o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas e deve ser indicado a todos os pacientes portadores de SWA, tendo em vista que a doença pode levar ao óbito ainda na infância, caso não seja tratada (OCHS et al., 2009; NOTARANGELO et al., 2008). A sobrevida após o transplante pode atingir índices de até 89,1%, principalmente quando realizado precocemente. Transplantes com doadores aparentados são preferíveis, no entanto, em pacientes menores de cinco anos, procedimentos com doadores não relacionados são também efetivos (OZSAHIN et al., 2008; MORATTO et al., 2011). Por outro lado, em pacientes com idade acima de cinco anos, os índices de sucesso são menores e os transplantes com doadores não

relacionados devem ser indicados após discussão de cada caso (FILIPOVICH et al., 2001). Ainda assim, dados de estudo multicêntrico que incluiu serviços brasileiros apontam sobrevida de 75% após 5 anos em transplantes com sangue de cordão umbilical não-aparentado (SHEKHOVTSOVA et al., 2017).

Outra opção de tratamento é a terapia gênica, que consiste no uso de retrovírus para substituição do gene defeituoso por um transgene. Deve ser indicada para pacientes com a síndrome clássica, que não produzem a proteína WASp e que não possuam doador compatível (BUCHBINDER et al., 2014). Estudo in vitro em células-tronco de pacientes com SWA demonstrou correção na diferenciação de células T e células NK pós terapia gênica (LASKOWSKI et al., 2016). Apesar de estudos mostrarem a eficácia deste tratamento, apenas um pequeno número de pacientes já foi submetido ao mesmo, sendo esta técnica aplicada em poucos centros de estudos.

O prognóstico dos pacientes, bem como o sucesso do tratamento, tanto com células-tronco hematopoiéticas como através da terapia gênica, depende do diagnóstico precoce da doença, preferencialmente antes do agravamento do quadro clínico e imunológico. Desta forma torna-se relevante que pacientes com diagnóstico provável de SWA devam ser investigados em relação à expressão da proteína WASp e quanto à presença de mutações no gene *WAS*, com a finalidade de confirmação diagnóstica e consequente encaminhamento imediato para um centro de referência em Imunodeficiências.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Descrever as características clínico-laboratoriais e as mutações do gene *WAS* no DNA genômico de pacientes brasileiros com diagnóstico clínico da Síndrome de Wiskott-Aldrich.

2.2 Objetivos específicos:

- Padronizar e implantar as técnicas para a detecção de mutações no gene *WAS*, com a proposta de realizar o diagnóstico definitivo da SWA no HCRP;
- Sequenciar os 12 exons específicos do gene *WAS* para a identificação de possíveis mutações ainda não descritas;
- Padronizar a técnica de *Western Blotting* para verificar a expressão da proteína WASp.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística:

Foi realizado estudo observacional retrospectivo tipo série de casos, com inclusão de 18 pacientes com diagnóstico clínico de SWA por amostra de conveniência, provenientes do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCRP-USP) e de outros Centros de referência nacionais em Imunodeficiência Primária (Tabela 4), no período de 2011 a 2016.

Tabela 4 – Lista dos pacientes analisados

PACIENTE	ORIGEM	PACIENTE	ORIGEM
WA-01	HCRP – USP	WA-12	UFRJ – RJ
WA-02	UFPR – PR	WA-13	HCRP – USP
WA-04	UFS – SE	WA-14	UFPI – PI
WA-05	HIJG – SC	WA-15	UFPI – PI
WA-06	FAMERP – SP	WA-17	HCRP – USP
WA-07	UFPR – PR	WA-18	HCRP – USP
WA-08	UFPR – PR	WA-19	HCC – RS
WA-09	UFPR – PR	WA-23	HCRP – USP
WA-10	UFPR – PR	WA-24	HCRP – USP

Os dados clínicos e laboratoriais de cada paciente foram coletados nos serviços de origem, conforme o protocolo (Anexo A).

Todos os pacientes ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no projeto, conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e uma via do mesmo foi arquivada (Anexo B).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP, sob o parecer número 10483/2011 (Anexo C).

3.1.1 Critérios de inclusão:

Foram incluídos pacientes do sexo masculino com diagnóstico inicial de SWA, através de avaliação clínica, considerando os principais e mais importantes achados da síndrome, a saber: trombocitopenia com ou sem microplaquetas, manifestações hemorrágicas, infecções recorrentes e eczema.

3.1.2 Critérios de não-inclusão:

- Pacientes com escore clínico igual a 1;
- Pacientes portadores de qualquer outra imunodeficiência ou doença que cause trombocitopenia;
- Pacientes em uso de medicamentos que comprometam a trombocitopoiese;
- Pacientes do sexo feminino;
- Pacientes com SWA já transplantados.

3.2 Métodos:

3.2.1 *Western Blotting*:

Para a expressão da proteína WASp, inicialmente foi realizada a extração de proteínas a partir de sangue total e posterior realização do *Western Blotting*. No entanto, esse procedimento inicial não se mostrou adequado para expressão específica da WASp, apesar de a mesma estar presente em todas células

hematopoiéticas. Desta forma, foi modificada a forma de extração das proteínas, após separação do pool de linfócitos, o que melhorou a qualidade de detecção da expressão da WASp.

Amostras de sangue periférico foram coletadas por venopunção em tubo contendo EDTA, atingindo volume final de 4 mL. Primeiramente, foi realizada a separação dos linfócitos em Ficoll para posterior extração de proteínas das amostras (RASKIND et al, 2000), utilizando-se o tampão de lise RIPA® (Pierce), juntamente com inibidor de proteases seguindo-se as recomendações do fabricante. A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

A metodologia utilizada para realização do *Western Blotting* foi seguida de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Massas iguais de proteínas totais (25 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12%, utilizando-se o sistema *Mini Protean II Dual Slab Cell* (Bio-Rad, EUA) em condições constantes de voltagem (80 V) e variável de miliamperagem (15 a 45 mA). Após o processo de transferência para a membrana de nitrocelulose, seguiu-se o processo de imunodetecção. As membranas foram bloqueadas em solução *non fat-Milk* 5% em TBS-T (0.1%) *overnight*. Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo monoclonal primário anti-WASp derivado de camundongos (Santa Cruz Biotechnology®, WASP (D-1): sc-5300) utilizando-se diluição 1:200 por uma hora e em seguida foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos da membrana em TBS-T para a retirada do excesso de anticorpo. Incubou-se com o anticorpo secundário *anti-mouse* na diluição 1:10.000 e as membranas foram novamente submetidas ao processo de lavagem.

Como controle endógeno, foi realizada a detecção da proteína GAPDH, incubando a membrana com anticorpo anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology®, GAPDH (0411):sc-47724) na concentração 1:1.000. A revelação dos resultados foi realizada através do emprego do substrato quimioluminescente ECL (Amersham, EUA).

3.2.2 Extração de ácidos nucleicos:

As amostras de sangue periférico coletadas em tubo contendo EDTA foram submetidas à lise de hemácias e o *pellet* resultante foi utilizado para extração do DNA (AUSUBEL et al., 1997). Para isso, foi utilizado o kit de Extração de DNA da QIAGEN® (cat 51106 – QIAGEN, Germantown, USA), segundo especificações do protocolo fornecido pelo fabricante.

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR):

A amplificação do DNA genômico foi feita a partir de reação em cadeia de polimerase, utilizando 13 pares de *primers* distintos para amplificação dos 12 exons do gene WAS (Tabela 5). Os primers utilizados foram descritos anteriormente (GILIANI, 1999; JONES, 2002). Cada par de *primer* (*forward* e *reverse*) foi sintetizado pela empresa Sigma-Aldrich® com a adição de uma cauda M13 para melhorar a qualidade do sequenciamento. Apenas o *primer* B, correspondente ao exon 2, não foi sintetizado com a cauda M13, devido à sequência de similaridade de 7 pares de bases entre os dois, que pode ser verificada através da plataforma BLAST no site do NCBI (YE et al., 2012).

A PCR foi padronizada para cada par de *primer* conforme temperaturas de anelamento descritas na Tabela 5. Os seguintes reagentes foram utilizados na reação com concentração fixa para todos os *primers*: tampão (2,5 µL), dNTP (0,5 µL), *primer forward* (0,5 µL), *primer reverse* (0,5 µL) e taquipolimerase (0,2 µL). A concentração do sulfato de magnésio (MgSO₄) utilizada nas reações variou entre 0,5 a 1 µL.

TABELA 5. Sequência de *primers* utilizados para amplificação do gene WAS (GILLIANI et al., 1999; JONES et al., 2002)

PRIMER	EXON	5'PRIMER	3'PRIMER	TAMANHO (pb)	Ta* (°C)
A	1	5'-agcctcgccagagaagaccaa-3'	5'-cccagctcaccaagcatttt-3'	176	58°C
B	2	5'-cggtagccctgaccagactc-3'	5'-catatgtgtccatagcttcaag-3'	280	59°C
C	3	5'-tgcctcccaccctacacctc-3'	5'-ctcctctccacaccccaagt-3'	160	62°C
D	4	5'-acccctcttctccacacctt-3'	5'-ctgcccacttccttctc-3'	270	60°C
R	5	5'-aaggaatcagaggcaaagt-3'	5'-gggaagatggaatgtgtaga-3'	248	59°C
F	6	5'-tgcaagtaggggtaataagg-3'	5'-agacacagggagaatcagc-3'	160	59°C
G	7	5'-gttggttgtaagtgggtca-3'	5'-caggaatctgtgggtccact-3'	260	60°C
H	8	5'-aaggaaggctgtgaggatt-3'	5'-ggtggaagttagtgagtc-3'	131	59°C
I	9	5'-tcccctggccttttctc-3'	5'-ctagagaaggagcgtatgga-3'	215	59°C
L	10-5'	5'-ccctccacagaccacttcc-3'	5'-ggtccagaacgtccagtagc-3'	218	58°C
M	10-3'	5'-tccaccaccacccctccag-3'	5'-tctagaccccaatcctccatcct-3'	274	67°C
N	11	5'-agccctaagccctctgtggctg-3'	5'-gtgactgctgggattgttttgag-3'	226	57°C
O	12	5'-cccaggcatcttatcttctc-3'	5'-gttgggtgagtgaggaccag-3'	257	59°C

*pb: Pares de bases *Ta: Temperatura de anelamento.

Para cada reação em cadeia de polimerase, foi amplificado inicialmente 1 µL de DNA genômico, em concentrações que variaram de 10 a 70 ng/µL, seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto nas temperaturas específicas para cada par de *primers* descritas na Tabela 5, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 minutos (AUSUBEL et al., 1997). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e brometo de etídeo, com posterior revelação por quimioluminescência para verificação de qualidade dos mesmos.

3.2.4 Sequenciamento do DNA genômico:

O sequenciamento foi realizado por método de Sanger, utilizando o kit Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA) com os produtos de PCR diretamente. O equipamento utilizado foi ABIPRISM 3500 XL Genetic Analyser, lotado no Núcleo de Biotecnologia (NSB) do Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.3 Análise estatística:

As características clínicas dos pacientes foram descritas em porcentagem e os cálculos de média, desvio-padrão e mediana foram realizados com auxílio do *software Microsoft Excell for Windows®* versão 2013.

Para a análise do sequenciamento, a qualidade dos cromatogramas foi verificada através do *software Seq Scanner 2*, da *Applied Biosystems®*, e a verificação de trocas de bases nitrogenadas foi feita com o *software Codon Code Aligner* (versão 5.1.5).

Todas as alterações encontradas foram analisadas utilizando o *software online* Mutation Taster (SCHARWZ et al., 2014). Substituições únicas de aminoácidos foram analisadas com algoritmo de predição de patogenicidade do *software online* SNPdryad (WONG, 2014). Substituições de bases nitrogenadas classificadas como polimorfismos foram descartadas, enquanto as alterações classificadas como patogênicas foram analisadas em bancos de dados de informação genômica *online*, buscando a confirmação ou ausência de descrição prévia das mutações encontradas. Os bancos de mutações utilizados foram o

The Human Gene Mutation Database (HGMD), que apresenta mais de 400 mutações descritas no gene *WAS* (STENSON et al., 2017), e o *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), que contém dados de sequenciamento de exoma proveniente de mais de 60 mil indivíduos não-aparentados (LEK et al., 2016).

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados dados clínicos de 18 pacientes, com idade variando de 5 meses a 16 anos, provenientes de várias regiões do país, sendo 6 pacientes provenientes do nosso Serviço (HCRP-USP). De acordo com revisão da literatura, este é o primeiro estudo a analisar as características clínicas e moleculares de pacientes brasileiros.

Apenas 1 paciente estudado não iniciou sintomas no primeiro ano de vida. A média de idade para início dos sintomas foi de 4,5 meses, variando do 1º dia de vida aos 2 anos e mediana de 1 mês. Suri et al (2012) descreveram média de idade para o início dos sintomas de 3,9 meses.

Em nosso estudo, a média de idade ao diagnóstico foi de 35,3 meses com mediana de 10,5 meses e o intervalo de tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 31,2 meses e mediana de 6,5 meses. Estudo realizado na Índia com 8 pacientes relatou tempo médio para o diagnóstico de 31 meses (SURI et al., 2012), enquanto Sullivan et al. (1994) relataram média de idade ao diagnóstico de 24 meses em famílias sem história prévia de imunodeficiência. Essa diferença entre as médias de idade ao diagnóstico pode ser explicada pela presença de 3 pacientes cujo diagnóstico foi realizado tardiamente (dos 10 aos 13 anos de idade após o início dos sintomas), sendo a mediana uma medida de dispersão mais representativa da população estudada. O diagnóstico tardio nesses pacientes poderia ser explicado pela apresentação mais leve nos primeiros anos de vida, os quais apresentaram escores clínicos de 2. Desses 3 pacientes, dois evoluíram para escore clínico de 5 devido ao surgimento de manifestação autoimune e neoplásica na adolescência, o que levou à suspeição diagnóstica.

Em nosso estudo, 17 pacientes (94,5%) apresentaram eczema crônico, o que foi semelhante aos achados de Sullivan et al. (1994), que observaram esta manifestação cutânea em 81% dos pacientes avaliados. Devido à alta frequência do eczema na SWA, a presença desta manifestação, principalmente quando de intensidade mais grave, é uma importante ferramenta no diagnóstico diferencial com outras doenças que causam trombocitopenia, como a XLT e púrpura trombocitopênica imune.

No presente estudo, todos os pacientes incluídos apresentaram plaquetopenia e seus níveis plaquetários variaram entre 1.000 a 65.000/mm³, níveis semelhantes aos obtidos por Sullivan et al. (1994), que variaram entre 3.000 a 70.000/mm³. A presença de plaquetopenia persistente é o achado mais consistente da SWA (OCHS et al., 2009). Com relação ao volume plaquetário, 9 de nossos pacientes (50%) apresentaram microplaquetas, de acordo com descrição do hemograma. A leitura automatizada das lâminas, sem a realização de revisão por hematologista, poderia justificar a presença de plaquetas de tamanho normal em 38,9% dos pacientes. A presença de plaquetas de tamanho normal já foi relatada em outros estudos (PATEL et al., 2011; MANTADAKIS et al., 2014). Por outro lado, macroplaquetas foram observadas em 2 pacientes (11,1%). Skoric et al. (2014) relataram 1 caso de SWA com história de sangramento desde o primeiro dia de vida, macrotrombocitopenia e progressão para manifestações autoimunes. Este paciente apresentou mutação de ponto no exon 2 no gene *WAS*.

Em nosso estudo, 16 pacientes (88,9%) apresentaram manifestações hemorrágicas ao longo da vida em decorrência da plaquetopenia, de forma semelhante a outros estudos, que relataram eventos hemorrágicos em mais de

80% dos casos (SULLIVAN et al., 1994; OCHS et al., 2006; AMARINTHNUKROWH et al., 2012). As hemorragias mais frequentes foram petéquias, sangramento intestinal e urinário. Sullivan et al. (1994) descreveram as petéquias e hemorragias intestinais como sendo as mais frequentes em seus pacientes.

Com relação às manifestações infecciosas, as otites médias agudas (OMA) foram as mais frequentes, sendo relatadas por 13 pacientes (72,2%), seguidas pelas infecções de pele, relatadas por 12 pacientes (66,7%). Otite média é uma infecção frequentemente relatada em outros estudos (WISKOTT, 1937; IMAI et al., 2004; CANDOTTI, 2017). Diagnóstico de pneumonia foi encontrado na história clínica de 9 pacientes (50%), enquanto que diarreia esteve presente na história de 8 pacientes (44,5%). Treze pacientes (72,2%) apresentaram infecções recorrentes, definidas como: duas ou mais pneumonias no último ano, quatro ou mais novas otites no último ano, abscessos ou impetigos de repetição ou episódios recorrentes de diarreia. Vários estudos mostram alta frequência de infecções sinopulmonares (SULLIVAN et al., 1994; AMARINTHNUKROWH et al., 2012; BUCHBINDER et al., 2014). Infecção ainda é a principal causa de mortalidade nesses pacientes (PERRY et al., 1980; SULLIVAN et al., 1994).

Do grupo de pacientes estudados, 5 pacientes (27,8%) relataram história de óbito precoce na família, sendo que 2 deles (40%) apresentaram história familiar positiva para imunodeficiências primárias (IDP). Consanguinidade entre os genitores foi relatada em 2 pacientes (11,1%), ambos com óbito precoce na família. História familiar para IDP foi observada em apenas 1 deles.

Embora as normas de imunizações contraindiquem vacinas atenuadas para pacientes com SWA devido ao potencial risco de reações graves, no presente estudo nenhum paciente apresentou reações causadas por cepas vacinais. Reações vacinais graves não são comumente relatadas, especialmente quando as vacinas são realizadas nos primeiros anos de vida, quando as alterações imunológicas são encontradas em menor intensidade (THRASHER, 2009).

Com relação ao desenvolvimento de neoplasia, no presente estudo apenas 1 paciente (5,5%) apresentou manifestação oncológica, com diagnóstico de linfoma de células B aos 9 anos de idade. É possível que esta baixa frequência encontrada de neoplasias seja devido à idade dos pacientes estudados, que se encontram na faixa etária pediátrica. Os pacientes com SWA possuem maior risco para desenvolvimento de neoplasias na segunda década de vida, sendo o linfoma de células B a neoplasia mais associada à síndrome (OCHS et al., 2006; MOULDING et al., 2013).

Em relação à autoimunidade, 3 pacientes (16,7%) apresentaram manifestações autoimunes, dentre elas nefropatia por IgA, acidente vascular encefálico isquêmico e vasculite. As doenças autoimunes também são frequentemente relatadas nos pacientes com SWA, com incidência em 40 a 72% dos pacientes (SULLIVAN et al., 1994; DUPUIS-GIROD et al., 2003), especialmente anemia hemolítica autoimune, vasculites, doenças renais, púrpura de Henoch-Schölein e doença inflamatória intestinal (OCHS et al., 2006). De forma semelhante às neoplasias, é possível que a baixa frequência de manifestações autoimunes, comparada com outros estudos, seja devido à faixa etária dos pacientes avaliados.

Seis pacientes (37,5%) apresentaram manifestações alérgicas, dentre elas asma e rinite alérgica. Imai et al. (2004) relataram manifestações alérgicas em apenas 16% dos pacientes. Asma e alergia alimentar são manifestações alérgicas comumente relatadas em pacientes com SWA (CANDOTTI, 2018).

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes estão resumidas na Tabela 6.

Tabela 6 - Características clínicas e laboratoriais dos 18 pacientes analisados.

DIAGNÓSTICO					
	MÉDIA (meses)	DESVIO- PADRÃO	MEDIANA (meses)	MÍNIMO (meses)	MÁXIMO (meses)
Idade de início dos sintomas	4,5	6.1	1	0,03	24
Idade ao diagnóstico	35,3	52,7	10,5	0,03	156
Tempo médio para diagnóstico	31,2	53	6,5	0	156
ANTECEDENTES FAMILIARES					
Consanguinidade			2 (11,1%)		
Óbito precoce na família			5 (27,8%)		
Diagnóstico de IDP na família			3 (16,7%)		
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS					
	SIM		NÃO		
Eczema	17 (94,5%)		1 (5,5%)		
Manifestações infecciosas recorrentes	13 (72,3%)		5 (27,7%)		
Manifestações autoimunes	3 (16,7%)		15 (83,3%)		
Manifestações alérgicas	6 (37,5%)		12 (66,7%)		
Manifestações oncológicas	1 (5,5%)		17 (94,5%)		
NÍVEL PLAQUETÁRIO					
MÉDIA (mm³)	DESVIO- PADRÃO	MEDIANA (mm³)	VALOR MÍNIMO (mm³)	VALOR MÁXIMO (mm³)	
19.605	19944,64	8.500	1.000	65.000	
TAMANHO PLAQUETÁRIO					
DIMINUÍDO		NORMAL		AUMENTADO	
9 (50%)		7 (38,9%)		2 (11,1%)	
MANIFESTAÇÕES HEMORRÁGICAS					
Enterorragia			6 (33,3%)		
Petéquias			6 (33,3%)		
Hematúria			3 (16,7%)		
Epistaxe			1 (5,5%)		
Otorragia			1 (5,5%)		
MANIFESTAÇÕES INFECCIOSAS					
Otite média aguda			13 (72,2%)		
Infecções de pele (impetigo, celulite e abscessos)			12 (66,7%)		
Pneumonia			9 (50%)		
Diarreia			8 (44,4%)		
Infecções virais			5 (27,8%)		
Sinusites			5 (7,8%)		

Com relação à avaliação imunológica, apenas as dosagens de imunoglobulinas foram realizadas em todos os pacientes (pelo método de nefelometria). Os demais parâmetros imunológicos foram realizados em menor número de pacientes, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Dez pacientes (55,5%) apresentaram níveis normais de IgG, 3 pacientes (16,7%) apresentaram níveis abaixo do percentil (P) 10 e níveis acima do P97 para a idade foram observados em 5 pacientes (27,8%). De maneira geral, a maioria dos pacientes com SWA apresenta níveis normais de IgG (OCHS et al., 2006; ALBERT et al., 2011), embora haja relatos de pacientes com hipergamaglobulinemia (SURI et al., 2012; AMARINTHNUKROWH et al., 2012).

Doze pacientes (70,6%) apresentaram níveis normais de IgA, 4 pacientes (23,5%) apresentaram níveis acima do P97 para a idade e apenas 1 paciente (5,5%) apresentou níveis de IgA abaixo do P10. O aumento nos níveis de IgA é uma alteração comumente relatada (DERRY et al., 1995; OCHS et al., 2006), ao passo que a deficiência de IgA é uma alteração menos frequente, tendo sido descrita em outras publicações (SULLIVAN et al., 1994; BUCHBINDER et al., 2014).

Redução dos níveis de IgM foi observada em 7 pacientes (38,9%), o que está de acordo com os resultados de Lee et al (2010), que reportaram 37,5% pacientes com níveis diminuídos de IgM. A diminuição nos níveis de IgM é uma alteração frequentemente relatada em diversos estudos (DERRY et al., 1995; ZHU et al., 1997; IMAI et al., 2004; MOULDING et al., 2013). Um de nossos pacientes apresentou níveis de IgM acima do P97, associado com

desenvolvimento de nefropatia por IgA. Níveis elevados de IgM estão associados com risco aumentado de autoimunidade (SURI et al., 2012).

A dosagem de IgE total foi avaliada em 7 pacientes (pelo método de ELISA) e foram observados níveis elevados em 6 (85,7%), com concentração média igual a 2.263 KU/L (variando de 71 a 6000 KU/L). Lee et al. (2010) reportaram aumento dos níveis de IgE em 87,5% dos pacientes, enquanto Imai et al. (2004) reportaram níveis de IgE acima de 100 KU/L em 81% dos pacientes WASp negativos. Os pacientes com a SWA comumente apresentam elevações dos níveis de IgE, justificando o eczema (SULLIVAN et al., 1994; ALBERT et al., 2011).

Com relação à resposta vacinal, 11 pacientes foram avaliados para hepatite B (pelo método de ELISA) e destes, sete (63,6%) apresentaram resposta adequada e 4 pacientes (36,4%) resposta inadequada. A vacinação dos pacientes com SWA com vacinas de agentes inativados é incentivada, apesar da possibilidade de a resposta ser ineficiente (OCHS et al., 2006). Apenas 2 pacientes foram avaliados quanto à resposta aos anticorpos antipneumococos (pelo método de ELISA), sendo que 1 deles apresentou resposta deficiente. Resposta vacinal ineficiente aos antígenos pneumocócicos é uma alteração frequente na SWA (SULLIVAN et al., 1994; BUCHBINDER et al., 2004; ALBERT et al., 2011), mas infelizmente não foi possível esta avaliação em um maior número de pacientes nesse estudo.

Em relação à avaliação da imunidade inata, as células *Natural Killer* (NK) foram quantificadas (por citometria de fluxo) em 7 pacientes, tendo sido observado aumento do número em 5 pacientes (71,4%). Pacientes com SWA geralmente apresentam número normal ou elevado de células NK, porém

apresentam função anormal, devido à ausência da proteína WASp, que é essencial para sinalização celular (ORANGE et al., 2002; OCHS et al., 2006, BUCHBINDER et al., 2014). Infelizmente não foi possível realizar a avaliação funcional das células NK neste estudo.

Em relação à quantificação das células B (por citometria de fluxo), 8 pacientes foram avaliados, dos quais 5 pacientes (62,5%) apresentaram níveis abaixo do P10 para idade. Lee et al (2010) encontraram a mesma alteração em 5 dos 16 (31,2%) pacientes avaliados. Todos os pacientes com número reduzido de células B apresentaram escore clínico maior ou igual a 3. Todos os pacientes estudados com idade acima de 10 anos apresentaram diminuição do número de células B. De acordo com Park et al. (2005), pacientes com SWA podem apresentar número normal ou reduzido de linfócitos B.

Em relação à quantificação de linfócitos T CD4 e CD8 (por citometria de fluxo), 10 pacientes foram avaliados. Enquanto 2 pacientes (20%) apresentaram redução do número de células CD4, seis pacientes (60%) apresentaram diminuição do número de células CD8. Tanto os linfócitos CD4 quanto os linfócitos CD8 podem estar reduzidos nos pacientes com SWA (PARK et al., 2005).

As características da avaliação imunológica estão descritas na Tabela 7.

TABELA 7. Características imunológicas dos pacientes com SWA.

IMUNOGLOBULINAS (mg/dL)					
	IgG (n=18)		IgM (n=18)		IgA (n=17)
MÉDIA	1067,72		93,96		142,73
DESVIO-PADRÃO	629,13		109,93		117,46
VALOR MÍN	405,00		6,00		15,80
MEDIANA	915,25		62,35		125,00
VALOR MÁX	2970,00		451,80		450,00
< P10	3 (16,7%)		7 (38,9%)		1 (5,9%)
P10-P97	10 (55,5%)		10 (55,6%)		12 (70,6%)
> P97	5 (27,8%)		1 (5,5%)		4 (23,5%)
IMUNOFENOTIPAGEM (células/mm³)					
	CD3 (n=6)	CD4 (n=10)	CD8 (n=10)	CD19 (n=8)	CD16/56 (n=7)
MÉDIA	2592,67	1327,1	520,56	458,1	1873,7
DESVIO-PADRÃO	1873,91	868,77	499,9	329,1	1884,65
VALOR MÍN	692,00	548,00	8,60	68,00	729,00
MEDIANA	2269,50	1045	258,5	342,5	1201
VALOR MÁX	5680,00	3282,00	1406,00	986,00	351,00
< P10	2 (33,3%)	2 (20%)	6 (60%)	5 (62,5%)	0
P10-P97	2 (33,3%)	5 (50%)	2 (20%)	3 (37,5%)	2 (28,6%)
> P97	2 (33,3%)	3 (30%)	2 (20%)	0	5 (71,4%)
DOSAGEM DE IgE (KU/L) (n=7)					
TOTAL DE PACIENTES	1 (14,3%)			6 (85,7%)	
ANTI-HBS (n=11)					
	REAGENTE			NÃO REAGENTE	
TOTAL DE PACIENTES	7 (63,6%)			4 (36,4%)	

Do ponto de vista clínico, os pacientes foram classificados de acordo com escore previamente descrito (OCHS et al, 2006). A maioria dos pacientes apresentou escores 3 (33,3%) ou 4 (27,8%), conforme apresentado na Figura 3. Dentre os 4 pacientes com escore 5, manifestações autoimunes estiveram presentes em 3 (acidente vascular encefálico isquêmico relacionado à autoimunidade, vasculite e nefropatia por IgA) e 1 paciente evoluiu com linfoma de células B.

FIGURA 3. Distribuição dos pacientes de acordo com escore clínico

Com relação à análise da expressão da proteína WASp, devido às dificuldades técnicas encontradas, já discutidas em Métodos, além da escassez de material e impossibilidade de nova coleta de sangue, a avaliação somente pôde ser realizada em 5 pacientes. A expressão de WASp em cada amostra foi repetida em dois momentos diferentes. Para confirmação diagnóstica, a técnica foi realizada em conjunto com a expressão da proteína GAPDH, confirmando a viabilidade da amostra testada (Figura 4).

FIGURA 4. Expressão da WASp

Exemplo de resultado esperado na expressão da WASp por *Western Blotting*. A. Expressão do marcador de peso molecular. B. Controle positivo; com presença de banda para WASp. C. Paciente WASp negativo, sem presença de banda de 60 KDa, mostrando apenas banda para GAPDH, mostrando viabilidade da amostra.

Em relação à análise genética, foram encontradas mutações em 10 pacientes (55,5%). A expressão da proteína WASp, os tipos de mutações, suas localizações e os escores clínicos dos pacientes podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Descrição das mutações encontradas no gene *WAS*.

PACIENTE	EXON	DNAg	Tipo de mutação	WASp	ALTERAÇÃO AMINOÁCIDO	ESCORE CLÍNICO
WA-01	NA	NA	NA	NR	NA	5
WA-02	7	631C>T	<i>Nonsense</i>	NR	R211*	3
WA-04	10	1365_1366 delCG	<i>Frameshift</i>	NR	L456Afs*38	3
WA-05	NA	NA	NA	NR	NA	3
WA-06	1	100C>T	<i>Nonsense</i>	NR	R34*	3
WA-07	11	1381C>T	<i>Nonsense</i>	NR	Q461*	2
WA-08	Intron 6	IVS6-1G>A	<i>Splice site</i>	NR	<i>Splice site</i>	4
WA-09	4	397G>A	<i>Missense</i>	NR	E133K	2
WA-10	NA	NA	NA	NR	NA	2
WA-12	10	1294G>T	<i>Nonsense</i>	NR	G432*	5
WA-13	NA	NA	NA	NR	NA	4
WA-14	NA	NA	NA	NR	NA	4
WA-15	NA	NA	NA	NR	NA	4
WA-17	3	320A>G	<i>Missense</i>	Ausente	Y107C	5
WA-18	NA	NA	ND	Ausente	NA	3
WA-19	10	1031_1032 insC	<i>Frameshift</i>	Ausente	V345Cfs*150	5
WA-23	NA	NA	NA	Ausente	NA	3
WA-24	Intron 8	IVS8 +3-6delGAGT	<i>Splice site</i>	Ausente	<i>Splice site</i>	4

*NR: Não realizado; NA: Não alterado

O paciente WA-02 foi classificado com escore clínico 3 aos 4 anos de idade e apresentou início dos sintomas no primeiro mês de vida, como plaquetopenia com microplaquetas, infecções recorrentes e eczema. Apresentou dosagem de IgG e IgA acima do P97 para idade e níveis normais de IgM. Na análise genética foi detectada uma mutação *nonsense* no exon 7, com troca de uma arginina por *stop codon* na posição 211 (Figura 5). A mesma mutação já foi descrita anteriormente, em paciente com mesmo escore clínico (QASIM et al., 2001).

FIGURA 5. Cromatograma mostrando troca de citosina por timina no exon 7, levando à substituição de arginina por *stop códon* na posição 211.

O paciente WA-04 apresentou quadro de plaquetopenia sem microplaquetas, associado a eczema e infecções recorrentes a partir do segundo mês de vida, sendo classificado com escore clínico 3 aos 9 meses de idade. Apresentava história familiar positiva de óbito em crianças e consanguinidade. Apresentou níveis de IgE total > 100KU/L, níveis de IgG abaixo do P3 e níveis normais de IgM e IgA. A análise genética evidenciou uma deleção no exon 10, levando à substituição de leucina por alanina na posição 456 e *frameshift* a partir da posição 38 (Figura 6). Não foi encontrada descrição dessa mutação nos bancos HGMD e ExAC, podendo, possivelmente, estar relacionada com a forma clássica da doença, uma vez que o fenótipo se enquadrou no escore clínico 3.

FIGURA 6. Cromatograma mostrando deleção de duas bases (guanina e citosina) no exon 11, levando à troca de leucina por alanina na posição 456.

O paciente WA-06, de 6 anos, também com escore clínico 3, apresentou manifestações hemorrágicas desde o primeiro mês de vida, associado a eczema e infecções de repetição. A análise dos níveis de imunoglobulinas mostrou níveis normais de IgG e IgA, níveis de IgM abaixo do P3 e dosagem de IgE total maior do que 100KU/L. Na avaliação de subtipos linfocitários, foram verificados níveis de células CD3+, CD4+ e CD8+ abaixo do P10. A análise genética mostrou mutação *nonsense* no exon 1, com substituição de uma arginina por um *stop* códon na posição 34 (Figura 7), levando a *frameshift*. Essa mutação foi descrita anteriormente por Kwan et al (1995), em paciente cujo escore clínico não foi relatado.

FIGURA 7. Cromatograma mostrando troca de citosina por timina no exon 1, levando à substituição de arginina por *stop* códon na posição 34 e *frameshift*.

O paciente WA-07, de 9 meses, apresentou história de enterorragia no primeiro dia de vida, associado a eczema leve, sendo classificado com escore clínico 2. Em relação à avaliação imunológica, foi coletada apenas dosagem de imunoglobulinas, que mostrou níveis normais de IgG e IgA e níveis de IgM abaixo de P10. Na análise genética foi encontrada mutação *nonsense* em região codificadora (CDS) do exon 11 (Figura 8), que determina a substituição do aminoácido glutamina por um *stop codon* na posição 461 da proteína WASp. Essa variante não foi encontrada nos bancos de dados ExAC e HGMD, não tendo sido descrita anteriormente. Como o escore clínico apresentado pelo paciente é mais compatível com o diagnóstico de XLT, seria essencial, neste caso, a avaliação da expressão da proteína WASp para o diagnóstico diferencial com a SWA, o que não foi possível. Ainda assim, modificação do fenótipo de XLT para SWA pode ocorrer, considerando-se que a classificação do escore foi realizada em idade precoce (9 meses) e alguns pacientes podem evoluir com piora do escore clínico ao longo dos anos.

FIGURA 8. Cromatograma mostrando troca de citosina por timina no exon 11, levando à substituição de glutamina por stop códon na posição 461.

O paciente WA-08, de 1 ano de idade, apresentou início dos sintomas com 12 dias de vida, tendo recebido o diagnóstico com 3 meses devido a quadro de plaquetopenia sem microplaquetas, associado a eczema grave e infecções recorrentes, sendo classificado com escore clínico 4. Apresentava relato de história familiar positiva para IDP, com óbito precoce desse mesmo parente. Na avaliação imunológica, coletada apenas dosagem de imunoglobulinas que mostrou hipergamaglobulinemia e níveis normais de IgM e IgA. A análise genética evidenciou mutação em região intrônica do exon 6 (Figura 9). Apesar de não ter sido encontrada essa variante no ExAC, mutação nesse mesmo local já foi descrita anteriormente por Kwan et al. (1995) como possivelmente patogênica por alterar região de *splice site*.

FIGURA 9. Cromatograma mostrando substituição de adenosina por guanina no exon 6, em região intrônica.

O paciente WA-09, de 8 meses de idade, recebeu diagnóstico no primeiro dia de vida devido à plaquetopenia associada a consanguinidade parental, história familiar positiva para SWA e história familiar de óbito precoce em criança. Foi classificado com escore clínico 2 em avaliação realizada aos 8 meses de vida devido a presença de plaquetopenia com microplaquetas e eczema leve. Em avaliação imunológica, coletadas apenas dosagem de IgG e IgM, que mostrou níveis normais da primeira e níveis de IgM abaixo do P3. Análise genética detectou mutação de ponto do tipo *missense* no exon 4, com a troca de guanina por adenosina (Figura 10), levando à substituição de glutamato por lisina na posição 133 da proteína, em região codificadora do domínio WH1. Essa mutação já foi descrita por Kwan et al. (1995), em dois pacientes não-aparentados com diagnóstico clínico de SWA e em um paciente com escore clínico de 4 por Qasim et al. (2001). Como a classificação do escore clínico foi realizada em idade precoce (8 meses), é possível que ainda ocorra modificação do fenótipo, considerando-se a possível ocorrência de progressão e piora do escore em alguns pacientes ao longo do tempo.

FIGURA 10. Cromatograma mostrando troca de guanina por adenina no exon 4, levando à substituição de glutamato por lisina na posição 133.

O paciente WA-12, de 5 anos de idade, apresentou história familiar positiva para IDP, enterorragia por plaquetopenia com microplaquetas, eczema e infecções de repetição, com início no primeiro ano de vida e escore clínico inicial de 3. Aos 5 anos, evoluiu com acidente vascular encefálico isquêmico, de causa autoimune e, por isso, foi reclassificado com escore clínico 5. Realizada dosagem de imunoglobulinas anteriormente ao desenvolvimento do quadro autoimune, que mostrou níveis normais de IgG, níveis de IgM abaixo do P3 e níveis de IgA acima de P97. Na análise genética foi detectada mutação do tipo *nonsense*, relacionada com a troca de uma guanina por uma timina no exon 10, levando à substituição do aminoácido glicina na posição 432 por *stop codon*, em região codificadora do domínio WH2 da proteína (Figura 11). Essa mutação também não foi encontrada nos bancos de dados ExAC e HGMD, possivelmente podendo estar relacionada com gravidade e potencial desenvolvimento de autoimunidade.

FIGURA 11. Cromatograma mostrando troca de guanina por timina no exon 10, levando à substituição de glicina por stop códon na posição 432.

O paciente WA-17, de 11 anos, apresentou evolução atípica. Iniciou com plaquetopenia e eczema leve desde 7 meses, tendo sido acompanhado durante os primeiros anos de vida com diagnóstico de púrpura trombocitopênica imune (PTI) ou XLT, tendo sido classificado com escore clínico 2. Aos 10 anos, iniciou quadro de nefropatia por IgA, progredindo para escore clínico 5. Avaliação imunológica evidenciou níveis normais de IgG, níveis de IgA abaixo do P3 e níveis de IgM acima do P97. Em relação aos subtipos linfocitários, verificado níveis normais de células CD4+ e CD8+, níveis de linfócitos CD19+ abaixo do P10 e níveis de células NK acima do P97. Análise genética detectou mutação de ponto do tipo *missense* no exon3, com troca de adenina por guanina, levando à substituição de tirosina por cisteína na posição 107 da proteína (Figura 12). A primeira avaliação dessa alteração foi feita no MutationTaster e considerou-se a possibilidade de polimorfismo. No entanto, análise feita pelo SNPdryad considerou a alteração como patogênica. Essa mesma mutação não foi descrita nos bancos de dados ExAC e HGMD, apesar de outras mutações reconhecidamente associadas à SWA já terem sido identificadas nesta posição, que é responsável por codificar o domínio WH1 (ZHU et al., 1997). A análise de

expressão da proteína WASp evidenciou ausência completa da mesma, reforçando o caráter de patogenicidade da mutação detectada.

FIGURA 12. Cromatograma evidenciando troca de adenina por guanina no exon 3, levando à substituição de lisina por cisteína na posição 107.

Sequenciamento do exon 3 dos genitores do paciente mostrou que a mãe é heterozigota para essa alteração (Figura 13).

FIGURA 13. Cromatograma com sequenciamento do exon 3 do paciente WA-17 e dos pais, mostrando paciente com alteração em homozigose e mãe com alteração em heterozigose.

O paciente WA-19, de 12 anos de idade, apresentou plaquetopenia no primeiro dia de vida, tendo recebido o diagnóstico de PTI. Não tinha relato de microplaquetopenia, eczema ou infecções frequentes, com escore clínico inicial de 1. Durante seguimento, evoluiu com linfoma de células B na primeira década de vida, que recidivou após término do tratamento. Diante desta evolução, foi aventada a possibilidade diagnóstica de SWA, apesar de o paciente não apresentar relato de infecções recorrentes ou eczema. Para avaliação nesse estudo, o paciente foi classificado com escore clínico 5. Na avaliação imunológica, observou-se dosagem normal de imunoglobulinas e linfócitos CD4+; linfócitos CD3+, CD8+ e CD19+ estavam diminuídos e marcadores para células NK aumentados. A análise de expressão da proteína WASp evidenciou ausência completa da mesma. A análise genética identificou mutação no exon 10, com troca de valina por cisteína na posição 345, levando à *frameshift* a partir da posição 150 (Figura 14). Essa mutação não foi encontrada nos bancos de dados ExAC e HGMD.

FIGURA 14. Cromatograma mostrando inserção de citosina no exon 10, levando à troca de valina por cisteína na posição 345.

O paciente WA-24, de 10 meses de idade, nasceu pretermo tardio e, nos primeiros dias de vida, apresentou plaquetopenia com microplaquetas. Evoluiu com eczema leve e infecções recorrentes, além de conjuntivite alérgica, tendo

sido classificado com escore clínico 4. Sua avaliação imunológica mostrou dosagem aumentada de IgG e IgA, além de diminuição de linfócitos CD4+ e CD8+. A análise de expressão da proteína WASp evidenciou ausência completa da mesma. Na análise genética foi encontrada deleção de 4 pares de bases em intron 8 na região de *splice site* (Figura 15), descrita previamente por Gulácsya et al. (2011). Nessa mesma região já foram descritos outros tipos de mutação, com troca de aminoácidos e deleções (BROOIMANS et al., 2000; JIN et al., 2004; ABU-AMERO et al., 2004).

FIGURA 15. Cromatograma mostrando deleção de 4 pares de bases em região intrônica de exon 8.

Conforme descrito acima, dos 14 pacientes com escore clínico 3 a 5, foram encontradas mutações em 8 pacientes (57%), sendo mutações *nonsense* em 3 pacientes, mutação *missense* em 1 paciente, duas mutações em sítios de *splicing*, uma deleção e uma inserção. Por outro lado, dos 4 casos com escore clínico 2, foram encontradas mutações em 2 pacientes (50%), sendo 1 mutação *missense* e 1 mutação *nonsense*. A localização no gene WAS de todas mutações encontradas pode ser vista na figura 16.

FIGURA 16. Localização das mutações encontradas no gene WAS

Representação da localização das mutações encontradas no gene WAS dos pacientes estudados e sua relação com as regiões de codificação dos domínios da proteína WASp.

Jin et al. (2004) descreveram que mutações associadas à ausência de expressão da WASp foram predominantemente deleções e inserções, mutações *nonsense* ou mutações em sítios de *splicing* (85% dos pacientes), enquanto que mutações *missense* e complexas estiveram associadas a quadros mais graves em apenas 15% dos pacientes analisados. Em nosso estudo, dos 5 casos avaliados para expressão da proteína WASp, foram detectadas mutações em 3 pacientes (60%), sendo 1 mutação *missense*, 1 inserção e 1 deleção.

Estudos estabeleceram *hotspots* para mutações no gene WAS. Jin et al. (2004) avaliaram material genético de 227 famílias, tendo sido identificados 5 *hotspots*: 3 para XLT (168C>T, 290C>N/291G>N e IVS6+5g>a) e 2 para SWA (665C>T e IVS8+1g>n). Recentemente, um estudo realizado com 81 pacientes confirmou alguns *hotspots* e descreveu outros: as mutações de ponto 155C>T, 168C>N, 290C>N/291G>N e 665C>T, a deleção 797delC e as 3 mutações em sítios de *splicing* (IVS1+1g>n, IVS3+1g>n, IVS7+2t>c), que corresponderam a 36% de todas as mutações encontradas no grupo de pacientes estudados (LIU et al., 2015). De maneira interessante, nenhuma das mutações identificadas no presente trabalho se encontra nos *hotspots* descritos.

Por outro lado, não foram encontradas mutações em 8 pacientes (44,4%). Um desses pacientes apresentou escore clínico compatível com XLT, enquanto os demais apresentaram escores clínicos 3 a 5. A seguir apresentamos a descrição destes pacientes, cuja avaliação genética foi normal.

O paciente WA-01, de 7 anos, iniciou sintomas aos 20 dias de vida com manifestações hemorrágicas devido à plaquetopenia com microplaquetas. Durante seguimento, evoluiu com eczema grave e infecções de repetição, além de ter desenvolvido quadro de vasculite autoimune, sendo classificado com escore clínico 5. Em relação à avaliação imunológica, apresentou níveis reduzidos de IgG e IgM, níveis normais de IgA e níveis aumentados de IgE total. Quanto aos subtipos linfocitários, apresentou diminuição de células CD8+, com aumento de células NK e células CD4+ e células CD19+ normais.

O paciente WA-05, de 1 ano de idade, iniciou com manifestações hemorrágicas aos 5 meses, associadas à plaquetopenia com microplaquetas, eczema grave e infecções recorrentes. Recebeu escore clínico 3. Em relação à avaliação imunológica, foi verificado níveis de IgG e IgA acima do P97, com níveis normais de IgM, além de níveis de IgE total > 100 KU/L, aumento de células CD4+ e NK e diminuição de células CD8+.

O paciente WA-10, de 4 anos, apresentou petéquias aos 2 anos de vida, associado à plaquetopenia com microplaquetas e eczema leve, com fenótipo compatível com XLT e escore clínico 2. Apresentou hipergamaglobulinemia, com demais classes de imunoglobulinas normais, além de diminuição em células CD8+. As células NK não foram avaliadas nesse paciente.

O paciente WA-13, de 5 meses, iniciou com petéquias no primeiro mês de vida, associado a eczema grave e plaquetopenia com plaquetas de tamanho

normal. Foi classificado com escore clínico 4. Apresentou dosagem de IgG e IgA normais, com níveis baixos de IgM. Subtipos linfocitários não foram avaliados nesse paciente.

O paciente WA-14, de 8 anos, iniciou quadro com 6 meses com manifestações hemorrágicas secundárias à plaquetopenia com plaquetas de tamanho normal, associado à eczema grave e infecções recorrentes. Foi classificado com escore clínico 4. Na avaliação imunológica, foi verificada dosagem de imunoglobulinas normais e aumento de células CD4+ e NK, com células CD8+ normais. Linfócitos CD19+ não foram avaliados nesse paciente.

O paciente WA-15, de 16 anos, iniciou primeiros sintomas aos 3 meses de vida, com manifestações hemorrágicas. Evoluiu com eczema grave e infecções de repetição, sendo classificado com escore clínico 4. Não apresenta relato de microplaquetas. Na avaliação imunológica, apresentou níveis baixos de IgG e IgM, com níveis aumentados de IgA e IgE total. Linfócitos CD4+ e CD8+ encontraram-se aumentados, enquanto linfócitos CD19+ encontraram-se abaixo do P10 para idade. Células NK não foram avaliadas.

O paciente WA-18, de 3 anos, iniciou manifestações aos 9 meses de vida. Apresentou eczema leve e plaquetopenia com plaquetas de tamanho normal, associados a infecções recorrentes. Foi classificado com escore clínico 3. A dosagem de imunoglobulinas foi normal. Não foram avaliados subtipos linfocitários nesse paciente. A expressão da proteína WASp foi ausente.

O paciente WA-23, de 7 anos, iniciou sintomas no primeiro mês de vida com manifestações hemorrágicas secundárias à plaquetopenia sem microplaquetas. Apresentou eczema leve e infecções de repetição, sendo classificado com escore clínico de 3. Apresentou dosagem de imunoglobulinas

normais, com diminuição de linfócitos CD19+. A expressão da proteína WASp foi ausente.

Algumas limitações deste estudo não permitiram análises mais aprofundadas, especialmente em relação à análise genética. O pequeno número de pacientes avaliados não permitiu estabelecer a possível correlação entre fenótipo e genótipo, relatada em estudos prévios (JIN et al., 2004; OCHS et al., 2009). Além disso, a dificuldade inicial na padronização da técnica de *Western Blotting* para detecção da proteína WASp, em conjunto com a impossibilidade de nova coleta de material genético de pacientes provenientes de outros centros de referência não permitiu a realização da expressão de WASp em todos os pacientes incluídos no estudo. Consequentemente, 6 pacientes, com escore clínico compatível com SWA, não puderam ter o diagnóstico laboratorial confirmado, uma vez que não apresentaram mutações no sequenciamento dos 12 exons do gene *WAS*. Há relatos de pacientes com diagnóstico clínico de SWA que não apresentaram alterações nas regiões de codificação de proteína ou regiões de *splice site* do gene *WAS* (HAGEMANN et al., 1999; LIU et al., 2015). O sequenciamento de regiões promotoras já descritas poderia levar ao encontro de mutações nesses 6 pacientes (HAGEMANN et al., 1999).

Em nosso estudo, a alta frequência de mutações não descritas previamente nos bancos de dados utilizados poderia ser explicada pela ampla miscigenação da população brasileira, justificando a necessidade da investigação de mutações em um maior número de pacientes com SWA e, consequentemente, permitindo diagnósticos mais precisos.

5. CONCLUSÕES

Com relação às características clínicas e imunológicas dos 18 pacientes brasileiros avaliados, houve semelhanças em relação às características descritas na literatura internacional.

Com relação à análise genética, foram encontradas alterações em 10 pacientes, tendo sido descritas, em estudos prévios, apenas 4 mutações. Dentre as 6 mutações restantes, 4 mutações não foram encontradas nos bancos de dados ExAC e HGMD, enquanto 2 mutações foram encontradas em sítios de mutação já associados à SWA. Nenhuma das 10 mutações foi encontrada nos *hotspots* descritos.

As técnicas para o diagnóstico laboratorial da Síndrome de Wiskott-Aldrich foram padronizadas e implantadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, consistindo da detecção da expressão da proteína WASp por método de *Western-Blotting* e análise genética através do sequenciamento do gene *WAS* por método de Sanger.

6. REFERÊNCIAS

Abu-Amero KK, Owaidah TM, Al Jefri A et al. A novel splice site mutation in the WAS gene causes Wiskott-Aldrich syndrome in two siblings of a Saudi family. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004

Albert MH, Notarangelo LD, Ochs HD. Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott–Aldrich syndrome. *Current opinion in hematology* 2011; 18:42-48

Aldrich RA, Steinberg AG, Campbell DC. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics* 1954;13(2):133-9.

Amarinthnukrowh P, Ittiporn S, Tongkobpetch S et al. Clinical and molecular characterization of Thai patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Scand J Immunol* 2013 Jan;77(1):69-74.

Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO et al. Two novel activating mutations in the Wiskott–Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 2006; 108: 2182–2189.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, USA.1997.

Badour K, Zhang J, Shi F et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity*. 2003 Jan;18(1):141-54.

Bosticardo M, Marangoni F, Aiuti A et al. Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott–Aldrich syndrome. *Blood* 2009;113: 6288–95.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.

Brooimans RA, van den Berg AJ, Tamminga RY et al. Identification of six novel WASP gene mutations in patients suffering from Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Mutat* 2000 Apr;15(4):386-7

Buchbinder D, Nugent DJ, Fillipovich AH. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl Clin Genet* 2014 Apr 3;7:55-66.

Canales ML and Mauer AM. Sex-linked hereditary thrombocytopenia as a variant of Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* 1967; 277: 899- 901.

Candotti F. Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott-Aldrich Syndrome. *J Clin Immunol*. 2018 Jan;38(1):13-27.

Derry JM, Kerns JA, Weinberg KI et al. WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Hum Mol Genet* 1995 Jul;4(7):1127-35.

Devriendt K, Kim AS, Mathijs G et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet* 2001; 27: 313–317.

Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E et al. Autoimmunity in Wiskott–Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics* 2003; 111: 622–e627.

Filipovich AH, Stone JV, Tomany SC et al. Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program. *Blood* 2001; 97: 1598-1603.

Giliani S, Fiorini M, Mella P et al. Prenatal molecular diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome by direct mutation analysis. *Prenat Diagn*. 1999 Jan;19(1):36-40.

Gulácsy V, Freiburger T, Shcherbina A et al. Genetic characteristics of eighty-seven patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol Immunol*. 2011 Feb;48(5):788-92.

Hagemann TL, Kwan SP. The identification and characterization of two promoters and the complete genomic sequence for the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Mar 5;256(1):104-9.

Imai K, Nonoyama S, Ochs HD. WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec;3(6):427-36. Review.

Imai K, Morio T, Zhu Y et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* 2004; 103: 456-464.

Jin Y, Mazza C, Christie JR et al. Mutations of the Wiskott–Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* 2004; 104:4010–9.

Jones LN, Lutskiy MI, Cooley J et al. A novel protocol to identify mutations in patients with wiskott-Aldrich syndrome. *Blood Cells Mol Dis*. 2002 May-Jun;28(3):392-8.

Kirchhausen T. Wiskott-Aldrich syndrome: a gene, a multifunctional protein and the beginnings of an explanation. *Mol Med Today*. 1998 Jul;4(7):300-4. Review.

Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA, Rosen MK. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 2000; 404:151-158.

Kwan SP, Hagemann TL, Blaese RM et al. Scanning of the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene: identification of 18 novel alterations including a possible mutation hotspot at Arg86 resulting in thrombocytopenia, a mild WAS phenotype. *Hum Mol Genet* 1995 Oct;4(10):1995-8

Laskowski TJ, Van Caeneghem Y, Pourebrahim R et al. Gene Correction of iPSCs from a Wiskott-Aldrich Syndrome Patient Normalizes the Lymphoid Developmental and Functional Defects. *Stem Cell Reports*. 2016 Aug 9;7(2):139-48.

Lee WI, Huang JL, Jaing TH et al. Clinical Aspects and Genetic Analysis of Taiwanese Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Mutation: The First Identification of X-Linked Thrombocytopenia in the Chinese with novel mutations. *J Clin Immunol* (2010) 30: 593.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV et al. Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug 18;536(7616):285-91.

Liu DW, Zhang ZY, Zhao Q et al. Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia in China: Clinical characteristic and genotype-phenotype correlation. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62(9):1601-1608.

Lum LG, Tubergen DG, Corash L, Blaese RM. Splenectomy in the management of the thrombocytopenia of the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* 1980; 302:892-6.

Mantadakis E, Sawalle-Belohradsky J, Tzanoudaki M et al. X-linked thrombocytopenia in three males with normal sized platelets due to novel WAS gene mutations. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Dec;61(12):2305-6.

Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann NY Acad Sci* 2013; 1285:26-43.

Moratto D, Giliani S, Bonfim C et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980-2009: an international collaborative study. *Blood*. 2011 Aug 11;118(6):1675-84.

Moulding DA, Record J, Malinova D, Thrasher AJ. Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency. *Immunological Reviews* 2013; 256: 282-299.

Mullen CA, Anderson KD, Blaese RM. Splenectomy and/or bone marrow transplantation in the management of the Wiskott-Aldrich syndrome: long-term follow-up of 62 cases. *Blood* 1993; 82:2961-6.

Notarangelo LD, Ochs HD. Wiskott-Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation. *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):585-91.

Notarangelo LD, Miao CH, Ochs HD. Wiskott–Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 30–36.

Ochs HD. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Isr Med Assoc J.* 2002 May;4(5):379-84. Review.

Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott–Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 725–38.

Ochs HD, Filipovich AH et al. Wiskott–Aldrich syndrome: diagnosis, clinical and laboratory manifestations, and treatment. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 84–90.

Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E et al. Wiskott- Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and co-localizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11351-11356.

Ozsahin H, Cavazzana-Calvo M, Notarangelo LD et al. Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott–Aldrich syndrome: collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2008; 111:439–45.

Park JY, Shcherbina A, Rosen FS, Prodeus AP et al. Phenotypic perturbation of B cells in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Exp Immunol* 2005;139:297-305.

Patel PD, Samanich JM, Mitchel WB, Manwani D. A unique presentation of Wiskott-Aldrich Syndrome in relation to platelet size. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56:1127–1129

Perry GS, Spector BD et al. The Wiskott–Aldrich syndrome in the United States and Canada (1892–1979). *J Pediatr* 1980; 97:72–78.

Qasim W, Gilmour KC et al. Protein assays for diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 2001, 113, 861±865

Raskind WH, Niakan JW et al. Mapping of a syndrome of X-linked thrombocytopenia with thalassemia to band Xp11-12: further evidence of genetic heterogeneity of X-linked thrombocytopenia. *Blood* 2000; 95: 2262-2268

Ryser O, Morell A, Hitzig WH. Primary immunodeficiencies in Switzerland: First report of the national registry in adults and children. *J Clin Immunol* 1988; 8:479–485.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Schwarz K. WASPbase: a database of WAS- and XLT-causing mutations. *Immunol Today*. 1996 Nov;17(11):496-502.

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

Shekhovtsova Z, Bonfim C, Ruggeri A et al. A risk factor analysis of outcomes after unrelated cord blood transplantation for children with Wiskott-Aldrich syndrome. *Haematologica*. 2017;102(6):1112-1119.

Skoric D, Dimitrijevic A, Cuturilo G et al. Wiskott-Aldrich Syndrome with macrothrombocytopenia. Indian Pediatrics 2014;51:1015-1016.

Stenson PD, Mort M, Ball EV et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. Hum Genet. 2017 Jun;136(6):665-677.

Stray-Pedersen A, Abrahamsen TG et al. Primary immunodeficiency diseases in Norway. J Clin Immunol 2000;20:477-85.

Sullivan KE, Mullen CA et al. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. J Pediatr 1994;125:876-885.

Suri D, Singh S, Rawat A et al. Clinical profile and genetic basis of Wiskott-Aldrich syndrome at Chandigarh, north India. Asian Pac J Allergy Immunol 2012;30:71-8

Thrasher AJ, Kinnon C. The Wiskott Aldrich syndrome. Clin Exp Immunol 2000; 120:29.

Thrasher AJ. WASp in immune-system organization and function. Nat Rev Immunol 2002; 2:635–646.

Thrasher AJ. New insights into the biology of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS). Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:132-8.

USIDNET Registry, USIDNET database statistics. Disponível em: <<http://www.usidnet.org>> Acesso em: 19 de março de 2016.

Villa A, Notarangelo L, Macchi P et al. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. Nat Genet 1995;9: 414-417.

Wiskott A. Familiärer, angeborener Morbus Werlhofii? Monatsschr Kinderheilkd 1937;68:212–6.

Wong K, Zhang Z. SNPdryad: Predicting deleterious non-synonymous human SNPs using only orthologous protein sequences. Bioinformatics 2014, 30 (8): 1112-1119.

Yamada M, Ariga T, Kawamura N et al. Determination of carrier status for the Wiskott–Aldrich syndrome by flow cytometric analysis of Wiskott–Aldrich syndrome protein expression in peripheral blood mononuclear cells. J Immunol 2000;165:1119–1122.

Yamaguchi K, Ariga T, Yamada M, et al. Mixed chimera status of 12 patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) after hematopoietic stem cell transplantation: evaluation by flow cytometric analysis of intracellular WAS protein expression. Blood. 2002;100(4):1208-1214

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012 Jun 18;13:134.

Yoonessi L, Randhawa I, Nussbaum E et al. Wiskott-Aldrich Syndrome: Description of a new gene mutation with normal platelet volume. J Pediatr Hematol Oncol 2015; 37:515–518

Zhang ZY, Xiao HQ, Jiang LP et al. Analysis of clinical and molecular characteristics of Wiskott-Aldrich syndrome in 24 patients from 23 unrelated Chinese families. Pediatr Allergy Immunol 2010; 21: 522-532.

Zhu Q, Watanabe C, Liu T, Hollenbaugh D et al. Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype. Blood 1997 Oct 1;90(7):2680-9.

7.ANEXOS

ANEXO A:

Protocolo Clínico

Nome:

Sexo:

Etnia:

Data nascimento:

SERVIÇO DE ORIGEM:

MÉDICO RESPONSÁVEL:

IDADE NO INÍCIO DO ACOMPANHAMENTO NO HCRP-USP OU SERVIÇO DE ORIGEM:

IDADE AO INÍCIO DAS MANIFESTAÇÕES:

IDADE AO DIAGNÓSTICO:

TEMPO DE SEGUIMENTO:

IDADE GESTACIONAL: () PRETERMO

() TERMO

REPOSIÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS:

Não ()

Sim () Idade ao início:

Dose e intervalo:

Tempo de uso:

Reações adversas:

USO DE ANTIBIOTICOPROFILAXIA:

Não ()

Sim () Qual antibiótico e por quanto tempo:

PESO NA PRIMEIRA AVALIAÇÃO: (colocar percentil)

ESTATURA NA PRIMEIRA AVALIAÇÃO: (colocar percentil)

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS INFECCIOSAS:

1. Número de infecções durante a vida:

OMAs () Agentes isolados:

Sinusites () Agentes isolados:

Pneumonias não complicadas () Agentes isolados:

Pneumonias complicadas com derrame pleural ou pneumatocele () Agentes isolados:

Celulites () Agentes isolados:

Impetigos () Agentes isolados:

Abscessos () Agentes isolados:

Meningo-encefalites () Agentes isolados:

Sepses () Agentes isolados:

Osteoartrites () Agentes isolados:

Diarréias () Agentes isolados:
Infecções por herpes () Localização:
Infecções por fungos: () Localização:

2. Número de infecções no último ano:

OMAs () Agentes isolados:
Sinusites () Agentes isolados:
Pneumonias não complicadas () Agentes isolados:
Pneumonias complicadas com derrame pleural ou pneumatocele () Agentes isolados:
Celulites () Agentes isolados:
Impetigos () Agentes isolados:
Abscessos () Agentes isolados:
Meningo-encefalites () Agentes isolados:
Sepses () Agentes isolados:
Osteoartrites () Agentes isolados:
Diarréias () Agentes isolados:
Infecções por herpes () Localização:
Infecções por fungos: () Localização:

3. Manifestações não infecciosas:

Hipoacusia: sim () não ()
Sequelas neurológicas: sim () não ()
Pneumatocelos: sim () não ()
Derrame pleural: sim () não ()
Bronquiectasias: sim () não ()
Eczema: sim () não ()
Manifestações hemorrágicas: sim () não () Quais: A partir de qual idade:
Necessidade de transfusão sanguínea: sim () não () Quantas vezes:

4. Necessidade de antibioticoterapia venosa:

Não ()
Sim () Quantas vezes e quais as causas?

5. Hospitalizações em enfermaria ou UTI:

Não ()
Sim () Quantas vezes e quais as causas?

6. Reações adversas graves às vacinas: (OBS: excetuando-se febre e reações locais)

Sim () Que tipos de reações e a qual vacina?
Não ()

CO-MORBIDADES NÃO INFECCIOSAS ASSOCIADAS:

1. Doenças auto-imunes:

Sim () tipos: A partir de qual idade:

Não ()

2. Endocrinopatias:

Sim () tipos: A partir de qual idade:

Não ()

3. Doenças alérgicas:

Sim () tipos: A partir de qual idade:

Não ()

4. Doenças intestinais:

Sim () tipos: A partir de qual idade:

Não ()

5. Doenças onco-hematológicas:

Sim () tipos: A partir de qual idade:

Não ()

6. Outras:

ANTECEDENTES FAMILIARES PARA IMUNODEFICIÊNCIA:

1. CONSANGÜINIDADE: Sim () Não ()

2. ÓBITO PRECOCE POR INFECÇÃO: Sim () Não ()

3. OUTROS CASOS DA IMUNODEFICIÊNCIA NA FAMÍLIA: Sim () Não ()

EXAMES LABORATORIAIS:

1. Hemograma (o mais representativo e de preferência o primeiro)

2. Microplaquetas: sim () não ()

3. Testes de hipersensibilidade imediata e/ou IgE específica:

4. Dosagem de imunoglobulinas:

IgG:

IgM:

IgA:

IgE total:

5. Dosagem de subclasses de IgG:

IgG1:

IgG2:

IgG3:

IgG4:

6. Dosagem de anticorpos anti-pneumococos:

Data	PS 1	PS 3	PS 5	PS 6B	PS 9V	PS 14
	Pré					
	Pós					

OU								
Data	PS 4	PS 6B	PS 9V	PS 14	PS 18C	PS 19F	PS 23F	
	Pré							
	Pós							

7. Imunofenotipagem:

CD3:
CD4:
CD8:
CD19:
CD16/56:

8. Titulação de isohemaglutininas (IgM):

9. Sorologia (IgG) para rubéola:

10. Sorologia (IgG) para hepatite B:

ANEXO B:

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: *Características clínicas e genéticas de pacientes brasileiros com a Síndrome de Wiskott-Aldrich*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Maria Eduarda Pontes Cunha de Castro

INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS DA PESQUISA:

Pedimos sua autorização para que seu filho(a) participe da pesquisa sobre a Síndrome de Wiskott Aldrich (SWA). A SWA é uma síndrome rara que acomete o sistema imunológico que pode afetar crianças do sexo masculino e é grave se não for tratada. O objetivo deste trabalho é investigar alterações nas informações genéticas para auxiliar no diagnóstico definitivo da doença para a busca de melhores tratamentos.

Você não terá nenhum gasto participando dessa pesquisa. O seu filho(a) será submetido à coleta de sangue sendo apenas um tubo de sangue com volume de 4 mL. A coleta ocorrerá no momento em que o paciente for submetido à coleta de exames de rotina referentes ao tratamento. O paciente poderá sentir mal estar e leve tontura durante a coleta. Não será necessário nenhum procedimento extra (coleta de sangue adicional, cirurgias, biópsias, raio-X, etc) para a elaboração deste projeto, não trazendo nenhum risco ou sofrimento adicional.

As amostras deste estudo farão parte do Banco de Amostras do Serviço de Alergia e Imunologia (Departamento de Puericultura e Pediatria) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, conforme Termo de Consentimento de Guarda de material assinado (Aprovação segundo o processo: 11541/2010) e ficarão armazenadas no referido Banco de Amostras após a realização do estudo. Durante a realização desta pesquisa não haverá nenhum custo para os familiares das crianças que estejam participando da mesma.

Esta pesquisa também não oferecerá nenhum risco adicional ao seu tratamento. Fica garantido o sigilo dos seus dados pessoais utilizados para este estudo. Se você aceitar participar, todas as suas dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você queira desistir da sua participação durante a pesquisa, não haverá nenhum problema e o tratamento que você estava fazendo antes continuará da mesma forma, sem qualquer prejuízo. Os resultados obtidos neste estudo estarão a sua disposição e o meu telefone está escrito ao final desta folha. Caso julgue necessário, você poderá me ligar a qualquer hora para resolver as suas dúvidas.

EU, _____,
abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “**Correlação entre mutações do gene WAS e características fenotípicas na Síndrome de Wiskott Aldrich**”, que tem como pesquisador responsável a Dra. Maria Eduarda Pontes Cunha de Castro, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Assinatura do responsável pelo paciente

Pai do paciente / Representante legalmente autorizado (*ou seja, responsável legal, tutor, ou procurador para os cuidados de saúde do paciente*)

Nome (LETRA DE FORMA)

Parentesco: _____

Assinatura do pesquisador responsável pela pesquisa

Prof. Dr. Pésio Roxo Júnior / Dra. Maria Eduarda P. C. de Castro
Telefone para contato: (16) 3602-2651

ANEXO C:

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 08 de fevereiro de 2012

Ofício nº 426/2012
CEP/MGV

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **"CORRELAÇÃO ENTRE MUTAÇÕES DO GENE WAS E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS NA SÍNDROME DE WISKOTT ALDRICH"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 339ª Reunião Ordinária realizada em 06/02/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 10483/2011.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
VANESSA DA SILVA SILVEIRA
Depto. de Puericultura e Pediatria

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733/IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br