



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

SAMUEL DE SOUZA MEDINA

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM A  
SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH

CAMPINAS

2016

SAMUEL DE SOUZA MEDINA

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM A  
SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na  
Área de Concentração em Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARGARETH CASTRO OZELO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO  
ALUNO SAMUEL DE SOUZA MEDINA, E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. MARGARETH CASTRO OZELO.

CAMPINAS

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M468c Medina, Samuel de Souza, 1983-  
Caracterização clínica e molecular de pacientes com a Síndrome de Wiskott-Aldrich / Samuel de Souza Medina. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Margareth Castro Ozelo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndrome de Wiskott-Aldrich. 2. Trombocitopenia. 3. Síndromes de imunodeficiência. I. Ozelo, Margareth Castro, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Clinical and molecular characterization of patients with the Wiskott-Aldrich Syndrome

**Palavras-chave em inglês:**

Wiskott-Aldrich syndrome

Thrombocytopenia

Immunologic deficiency syndromes

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestre em Ciências

**Banca examinadora:**

Margareth Castro Ozelo [Orientador]

Mariana Lazarini

Adriana Gut Lopes Ricetto

**Data de defesa:** 29-08-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**SAMUEL DE SOUZA MEDINA**

---

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARGARETH CASTRO OZELO**

---

## **MEMBROS:**

**1. PROFA. DRA. MARGARETH CASTRO OZELO**

**2. PROFA. DRA. MARIANA LAZARINI**

**3. PROFA. DRA. ADRIANA GUT LOPES RICETTO**

---

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 29/08/2016**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais José Alcides e Zuleide e ao meu irmão Daniel, que sempre estiveram ao meu lado, a cada etapa vencida da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da minha vida e por conceder a todos os seres humanos a oportunidade de conhecer a verdade através da fé e da ciência.

Aos meus pais José Alcides e Zuleide, que me ensinaram, sobretudo com seu exemplo, o valor dos estudos e da dedicação ao próximo.

Ao meu irmão Daniel, por ser meu companheiro incondicional, amigo de todos os momentos e ajuda infalível nas horas difíceis.

A todos os meus amigos do colégio, da faculdade, da residência, do trabalho e da igreja, que sempre estiveram ao meu lado, colaborando com meu trabalho, ajudando nas horas difíceis, torcendo por mim e comemorando minhas vitórias. Sem eles o caminho certamente seria muito mais difícil.

Aos pacientes que participaram deste estudo, seus familiares e a todos os pacientes com os quais tive a alegria de conviver, que sempre me mostram o caminho que devo seguir na minha profissão.

A todos os professores que tive até hoje, do jardim da infância à pós-graduação, pelo exemplo de dedicação e por terem me mostrado o caminho do conhecimento.

Aos alunos do curso de graduação em medicina e aos residentes de clínica médica e de hematologia e hemoterapia da FCM-Unicamp, particularmente aos alunos da 49ª turma de graduação em medicina da Unicamp, dos quais tenho a honra de ser professor homenageado, por me incentivarem a persistir no aprimoramento contínuo e por retribuírem de maneira tão afetuosa o esforço de ensinar.

À minha amiga Lúcia Helena Siqueira, por sua disponibilidade e competência técnico-científica, que ajudaram a tornar possível este trabalho.

À minha amiga e orientadora Profa. Dra. Margareth Castro Ozelo, que me presenteou com sua confiança e com a oportunidade de trabalhar na área que mais gosto.

## RESUMO

A síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) é uma rara imunodeficiência primária de herança recessiva ligada ao cromossomo X, caracterizada por trombocitopenia, microplaquetas, eczema, infecções recorrentes e risco aumentado de doenças autoimunes e neoplasias. É causada por mutações no gene *WAS*, que codifica a proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), expressa predominantemente em células hematopoiéticas e responsável por desempenhar um importante papel na reorganização do citoesqueleto de actina e na sinalização celular. As mutações no gene *WAS* podem ter vários efeitos sobre o nível de expressão da proteína, o que, por sua vez, se correlaciona com a gravidade da doença. Algumas mutações no gene *WAS* podem também estar associadas a outras manifestações mais leves, como a trombocitopenia ligada ao X (XLT) e a neutropenia ligada ao X (XLN). Considerando que o único tratamento curativo disponível atualmente para a WAS é o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, que é associado a considerável morbimortalidade, uma melhor caracterização clínica e molecular dos pacientes portadores da WAS pode contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes e para a adequada estratificação dos pacientes, possivelmente influenciando a tomada de decisões terapêuticas. Neste estudo, nós realizamos a pesquisa molecular de 16 casos com suspeita clínica da WAS ou XLT e confirmamos o diagnóstico de WAS em 7 deles. Em dois casos foi confirmado o diagnóstico de XLT. Também analisamos a expressão da WASP em leucócitos de sangue periférico nos 2 casos com o diagnóstico de XLT e em 3 dos 7 casos com o diagnóstico da WAS. Todos apresentaram expressão reduzida da WASP em relação ao controle normal. Os pacientes foram classificados com base nas informações clínicas da seguinte maneira: um recebeu escore clínico de 1; dois receberam o escore 2; três receberam escore 3 e três receberam escore 4. Foram identificadas neste grupo de pacientes um total de 9 mutações no gene *WAS*, sendo 3 mutações do tipo *missense*, 4 mutações *nonsense* e 2 mutações com alteração em sítio de *splicing*. Das 9 mutações encontradas, 4 não haviam sido descritas previamente na literatura:

c.1040delA no exon 10, que resultou na alteração p.Lys336ArgfsX108 (*nonsense*); c.207C>T e c.233delC no exon 2, que resultaram respectivamente na troca p.Pro58Leu (*missense*) e na alteração do frame de leitura, com stop códon prematuro p.Asn78AsnfsX48 (*nonsense*); e c.743\_746delAT no exon 7, que resultou na alteração p.Asp237AspfsX21 (*nonsense*). Nos dois pacientes que receberam o diagnóstico de XLT foram encontradas mutações *missense* localizadas na porção *upstream* do gene *WAS* (exon 2). Já entre os 7 pacientes com diagnóstico confirmado de WAS, apenas dois apresentaram mutações do tipo *nonsense* na região *upstream* do gene *WAS*, enquanto todos os outros apresentaram mutações do tipo *missense*, *nonsense* e em sítio de *splicing* localizadas na porção *downstream* do gene *WAS* (a partir do exon 4). Desta maneira, os achados deste estudo estão de acordo com os autores que afirmam que as manifestações mais leves da síndrome estão associadas com mutações *missense* nos exons 1 e 2 do gene que codifica a proteína WASP, enquanto as manifestações mais graves são causadas por mutações em outras regiões do gene, ocorrendo predominantemente na sua metade *downstream*.

Palavras-chaves: Síndrome de Wiskott-Aldrich. Trombocitopenia. Síndromes de Imunodeficiência.

## ABSTRACT

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a rare primary immunodeficiency with X-linked recessive inheritance, characterized by thrombocytopenia, small platelets, eczema, recurrent infections and increased risk of autoimmune diseases and cancer. It is caused by mutations in the gene coding for the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), predominantly expressed in hematopoietic cells and responsible to play an important role in reorganization of actin cytoskeleton and cell signaling. Mutations in the *WAS* gene can alter the level of protein expression, which correlates with disease severity. Some mutations in *WAS* gene may also be associated with other milder manifestations, such as X-linked thrombocytopenia (XLT) and X-linked neutropenia (XLN). Whereas the only currently available curative treatment for WAS is allogeneic hematopoietic stem cells transplantation, which is associated with considerable morbidity and mortality, a better clinical and molecular characterization of patients with WAS can contribute to the understanding of the underlying pathophysiological mechanisms and for proper stratification of patients possibly influencing decision-making in the therapeutic setting. In this study, we performed molecular analysis of 16 patients with clinical suspicion of WAS or XLT and confirmed the diagnosis of WAS in 7 of them. In 2 cases the diagnosis of XLT was confirmed. We also analyzed the expression of WASP in peripheral blood leukocytes in both patients with the diagnosis XLT and in 3 out of 7 patients with the diagnosis of the WAS. All of them showed reduced expression of WASP compared to normal control. Patients were categorized based on clinical information as follows: one received clinical score 1, two received score 2, three received score 3, and three received score 4. A total of 9 mutations in the *WAS* gene have been identified in this group of patients: 3 missense mutations, 4 nonsense mutations and 2 splice site mutations. Among the 9 mutations found, 4 had never been previously described in literature: c.1040delA in exon 10, which resulted in a premature stop codon p.Lys336ArgfsX108 (nonsense); c.207C>T and c.233delC in exon 2, resulting respectively in an aminoacid change p.Pro58Leu (missense), and in a frameshift with a premature stop codon p.Asn78AsnfsX48 (nonsense); and c.743\_746delAT

in exon 7, resulting in the change p.Asp237AspfsX21 (nonsense). Both patients with XLT presented missense mutations located in the upstream portion of the *WAS* gene (exon 2). Among the 7 patients with confirmed diagnosis of WAS, only two of them showed nonsense mutations in the upstream region of the *WAS* gene, while all the others had missense, nonsense and splice site mutations located in the downstream portion of the *WAS* gene (from exon 4 and beyond). Thus, the findings of this study agree with the authors who claim that milder forms of the syndrome are associated with missense mutations in exons 1 and 2 of the *WAS* gene, while the most severe manifestations are caused by mutations in other regions of the gene, predominantly occurring in its downstream half.

Key words: Wiskott-Aldrich Syndrome. Thrombocytopenia. Immunologic Deficiency Syndromes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema da estrutura da WASP .....	17
<b>Figura 2.</b> Esquema das interações e ativação da WASP .....	18
<b>Figura 3.</b> Esquema das principais alterações nas células hematopoiéticas em decorrência do defeito da expressão da WASP .....	22
<b>Figura 4.</b> Estruturas tridimensionais das proteínas WASP mutantes preditas pelo software PyMOL para cada um dos 8 casos que tiveram as mutações do gene WAS identificadas neste estudo .....	34
<b>Figura 5.</b> Correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes com WAS e XLT incluídos neste estudo .....	37
<b>Figura 6.</b> Descrição do paciente #1 .....	40
<b>Figura 7.</b> Descrição do paciente #11 .....	41
<b>Figura 8.</b> Algoritmo de investigação da síndrome de Wiskott-Aldrich e doenças correlatas .....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Escore clínico utilizado para classificação da síndrome de Wiskott-Aldrich e suas variações .....	20
<b>Tabela 2.</b> <i>Primers</i> para a análise do DNA genômico do gene <i>WAS</i> .....	26
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> para a análise do DNA genômico do gene <i>WIPF1</i> .....	27
<b>Tabela 4.</b> <i>Primers</i> para a análise do DNA complementar do gene <i>WAS</i> .....	28
<b>Tabela 5.</b> Características clínicas dos pacientes com suspeita da síndrome de Wiskott-Aldrich incluídos neste estudo .....	32
<b>Tabela 6.</b> Relação das mutações encontradas no gene <i>WAS</i> .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BRAGID</b>	Grupo Brasileiro de Imunodeficiências
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GBD</b>	Domínio de ligação a GTPases
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IVAS</b>	Infecção de vias aéreas superiores
<b>iXLT</b>	Trombocitopenia ligada ao X intermitente
<b>ND</b>	Não determinado
<b>NK</b>	Linfócitos <i>natural killers</i>
<b>NR</b>	Não realizado
<b>nTreg</b>	Células T regulatórias de ocorrência natural
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PH</b>	Domínio de homologia a pleckstrina
<b>PTI</b>	Trombocitopenia imune
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TCTH</b>	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
<b>VPM</b>	Volume plaquetário médio
<b>WAS</b>	Síndrome de Wiskott-Aldrich
<b>WAS</b>	Gene que codifica a proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich
<b>WASP</b>	Proteína da Síndrome de Wiskott-Aldrich
<b>WIP</b>	<i>WASP-interacting protein</i>
<b>WIPF1</b>	Gene que codifica a <i>WASP-interacting protein</i>
<b>XLN</b>	Neutropenia ligada ao X
<b>XLT</b>	Trombocitopenia ligada ao X

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1. Síndrome de Wiskott-Aldrich: genética e patogênese .....	16
1.2. Correlação entre o genótipo e o fenótipo na WAS .....	18
1.3. Alterações do sistema imune observadas na WAS .....	20
2. OBJETIVOS .....	23
2.1. Objetivo Geral .....	23
2.2. Objetivos específicos .....	23
3. CASUÍSTICA .....	23
4. MÉTODOS .....	24
4.1. Avaliação clínica dos pacientes .....	24
4.2. Quantificação da expressão da WASP por citometria de fluxo .....	24
4.3. Análise das sequências nucleotídicas dos genes <i>WAS</i> e <i>WIPF1</i> .....	25
5. RESULTADOS .....	30
5.1. Caracterização clínica dos pacientes estudados .....	30
5.2. Mutações encontradas no gene <i>WAS</i> .....	33
5.3. Análise da expressão da WASP em leucócitos do sangue periférico .....	36
5.4. Correlação entre o genótipo e o fenótipo dos casos confirmados de XLT e de WAS .....	36
5.4.1. Descrição detalhada dos casos diagnosticados com trombocitopenia ligada ao cromossomo X (XLT) .....	37
6. DISCUSSÃO .....	42
7. CONCLUSÃO .....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
9. ANEXOS .....	51
ANEXO 1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa .....	51
ANEXO 2. Termo de consentimento livre e esclarecido .....	55
ANEXO 3. Artigo submetido para publicação .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

O gene *WAS* codifica a proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), que é expressa predominantemente em células hematopoiéticas e é responsável por desempenhar um importante papel na reorganização do citoesqueleto de actina e na sinalização celular. As mutações no gene *WAS* podem ter vários efeitos sobre o nível de expressão da proteína, o que, por sua vez, se correlaciona com a gravidade da doença. A síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) é uma destas manifestações, apresentando-se como uma rara imunodeficiência primária de herança recessiva ligada ao cromossomo X; algumas mutações no gene *WAS* podem também estar associadas a outras manifestações mais leves, como a trombocitopenia ligada ao X (XLT) e a neutropenia ligada ao X (XLN).

A síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), forma mais grave associada a estas mutações é uma imunodeficiência primária rara, ligada ao cromossomo X, que afeta aproximada de 1 em cada 1.000.000 de homens nascidos vivos (1), com expectativa de vida de cerca de 15 anos nos casos graves (2). Esta síndrome afeta tanto a imunidade celular como humoral, predispondo os pacientes afetados a infecções recorrentes devido a imunodeficiência, além de causar eczema, microtrombocitopenia (plaquetas com contagem reduzida e de pequeno tamanho), maior susceptibilidade a neoplasias e complicações decorrentes de autoimunidade (3).

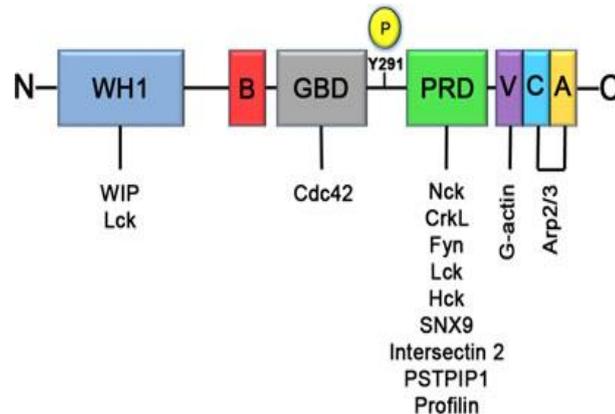
A WAS ocorre devido alteração na expressão da proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), uma proteína reguladora da organização do citoesqueleto de actina, predominantemente expressa nas células hematopoiéticas. Cerca de 50% dos pacientes com mutações no gene que codifica a proteína WASP tem o fenótipo clássico de WAS, que resulta da ausência da expressão da WASP e é caracterizado por infecções recorrentes, microtrombocitopenia, eczema, autoimunidade e neoplasias (4, 5). Outros 50% tem o fenótipo de trombocitopenia ligada ao X (XLT), decorrente da redução, mas não da ausência da expressão da proteína, e caracterizado principalmente por trombocitopenia eventualmente associada a eczema e imunodeficiência mais leves (6, 7). Uma terceira doença denominada neutropenia ligada ao X (XLN), caracterizada por neutropenia e mielodisplasia variável, foi atribuída a

mutações ativadoras no domínio de ligação a GTPases (GBD) da WASP (8-10). A XLN é muito rara, tendo sido descritas apenas em 4 famílias até o momento (11).

### 1.1. Síndrome de Wiskott-Aldrich: genética e patogênese

Os primeiros relatos da WAS datam da primeira metade do século XX, quando Alfred Wiskott descreveu três irmãos com microtrombocitopenia, diarreia sanguinolenta, eczema, episódios de febre e otites de repetição. Como as suas irmãs não eram afetadas, ele concluiu que aqueles meninos tinham uma nova trombopatia hereditária e não plaquetopenia imune (12). Alguns anos mais tarde, Robert Aldrich relatou uma família em que dezesseis de quarenta homens eram acometidos por uma doença com o mesmo fenótipo clínico descrito por Wiskott, evidenciando um padrão de herança ligado ao cromossomo X (13).

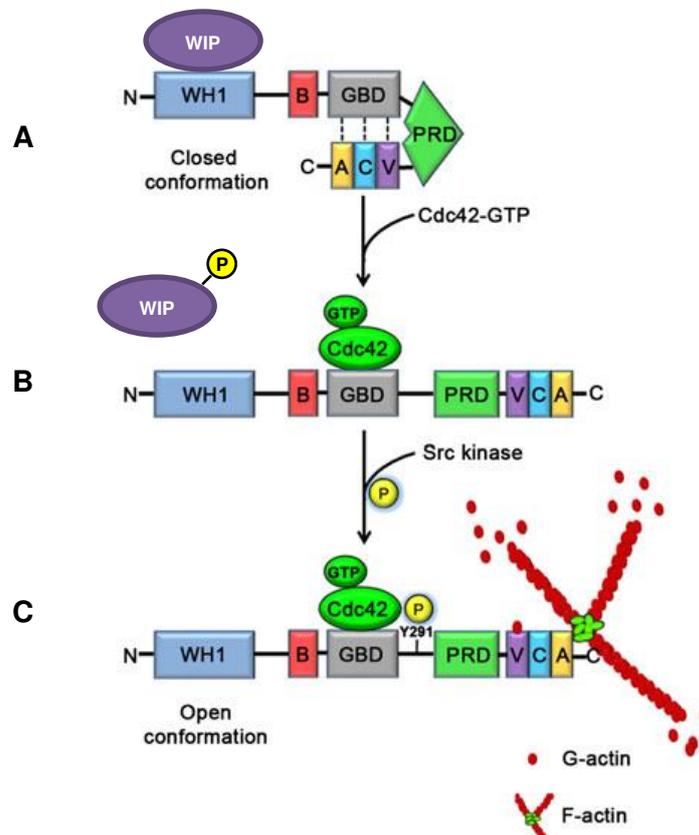
O gene *WAS* foi clonado e sequenciado em 1994 (14). Identificado no cromossomo X (posição Xp11.22-p11.23), ele tem 12 exons, contendo 1.823 pares de bases e codifica uma proteína WASP de 502 aminoácidos, predominantemente expressa no citoplasma das células hematopoiéticas. A WASP contém 5 diferentes regiões, conforme ilustrado na figura 1: o domínio WH1 que interage com a WIP, protegendo a WASP da degradação e regulando negativamente a função do domínio VCA; a região B, que estabiliza a conformação autoinibitória da WASP; o domínio GBD, com capacidade de se ligar a proteínas da família das Rho GTPases; o domínio rico em prolinas, com *motifs* de ligação a SH3, que abriga os locais das principais mutações causadoras de XLN; e o domínio VCA que inclui os domínios de homologia a verprolina e a cofilina, e a região acídica C-terminal que está envolvida com a reorganização do citoesqueleto de actina, através da ativação da polimerização da actina mediada pelo complexo Arp2/3 (figura 1) (15, 16).



**Figura 1. Esquema da estrutura da WASP.** Representação dos domínios da WASP e sua interação com as demais proteínas. (Adaptado de Matalon *et al.* Immunol Reviews 2013).

A região N-terminal da WASP se liga à proteína WIP (*WASP-interacting protein*), de modo que em linfócitos não ativados ambas encontram-se constitutivamente e quase completamente complexadas, estabilizando a conformação inativa da WASP (17, 18). A WIP é fosforilada a partir da ligação do receptor de antígeno da célula T, resultando em dissociação da WASP do complexo WIP/WASP, permitindo a ativação da WASP pela Cdc42, que leva à polimerização e estabilização dos filamentos de actina (19). A figura 2 esquematiza a ativação da WASP. Sabe-se que a expressão adequada da WIP é necessária para a expressão funcional da WASP em células humanas, já que a ligação à WIP é essencial para a estabilidade da WASP, o que justifica o quadro de imunodeficiência com as mesmas características da WAS decorrente da deficiência de WIP, que foi descrito em 2012 numa paciente do sexo feminino de origem italiana(20).

As cerca de trezentas mutações descritas que podem acometer o gene *WAS* resultam numa ampla gama de gravidade da doença. As mutações mais frequentes são do tipo *missense*, seguidas por mutações em sítios de *splicing*, deleções, mutações *nonsense*, inserções e mutações complexas(1, 21).



**Figura 2. Esquema das interações e ativação da WASP.** (A) Na célula inativada a WASP adota sua conformação fechada de autoinibição, através da interação intramolecular dos domínios GBD e VCA. (B) Após a ligação da Cdc42-GTP no domínio GBD ocorre a liberação da WASP de sua conformação de autoinibição. (C) A WASP na região Y291 é fosforilada pela Src kinase, que ativa completamente a WASP permitindo sua associação com o complexo Arp2/3, que promoverá a polimerização da actina nas células. (Adaptado de Matalon *et al.* Immunol Reviews 2013).

## 1.2. Correlação entre o genótipo e o fenótipo na WAS

A observação da ampla variedade de quadros clínicos decorrentes das mutações no gene *WAS*, associada ao fato de que a proteína apresenta uma estrutura complexa formada por vários domínios, levou um grande número de investigadores a especular acerca da correlação entre o fenótipo clínico e o genótipo apresentado pelos pacientes.

Em 1996, um estudo alemão (22) e outro estudo canadense (23) não mostraram associação entre o fenótipo e o genótipo nas populações estudadas. O primeiro realizou uma análise mutacional no gene *WAS* em 19 famílias de ascendência alemã, suíça e turca, tendo concluído que, apesar da concentração de grande parte das mutações *missense* nos primeiros 4 exons do gene, não havia uma clara correlação genótipo-fenótipo quando se comparava as

mutações encontradas com as manifestações clínicas dos pacientes. O segundo, de maneira similar, ao estudar 24 pacientes com WAS concluiu não ser possível inferir o prognóstico dos pacientes a partir do genótipo, porque pacientes com o mesmo tipo de mutação podiam apresentar quadros clínicos de gravidade muito distinta.

Por outro lado, em estudo publicado em 1997 (24), numa população de 48 famílias com WAS, as mutações *missense* afetando o domínio PH (exons 1 a 3) da WASP inibiam funções menos importantes da proteína, enquanto mutações *missense* afetando o exon 4 e mutações complexas afetando a porção 3' do gene *WAS* interferiam com funções cruciais da proteína e causavam o quadro clássico da WAS. Também Imai K et al. em 2004 caracterizaram as mutações no gene *WAS* em 50 pacientes japoneses e analisaram o fenótipo e o curso clínico de cada um (2). Nesse estudo, o fenótipo clínico dos pacientes com WAS correlacionou-se com a ausência ou a presença da WASP, evidenciando uma forte correlação entre o fenótipo e o genótipo e demonstrando que a expressão da proteína é uma ferramenta útil para prever o prognóstico dos pacientes e deve ser levada em consideração na escolha da terapêutica.

A severidade da doença foi avaliada e classificada inicialmente por Zhu et al. (24) e posteriormente modificada (1, 25), conforme reportada esquematicamente na tabela 1.

Os escores 1 a 2 são observados nas formas mais leves da doença. Na XLT muitas vezes é observada apenas microtrombocitopenia (escore 1), podendo estar associada a eczema localizado e ocasionalmente a infecções respiratórias (escore 2). Pacientes que apresentam microtrombocitopenia associada a eczema persistente ou a quadros de infecções recorrentes responsivas à terapia recebem escore 3, enquanto o escore 4 é considerado quando o eczema ou infecções não apresentam resposta adequada ao tratamento. O escore 5 é considerado quando o paciente desenvolve autoimunidade ou neoplasia (25).

**Tabela 1.** Escore clínico utilizado para classificação da síndrome de Wiskott-Aldrich e suas variações (1, 24, 25).

Escore clínico	iXLT	XLT		WAS		
	< 1	1	2	3	4	5
Trombocitopenia	- / +	+	+	+	+	+
Microplaquetas	+	+	+	+	+	+
Eczema	-	-	(+)	+	++	(+) / + / ++
Imunodeficiência	-	- / (+)	(+)	+	+	(+) / +
Infecções	-	-	(+)	+	+ / ++	(+) / + / ++
Autoimunidade ou neoplasia	-	-	-	-	-	+

Escore: -, ausente; (+), leve; + presente; ++ presente e grave  
iXLT, trombocitopenia intermitente ligada ao cromossomo X; XLT, trombocitopenia ligada ao cromossomo X; WAS, síndrome de Wiskott-Aldrich.

### 1.3. Alterações do sistema imune observadas na WAS

A WASP é fundamental na transdução de sinais da superfície celular para o citoesqueleto de actina. A falta da WASP resulta em defeitos no citoesqueleto das células hematopoiéticas que comprometem vários aspectos da atividade celular normal, incluindo proliferação, fagocitose, formação de sinapses imune, adesão e migração das células (26).

A ausência ou deficiência da WASP causa de maneira geral defeitos em todas as células envolvidas no sistema imune, além das alterações numéricas e morfológicas observadas nas plaquetas que resultam em maior tendência hemorrágica. A figura 3 traz um esquema com os principais defeitos celulares já descritos decorrentes da deficiência da WASP e suas consequências clínicas.

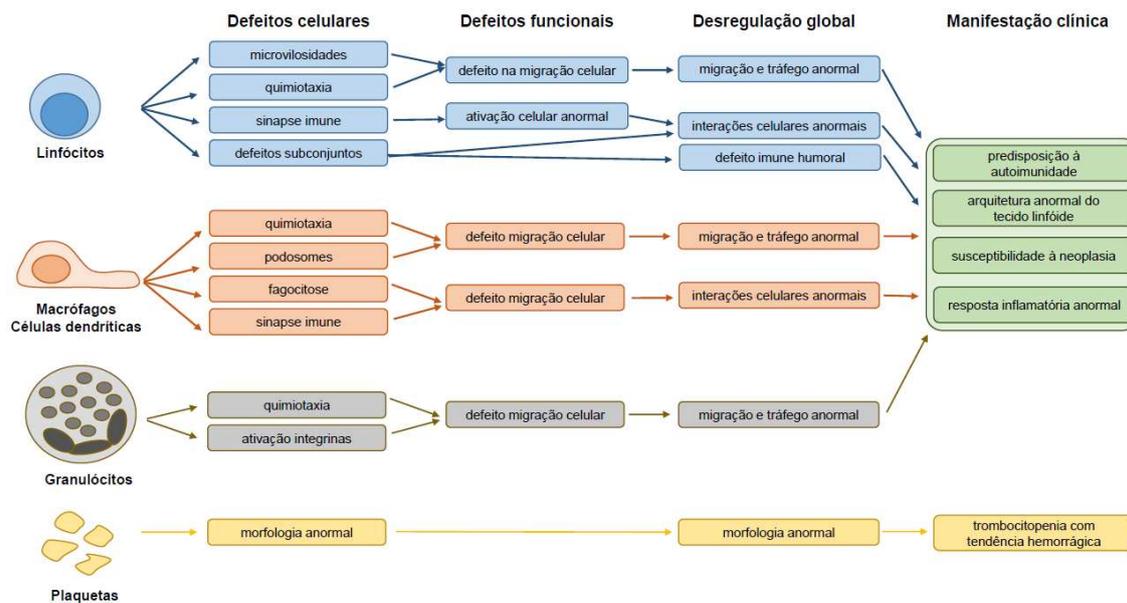
Na WAS é observada uma redução no número de linfócitos circulantes. No caso dos linfócitos T há comprometimento na sinapse imune e na ativação dos linfócitos T dependente do receptor de célula T (TCR). Observa-se ainda que a atividade citotóxica das células T CD8+ e *Natural Killers* (NK) estão prejudicadas (27). Os linfócitos B apresentam defeito na motilidade, adesão e migração decorrentes da falta da WASP. No caso das células dendríticas e macrófagos há comprometimento na formação de pseudópodes e de sua motilidade, prejudicando as funções de fagocitose, quimiotaxia e migração celular. Na WAS os neutrófilos apresentam defeitos de adesão e migração (26).

Entre os pacientes com WAS é descrita a ocorrência de manifestações

autoimunes em até 22 a 72% dos pacientes (27). A manifestação mais comum é a anemia hemolítica autoimune, seguida por vasculite, artrite, neutropenia, doença inflamatória intestinal e nefropatia por IgA (2, 28). Muitos grupos têm explorado as alterações funcionais das células do sistema imune nesta doença, explicando parcialmente como os defeitos celulares podem levar a patologia. No entanto, os mecanismos envolvidos com a ocorrência de manifestações autoimunes ainda não foram descritos claramente.

Possivelmente, um dos mecanismos envolvidos na autoimunidade observada na WAS estaria relacionado com a quebra da tolerância central ou periférica para os antígenos próprios (*self*). As células T regulatórias de ocorrência natural (nTreg) são fundamentais para manter a tolerância aos antígenos próprios e suprimir a resposta imune excessiva. Os linfócitos nTreg dependem para seu desenvolvimento e função da sinalização dos receptores de célula T (TCR), juntamente com o recrutamento de CD28, expressão de FOXP3 e presença de interleucina (IL) 2 (29). É sugerido que um defeito das células nTreg em suprimir os linfócitos T efetores esteja envolvido com a ocorrência das manifestações autoimunes nos casos de WAS (27).

Com relação aos neutrófilos, já foi demonstrado que WASP é importante no controle da polaridade dos neutrófilos, um processo crucial para a adequada migração dos neutrófilos para os tecidos infectados. WASP age como efetora da Rho GTPase Cdc42, regulando a reorganização da integrina CD11b, que, por sua vez, recruta a proteína EB1 dos microtúbulos, capturando e estabilizando os microtúbulos (30). O comprometimento desta função dos neutrófilos na WAS contribui para o grave defeito da imunidade inata que se observa nesses pacientes, facilitando a ocorrência do fenótipo de infecções recorrentes.



**Figura 3. Esquema das principais alterações nas células hematopoiéticas em decorrência do defeito da expressão da WASP.** (Adaptado de Blundell *et al.*, Disease Markers, 2010).

Considerando que o único tratamento curativo disponível atualmente para a WAS é o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico, que é associado a uma considerável morbidade e mortalidade, acreditamos que uma melhor caracterização clínica e molecular dos pacientes portadores desta síndrome pode contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes e para a adequada estratificação dos pacientes, possivelmente influenciando a tomada de decisões terapêuticas. A identificação molecular também deve ser considerada sob a perspectiva que, em um futuro próximo, terapias gênicas podem fazer parte do armamentário terapêutico para estas doenças.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste estudo foi realizar a investigação diagnóstica dos pacientes com suspeita de WAS, bem como avaliar a associação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes portadores desta síndrome.

### **2.2. Objetivos específicos**

- a) Determinar entre os casos com suspeita clínica da WAS e suas variantes (XLT e XLN), a expressão da proteína WASP em leucócitos de sangue periférico e determinar o genótipo relacionado com a ocorrência da doença nesses pacientes, através do sequenciamento do gene *WAS* e, quando pertinente, também do gene *WIPF1*.
- b) Investigar a associação entre a mutação encontrada, o nível de expressão da respectiva proteína nos leucócitos do sangue periférico e as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes.

## **3. CASUÍSTICA**

Foram convidados a participar deste estudo pacientes com diagnóstico ou suspeita clínica da WAS. Foi solicitado o consentimento de um dos pais ou representante legal, através da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (parecer número 496.796 de 23/12/2013).

Participaram desse estudo pacientes provenientes do ambulatório de imunologia pediátrica do Hospital de Clínicas da Unicamp e de outros serviços

do Brasil que integram o Grupo Brasileiro de Imunodeficiências (BRAGID, *Brazilian Group for Immunodeficiency*).

Após a assinatura do TCLE pelos responsáveis, foram coletadas amostras de sangue para as análises, considerando o volume máximo de 1,5 ml/kg a cada coleta, sendo recomendado intervalo mínimo de 8 semanas, de acordo com as recomendações internacionais de segurança para os limites de volume de amostras de sangue de crianças em pesquisas clínicas (31).

Critérios de inclusão: presença de microtrombocitopenia, com ou sem outras manifestações clínicas, tais como eczema e infecções recorrentes; concordar em participar do estudo através da assinatura do TCLE.

Critérios de exclusão: ausência de plaquetopenia e de microplaquetas no esfregaço de sangue periférico.

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Avaliação clínica dos pacientes**

O diagnóstico de WAS clássica foi baseado nas manifestações clínicas de microtrombocitopenia, infecções recorrentes e eczema. Em todos os pacientes foram registradas a idade das primeiras manifestações clínicas, a presença de manifestações de autoimunidade ou neoplasias, a frequência e o tipo das manifestações hemorrágicas e das complicações infecciosas e a média e os valores máximo e mínimo da contagem de plaquetas e do volume plaquetário médio (VPM). A gravidade das manifestações clínicas apresentadas foi avaliada através da aplicação de escores clínicos previamente publicados (25).

### **4.2. Quantificação da expressão da WASP por citometria de fluxo**

A expressão intracelular da WASP foi avaliada em 200µl de sangue periférico, usando o kit de permeabilização celular Fix&Perm® (AN DER GRUB

Bio Research GmbH) de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram incubadas com 0,6 µg de anticorpo monoclonal murino anti-WASP humana marcado com FITC (B-9) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), ou com anticorpo murino controle isotópico IgG2a marcado com FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), em temperatura ambiente por 15 minutos. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto™ (BD) e os dados foram analisados usando os softwares CellQuest (BD) ou FlowJo (Tree Star).

### **4.3. Análise das sequências nucleotídicas dos genes *WAS* e *WIPF1***

A caracterização das alterações moleculares nos genes que codificam as proteínas WASP e WIP foi realizada a partir de amostras de DNA genômico e amostras de cDNA dos pacientes investigados neste estudo, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) descritos nas tabelas 2, 3 e 4. Inicialmente, os sequenciamentos foram realizados a partir do DNA genômico dos casos avaliados. Nos casos em que o sequenciamento do DNA genômico não evidenciou nenhuma alteração nos exons e nas regiões de transição exon-intron, o sequenciamento foi realizado a partir do cDNA com o objetivo de identificar a ocorrência de *splicing* alternativo causado por mutações em regiões intrônicas.

**Tabela 2.** *Primers* para a análise do DNA genômico do gene *WAS*.

Exons	Primers	Sequência	Produtos
1 e 2	1S	5' TCCTGTTCCCTTGCTGCTCAT 3'	710pb
	2AS	5' GGTTTGCGGGTTGAGAACTG 3'	
3, 4, 5 e 6	3S	5' GAGGCTCCCAAATCCAGACAC 3'	719pb
	6AS	5' GAGACACAGGGAAGAATCAGCA 3'	
7	7S	5' GTTGGTTGGTAAGTGGGTCA 3'	284pb
	7AS	5' CTTGTTTCATGTGCCCTCTG 3'	
8 e 9	8S	5' AAGGAAGGGCAGTGAGGATT 3'	568pb
	9AS	5' CCACTGACCAACTCCTGACTG 3'	
10	10S	5' TCAGTCAGGAGTTGGTCAGTGG 3'	688pb
	10AS	5' TCTCTCCCACACACTCCAGTC 3'	
11	11S	5' CAGGCCTTAGGGATTCAGTG 3'	349pb
	11AS	5' TGGTGGTGA CTGCTGGGATTG 3'	
12	12S	5' GTCCAGTCCTCACCTCCCAG 3'	576pb
	12AS	5' GTTGAAAGACAGAGGGGCAG 3'	

**Tabela 3.** Primers para a análise do DNA genômico do gene *WIPF1*.

Exons	Primers	Sequência	Produtos
1	1S	5' CCACATCTCGGCGAAGTTCCC 3'	408pb
	1AS	5' CTTCTCCCCGGGCCATCAG 3'	
2	2S	5' TCCATTCTCTCCAAGCACCTC 3'	377pb
	2AS	5' TACAAACACATGCACGCCAGG 3'	
3	3S	5' CTTCCCGTACCCAACCTTTC 3'	374pb
	3AS	5' GGCCTACAGGGAGTGATACAG 3'	
4	4S	5' TCTGACTGAGCTGAGGGAAC 3'	533pb
	4AS	5' TGTGTAGCTGTCTGATCCTGG 3'	
5	5A - S	5' GTTGGGACTCGCAGGTAAATAG 3'	559pb
	5B - AS	5' GACTGACGTATTGAGCCTCC 3'	
	5C - S	5' GACCCATTCAATCAAGTCCGC 3'	611pb
	5D - AS	5' TGGTACATTTGGGCAGGCTG 3'	
6	6S	5' GCATGTGTCCAGCAAGTCCTC 3'	649pb
	6AS	5' TGGTGGGCCTTAGAATGGTTAG 3'	
7	7S	5' TCGTGACCTTTGTAGCACTTCC 3'	394pb
	7AS	5' TGGCTCCAAGGGTTCTCTAC 3'	
8	8S	5' TCTCATCCACAACATACGCC 3'	345pb
	8AS	5' CACACACGCATATTCCCCTC 3'	

**Tabela 4.** *Primers* para a análise do DNA complementar do gene *WAS*.

Fragmento	Primers	Sequência	Produtos
1	1S	5' TGCACCCAGAGCCTCGCCAG 3'	416pb
	1AS	5' CCGCTTGGCAGTCATCTCCAGC 3'	
2	2S	5' CCTTCGCTGGAGATGACTGCC 3'	435pb
	2AS	5' TCACGTCAAATCCATTCTGGGG 3'	
3	3S	5' CCCAGAAATGGATTTGACGTGA 3'	584pb
	3AS	5' GGGGTCTTGTTTCAGCTGAATTC 3'	
4	4S	5' GGAATTCAGCTGAACAAGACCC 3'	372pb
	4AS	5' AGGGCCTTGGGATTGTTGGGTG 3'	

As reações de amplificação foram realizadas a partir de 200 ng de DNA genômico ou cDNA, 1  $\mu$ l de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dntps: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10mM), 3  $\mu$ l de tampão da enzima (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0,2  $\mu$ M de cada primer e 1,5U de Taq DNA polimerase (Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), para volume final de 30  $\mu$ l. As reações foram submetidas a condições de ciclos pré-determinadas e padronizadas: 96°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguidas de 35 ciclos de 96°C por 1 minuto, temperatura de anelamento dos primers por 1 minuto e 72°C por 1 minuto para a síntese do produto. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados sob luz UV, com marcador de peso molecular Ladder 100pb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) para checagem do produto amplificado.

Para a análise molecular das alterações nos genes *WAS* e *WIPF1* foi utilizado o método de sequenciamento automático direto das regiões do DNA genômico e cDNA amplificadas. Após a amplificação das regiões específicas pela técnica da PCR, o produto amplificado foi purificado com a combinação de duas enzimas, que removem produtos não incorporados durante a amplificação. Para isso, foi realizada uma reação com 10 $\mu$ l do produto amplificado, 10U

exonuclease I (Exo I) que degrada *primers* residuais e demais produtos de fita simples e 1U da fosfatase alcalina (SAP) que degrada os nucleotídeos não incorporados; os tubos foram incubados no termociclador por 15 minutos a 37°C e inativados por 15 minutos a 80°C. O produto purificado foi quantificado em gel de agarose 2% com marcador de quantificação (*Low DNA Mass Ladder*; Invitrogen, ThermoFisher, EUA) para avaliar e estimar a sua concentração de acordo com o tamanho do produto amplificado. Em seguida foi realizada a reação de sequenciamento, utilizando o Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para o sequenciamento automático direto das regiões gênicas amplificadas, foram utilizados de 10 a 20 ng do produto de PCR purificado; 1 µl de oligonucleotídeo 1,6 µM (sense e antisense em reações distintas); 1 µl Big Dye, 1 µl de solução tampão (Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e MgCl<sub>2</sub> 5 mM) e água de injeção para 10 µl. Em um termociclador automático as amostras foram submetidas a 25 ciclos de desnaturação inicial 96°C por 20 segundos, temperatura de anelamento dos primers por 20 segundos e 60°C por 4 minutos para a síntese. O produto da reação de sequenciamento foi submetido à purificação com 8 µl de água de injeção, 32 µl de etanol absoluto. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000 g, o sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 100 µl de etanol 70%, centrifugada novamente por 20 minutos a 4000 g e o sobrenadante descartado, após o descarte, foi submetida à centrifugação invertida por 7 segundos a 200g e aquecida no termociclador a 65°C por 10 minutos para completa remoção do etanol residual. Para a eletroforese, adicionou-se 10 µl de formamida deionizada, as amostras foram desnaturadas a 96°C por 5 minutos e submetidas eletroforese capilar no sequenciador automático ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, EUA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização clínica dos pacientes estudados

Dezesseis pacientes com suspeita da WAS provenientes de quinze famílias não relacionadas foram investigados nesse estudo. A maioria dos casos (n=11) foi encaminhada dos serviços de imunologia e de hematologia pediátrica da Unicamp. Adicionalmente, outros cinco casos foram encaminhados por serviços participantes do Grupo Brasileiro de Imunodeficiências (BRAGID), incluindo: Ribeirão Preto-SP (n=1), Niterói-RJ (n=1), Salvador-BA (n=2, relacionados) e Recife-PE (n=1).

A tabela 5 resume as informações clínicas e laboratoriais referentes a todos os casos investigados neste estudo.

A idade de início dos sintomas no grupo de pacientes estudados variou de menos de 1 mês a 4 anos de idade. Todos os casos apresentaram plaquetopenia moderada a grave ( $6$  a  $70 \times 10^9/l$ ). Em 11 dos 16 casos havia também a confirmação da presença de microplaquetas no esfregaço de sangue periférico. Dois casos (#3 e #12) não apresentavam microplaquetas e em 3 casos (irmãos #9 e #10, e #14) a informação sobre a presença de microplaquetas não estava disponível.

Quanto aos sintomas apresentados no início do quadro, eczema foi o mais frequente, presente em 6 dos 16 casos investigados, seguido de sangramentos cutâneos (petéquias e/ou equimoses), que foram reportados como sintoma inicial em 5 dos 15 casos encaminhados para avaliação. Em terceiro lugar foram mencionadas a hematoquezia e epistaxe (3 casos cada).

A partir do sequenciamento do gene *WAS*, complementado com a análise da expressão da WASP nos leucócitos do sangue periférico, foi possível determinar o diagnóstico de XLT ou WAS em 9 dos 16 casos inicialmente avaliados (pacientes #1, #2, #4, #7, #11, #13, #14, #15 e #16). Os pacientes que tiveram a confirmação do diagnóstico de XLT ou de WAS foram classificados com base nas informações clínicas da seguinte maneira: um recebeu escore clínico de 1, dois receberam o escore 2, três receberam escore 3 e três receberam escore 4 (tabela 6). É importante destacar que destes 9 casos, 4

deles (pacientes #1, #2, #4 e #11) haviam recebido previamente, nos seus serviços de origem, o diagnóstico equivocado de plaquetopenia imune (PTI).

Dos casos inicialmente encaminhados para investigação da WAS, dois não tiveram prosseguimento na investigação em virtude da ausência de microplaquetas no esfregaço de sangue periférico (pacientes #3 e #12), uma vez que este achado é obrigatório para o diagnóstico da síndrome.

Três casos, sendo dois do sexo masculino (pacientes #5 e #8) e um do sexo feminino (paciente #6) apresentavam plaquetopenia com microplaquetas no sangue periférico, mas não tiveram nenhuma mutação identificada no gene *WAS*. Estes casos foram submetidos ao sequenciamento também do gene *WIPF1*, porém nenhuma mutação foi encontrada.

Finalmente, dois casos relacionados (pacientes #9 e #10), procedentes de Salvador-BA, filhos de um casal não consanguíneo, foram submetidos a investigação *post-mortem* a partir do sequenciamento do DNA da mãe. Ambos haviam falecido antes dos 2 anos de idade por quadro muito sugestivo de WAS, com plaquetopenia, sangramentos cutâneo-mucosos e infecções graves e recorrentes. Não havia documentação a respeito da pesquisa de microplaquetas no serviço de origem nestes dois casos. O sequenciamento do gene *WAS*, a partir de amostra de sangue coletada da mãe, não evidenciou nenhuma mutação.

**Tabela 5.** Características clínicas dos pacientes com suspeita da síndrome de Wiskott-Aldrich incluídos neste estudo.

Paciente (sexo)	Idade ao início dos sintomas	Primeiras manifestações clínicas	Achados adicionais	Contagem plaquetária ( $\times 10^9/l$ )**	Microplaquetas	Volume plaquetário médio (fl)***	Infecções	Desfecho
1 – JCM (M)	9 meses	sangramentos cutâneo-mucosos	trombocitopenia intermitente	12 – 208	presentes	5,6 – 6,5	-	vivo (em seguimento)
2 – JCF (M)	1º mês de vida	petéquias, hematoquezia	hemorragia subaracnoidea	7 – 23	presentes	7,4 – 12,9	otite, pneumonia, resfriados comuns	vivo (perda de enxerto pós- TCTH )
3 – KCBC (F)	4 anos	febre, pancitopenia	neutropenia febril, hepatoesplenomegalia	40 – 289	ausentes	6 – 9,9	pneumonia	viva
4 – LSMN (M)	1º mês de vida	petéquias, hematoquezia	-	17 – 82	presentes	6	-	vivo (pós- TCTH )
5 – MNVS (M)	1º mês de vida	otites, eczema	equimoses, epistaxes	46 – 145	presentes	6,4 – 10,7	otites	vivo
6 – EMS (F)	6 meses	petéquias, epistaxe	equimoses, hematoquezia	6 – 134	presentes	6,7 – 9,4	otites	viva
7 – PLSV (M)	11 meses	epistaxe	hematemese, rinite alérgica, neutropenia	7 – 33	presentes	5,1 – 6,5	amigdalite, sinusite, infecções de pele	vivo (pós- TCTH )
8 – VGSP (M)	4 anos	petéquias e equimoses	neutropenia grave	10 – 242	presentes	6,2 – 7,9	-	Vivo
9 – HSD* (M)	1º mês de vida	eczema e epistaxes	sepse de foco pulmonar	6	ND	ND	pneumonia	óbito com 4 meses
10 – BSD* (M)	4 meses	eczema	epistaxes, hematoquezia	6 – 65	ND	ND	pneumonia	óbito com 1 ano e 4 meses
11 – MFB (M)	1º mês de vida	achado acidental	equimoses pós-traumas	7 – 83	presentes	6 – 6,2	-	vivo (em seguimento)
12 – ESX (M)	1º mês de vida	infecções respiratórias	-	< 70	ausentes	ND	pneumonia	óbito com 3 meses
13 – DLCS (M)	1º mês de vida	hematoquezia	eczema	35 – 120	presentes	5,3-6,7	otite, Mastoidite, IVAS	vivo (aguarda TCTH)
14 – GVSR (M)	7 meses	eczema	infecções respiratórias, hematoquezia, pioderma gangrenoso	15	ND	ND	infecções de pele, abscesso parede abdominal	vivo (aguarda TCTH)
15 – BGS (M)	2 meses	infecções de pele, eczema	alergia a proteína do leite de vaca	15 - 68	presentes	6 – 7,6	otites, abscesso couro cabeludo	vivo (aguarda TCTH)
16 – JPMP (M)	1º mês de vida	eczema	-	34-56	presentes	4,3-6,1	Infecção aguda por CMV	vivo

\* irmãos, ambos já falecidos quando da ocasião da investigação diagnóstica; pesquisa molecular realizada a partir de amostras de sangue coletadas da mãe. ND, não disponível; IVAS, infecção das vias aéreas superiores; CMV, citomegalovírus; TCTH, transplante de células tronco hematopoiéticas; \*\*VR: 150-400; \*\*\*VR: 6,9-10,6.

## 5.2. Mutações encontradas no gene *WAS*

Conforme mostra a tabela 6, foram identificadas neste grupo de pacientes um total de 9 mutações no gene *WAS*, sendo 3 mutações do tipo *missense*, 4 mutações *nonsense* e 2 mutações com alteração em sítio de *splicing* (sendo que uma delas ainda carece de confirmação). Das 9 mutações encontradas, 4 não haviam sido descritas previamente na literatura: c.1040delA no exon 10, que resultou na alteração p.Lys336ArgfsX108 (*nonsense*); c.207C>T e c.233delC no exon 2, que resultaram respectivamente na troca p.Pro58Leu (*missense*) e na alteração do frame de leitura, com stop códon prematuro p.Asn78AsnfsX48 (*nonsense*); e c.743\_746delAT no exon 7, que resultou na alteração p.Asp237AspfsX21 (*nonsense*).

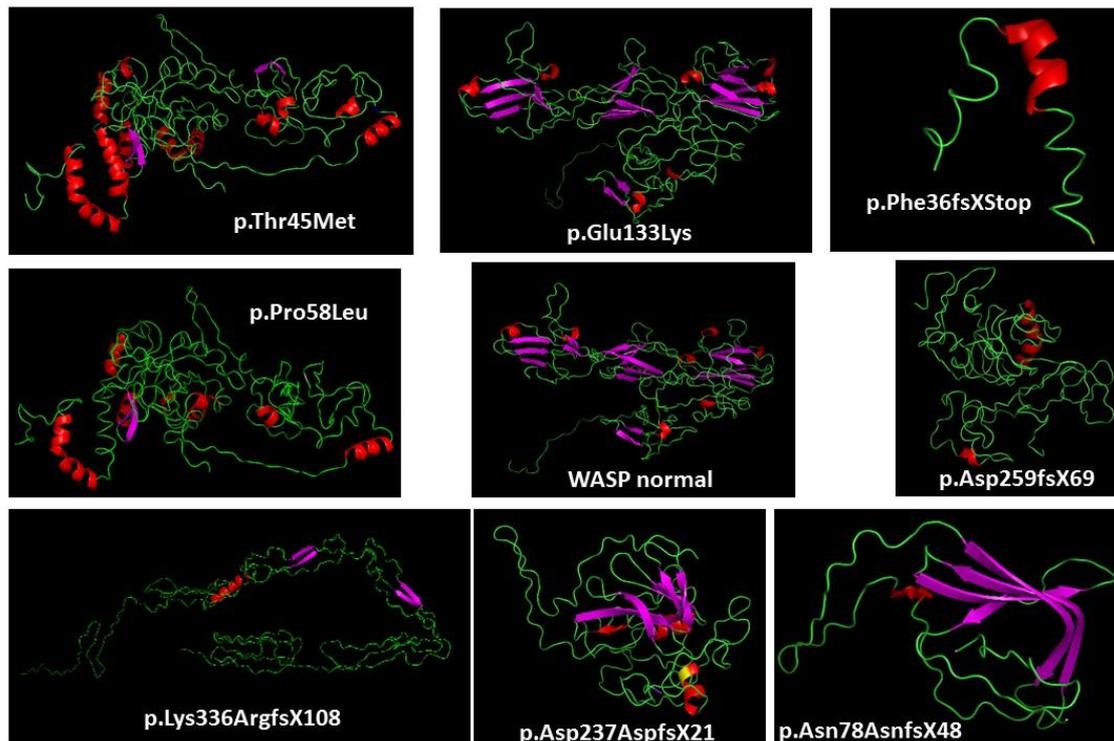
No caso do paciente #4, a amplificação do fragmento 3 do cDNA (que abrange a região dos exons 6 e 7) revelou a presença de uma dupla banda, apontando para a presença de 2 transcritos distintos de RNAm. Nenhuma mutação foi encontrada na região codificadora do gene *WAS*, contudo o sequenciamento do fragmento de tamanho maior sugere que parte do intron 6 foi segregada juntamente com os exons 6 e 7, que poderia ter sido provocada por uma mutação no intron 6, ainda não identificada. A conclusão da investigação molecular deste caso ainda está pendente.

Em ambos os casos diagnosticados com XLT (pacientes #1 e #11) foram encontradas mutações do tipo *missense* na região *upstream* do gene *WAS* (exon 2). Já nos casos diagnosticados com *WAS*, as mutações encontravam-se na região *downstream* do gene (a partir do exon 4), com exceção dos dois casos em que ocorreu uma mutação do tipo *nonsense* no exon 1 ou no exon 2 (pacientes #13 e #16), levando a criação de *stop codons* prematuros, com ausência na produção de praticamente toda a estrutura primária da proteína.

A investigação do status de portadora do gene mutado foi realizada em 8 das 9 mães de pacientes que apresentaram mutação no gene *WAS*, tendo sido possível encontrar a mesma mutação do propósito em heterozigose em todas as mães que foram investigadas.

A partir dos resultados dos 8 sequenciamentos do gene *WAS* que foram concluídos, sendo de 2 pacientes com diagnóstico de XLT (pacientes #1 e #11)

e de 6 pacientes com diagnóstico de WAS (pacientes #2, #7, #13, #14, #15 e #16), foi possível prever as estruturas tridimensionais das proteínas WASP mutantes para cada um dos casos, através da utilização do software aberto PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)). A figura 4 ilustra as estruturas tridimensionais da WASP previstas para cada um dos 8 casos que tiveram as mutações do gene WAS identificadas.



**Figura 4. Estruturas tridimensionais das proteínas WASP mutantes previstas pelo software PyMOL para cada um dos 8 casos que tiveram as mutações do gene WAS identificadas neste estudo.** Em sentido horário, a partir do canto superior esquerdo: paciente #1 (XLT), paciente #2 (WAS), paciente #13 (WAS), paciente #15 (WAS), paciente #16 (WAS), paciente #14 (WAS), paciente #7 (WAS) e paciente #11 (XLT). Em comparação com a estrutura normal da WASP (centro), nota-se a alteração do tamanho da proteína e da quantidade de alfa-hélices (em vermelho) e folhas beta-pregueadas (em roxo).

**Tabela 6.** Relação das mutações encontradas no gene *WAS*.

Paciente	Score clínico	Diagnóstico prévio de PTI	Mãe portadora	Local da mutação	Tipo da mutação	Mutação encontrada	Alteração proteica predita	Nova mutação encontrada	Expressão da WASP nos leucócitos	Diagnóstico definitivo
1 (JCM)	2	Sim	Sim	exon 2	<i>Missense</i>	c.168C>T	p.Thr45Met	-	reduzida	XLT
2 (JCF)	4	Sim	Sim	exon 4	<i>Missense</i>	c.431G>A	p.Glu133Lys	-	NR	WAS
4 (LSMN)	2	Sim	Sim	intron 6*	<i>Splice*</i>	Provável mutação envolvendo os exons 6-7*	ND	-	NR	WAS
7 (PLSV)	3	Não	Sim	exon 10	<i>Nonsense</i>	c.1040delA	p.Lys336ArgfsX108	Sim	reduzida	WAS
11 (MFB)	1	Sim	Sim	exon 2	<i>Missense</i>	c.207C>T	p.Pro58Leu	Sim	reduzida	XLT
13 (DLCS)	3	Não	Sim	exon 1	<i>Nonsense</i>	c.140_143DelTT	p.Phe36fsX	-	reduzida	WAS
14 (GVSR)	4	Não	Sim	exon 7	<i>Nonsense</i>	c.743_746DelAT	p.Asp237AspfsX21	Sim	NR	WAS
15 (BGS)	4	Não	Sim	intron 8	<i>Splice (acceptor site)</i>	IVS8 as -2A>G	p.Asp259fsX69	-	reduzida	WAS
16 (JPMP)	3	Não	ND	exon 2	<i>Nonsense</i>	c.233delC	p.Asn78AsnfsX48	Sim	NR	WAS

Os sequenciamentos do gene *WAS* foram comparados com a sequência de referência do gene *WAS* (NCBI: NM\_000377.2 e NG\_007877.1). WASP, proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich; XLT, trombocitopenia ligada ao X; WAS, síndrome de Wiskott-Aldrich; PTI, Trombocitopenia imune; del, deleção; fs, *frameshift*; ND, não determinado; NR, não realizado; \* neste caso, a análise molecular sugere a presença de 2 transcritos de RNAm distintos, sem mutação na região codificadora.

### 5.3. Análise da expressão da WASP em leucócitos do sangue periférico

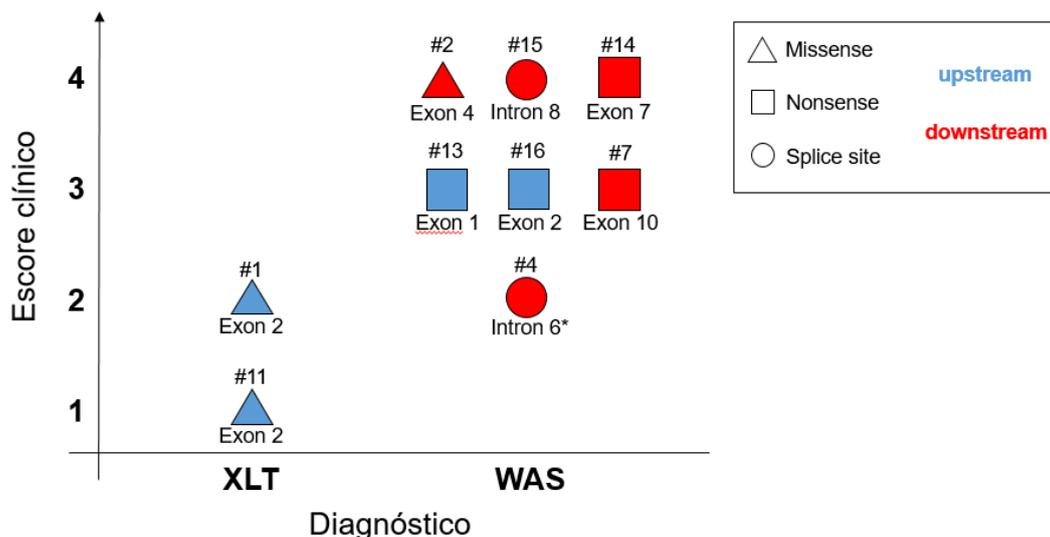
A quantificação da expressão da WASP em leucócitos de sangue periférico foi realizada em 5 dos 9 pacientes que tiveram os diagnósticos de XLT ou WAS confirmados pela análise molecular. Em 4 dos 9 pacientes não foi possível analisar a expressão da WASP por citometria de fluxo, uma vez que dois haviam sido submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) antes da padronização desta análise em nosso laboratório e no caso dos pacientes proveniente de Recife-PE e de Niterói-RJ só foi obtida amostra de sangue suficiente para análise molecular.

Dos 5 pacientes em que foi possível avaliar a expressão da WASP nos leucócitos do sangue periférico, 2 deles tinham o diagnóstico de XLT (escores clínicos 1 e 2) e os outros 3 tinham o diagnóstico de WAS (escores clínicos 2, 3 e 4). Todos apresentaram expressão reduzida da WASP em relação ao controle normal (tabela 6).

### 5.4. Correlação entre o genótipo e o fenótipo dos casos confirmados de XLT e de WAS

Conforme ilustra a figura 4, em ambos os pacientes com diagnóstico de XLT (pacientes #1 e #11) foram encontradas mutações *missense* localizadas na porção *upstream* do gene *WAS* (exon 2). Com relação a expressão da WASP nos leucócitos do sangue periférico, ambos apresentaram expressão reduzida da proteína em relação ao controle (figuras 5D e 6D).

Entre os 7 pacientes com diagnóstico confirmado de WAS, apenas dois apresentaram mutações do tipo *nonsense* na região *upstream* do gene *WAS* (pacientes #13 e #16), enquanto todos os outros apresentaram mutações do tipo *missense*, *nonsense* e em sítio de *splicing* localizadas na porção *downstream* do gene *WAS* (a partir do exon 4). Neste grupo, 3 pacientes (pacientes #4, #13 e #15) tiveram a expressão da WASP avaliada por citometria de fluxo e em todos eles a expressão da proteína estava reduzida.



**Figura 5. Correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes com WAS e XLT incluídos neste estudo.** Ambos os pacientes com XLT (#1 e #11) apresentaram mutações *missense* no exon 2. Dos pacientes com WAS, todos apresentaram mutações na porção *downstream* do gene *WAS*, com exceção de dois pacientes (#13 e #16), que apresentaram, respectivamente, uma deleção de 2 pares de bases no exon 1 e uma deleção de um par de bases no exon 2, que resultaram em *stop codons* prematuros, com ausência da produção da proteína. Um dos pacientes com WAS (#4) não teve ainda a mutação completamente determinada, porém apresenta provavelmente uma alteração envolvendo o intron 6. Apesar da provável mutação na porção *downstream* do gene, este paciente apresentou um escore clínico baixo, porém acompanhado de um fenótipo hemorrágico grave que justificou a indicação precoce de transplante de células tronco hematopoiéticas.

#### 5.4.1. Descrição detalhada dos casos diagnosticados com trombocitopenia ligada ao cromossomo X (XLT)

O paciente #1 era um menino de 18 meses de idade, que foi encaminhado ao nosso serviço com história de sangramentos cutâneo-mucosos espontâneos desde os nove meses de idade. Durante a sua avaliação inicial, antes de ser encaminhado à Unicamp, apresentava plaquetopenia, tendo sido diagnosticado como PTI. Não tinha nenhuma anormalidade no desenvolvimento neuropsicomotor ou no exame físico. A história familiar de sangramentos era negativa. Naquela época, ele era o único filho de pais não consanguíneos (Figura 6A).

Durante o seguimento, apresentou um aumento espontâneo não sustentado do número de plaquetas. Durante um dos períodos de trombocitopenia, o paciente recebeu um curso curto de prednisona, mas não mostrou nenhuma resposta.

Quando ele foi avaliado pela primeira vez em nosso centro, a investigação laboratorial inicial mostrou plaquetopenia ( $32 \times 10^9/l$ ) e anemia microcítica leve, sem outras anormalidades. Notavelmente, observamos também VPM persistentemente baixo, variando de 5,6 a 6,5 fl (faixa normal: 7,2-11,1 fl), e seu esfregaço de sangue periférico mostrava duas populações de plaquetas distintas, uma normal e outra com tamanho acentuadamente reduzido (Figura 6C).

Nos meses seguintes, realizamos a contagem de plaquetas em intervalos semanais, que demonstrou a existência de trombocitopenia com um padrão intermitente, com plaquetas variando de 12 a  $208 \times 10^9/l$  (Figura 6B).

A combinação de VPM reduzido com trombocitopenia de padrão intermitente sugeriu o diagnóstico de XLT. Para confirmar, avaliamos a expressão da WASP em leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo, que detectou uma menor expressão da proteína, em relação ao controle saudável (Figura 6D), e realizamos o sequenciamento do gene *WASP*, que identificou uma mutação *missense* no exon 2 (Figura 6E), resultando na substituição de uma treonina por uma metionina, na posição 45 (p.Thr45Met).

Este paciente nunca apresentou eczema, neutropenia ou infecções recorrentes. Com relação aos dados laboratoriais, o paciente tinha contagem normal de leucócitos, com subpopulações normais de linfócitos e níveis normais de imunoglobulina. Sua mãe era heterozigota para a mesma mutação, que não foi encontrada nos avós maternos, confirmando a ocorrência de uma nova mutação nesta família. A mãe teve um segundo menino com contagem de plaquetas normais, cujo genótipo confirmou ausência da mutação no gene *WAS*.

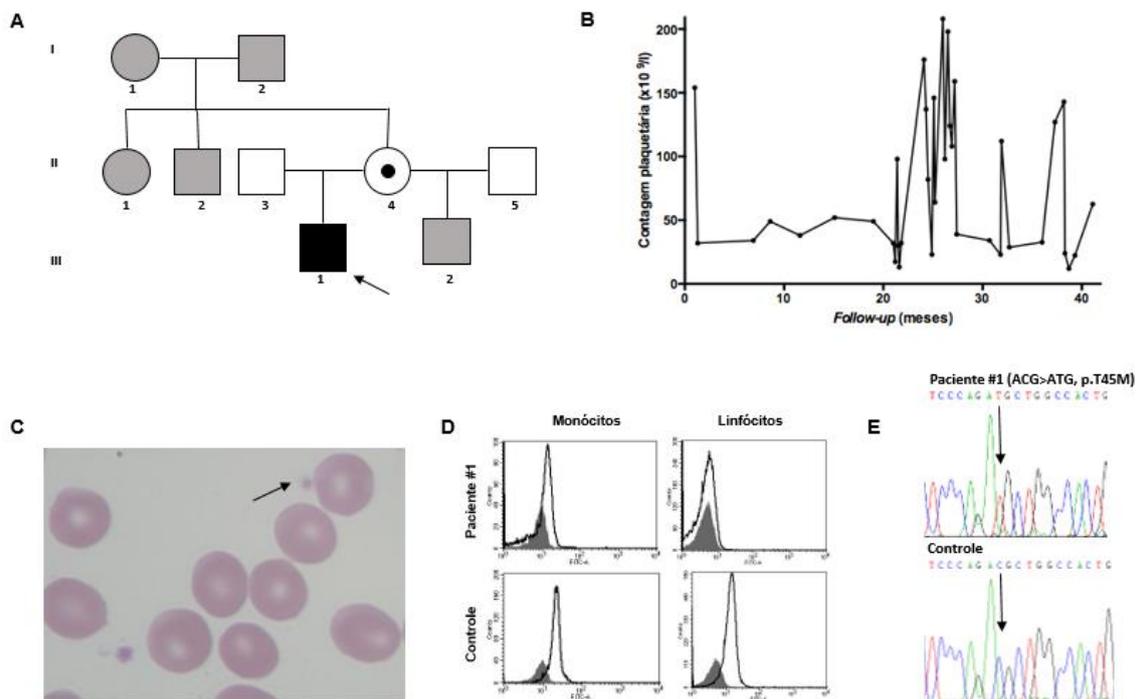
Temos manejado os episódios de trombocitopenia deste paciente com a administração de agentes antifibrinolíticos. Ele não apresentou nenhum grande sangramento e não foram necessárias transfusões de plaquetas até agora.

O paciente #11 foi encaminhado para o Hemocentro da Unicamp aos 2 anos de idade, com suspeita de diagnóstico de PTI. Durante o período neonatal, aos 15 dias de idade, ele foi diagnosticado com coqueluche e um hemograma completo revelou trombocitopenia pela primeira vez. Desde então, as contagens de plaquetas variaram de 7 a 83  $\times 10^9/l$  (Figura 7B), sem história de sangramentos, exceto por equimoses após traumas. Não tinha história familiar de hemorragia ou consanguinidade foi relatado (Figura 7A).

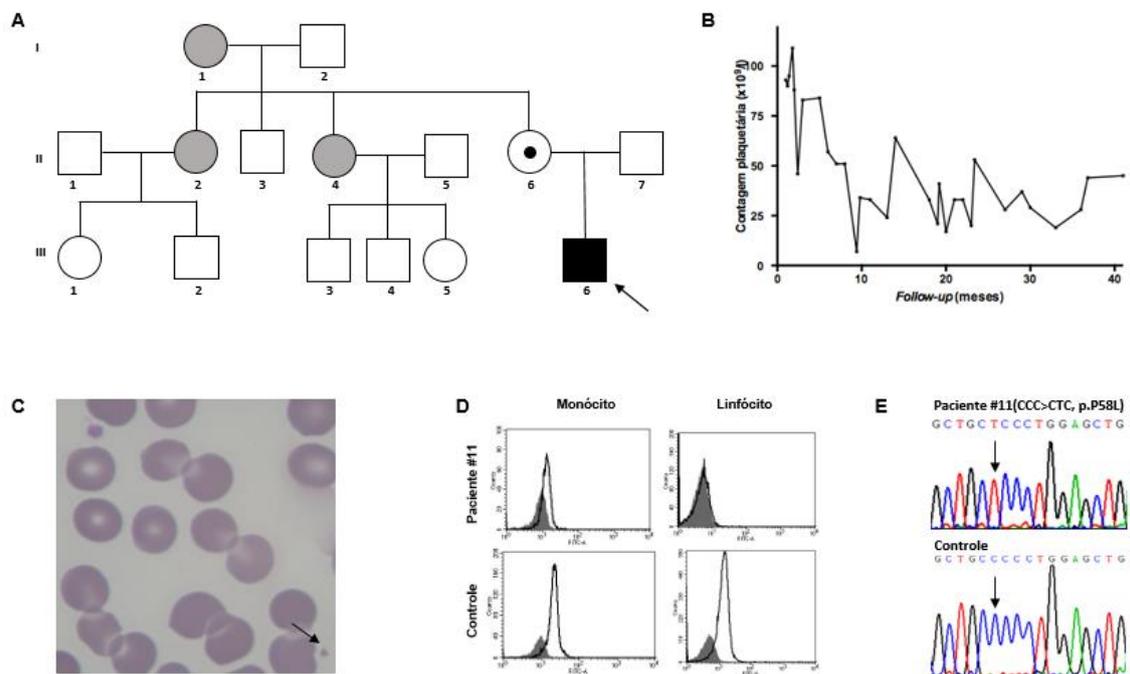
Nos primeiros 6 meses de acompanhamento em nosso serviço, apresentou contagens de plaquetas que variaram de 37 a 53  $\times 10^9/l$ , com a presença de microplaquetas no esfregaço de sangue periférico (Figura 7C). O VPM foi persistentemente baixo, variando de 6,0 a 6,2 fl.

Devido a esses achados clínicos e laboratoriais, considerou-se o diagnóstico de XLT. A expressão da WASP em leucócitos do sangue periférico deste paciente estava reduzida em relação ao controle saudável (Figura 7D), e a análise molecular do gene *WASP* revelou uma mutação *missense* no exon 2 (Figura 7E), que levou à uma troca de uma prolina por uma leucina na posição 58 (p.Pro58Leu).

Ele nunca apresentou eczema, neutropenia ou infecções recorrentes, excluindo diagnóstico de WAS. Sua mãe era heterozigota para a mesma mutação, que estava ausente nos avós maternos. Durante o seguimento, devido a seus sintomas hemorrágicos leves, nunca foi necessário nenhum tratamento hemostático.



**Figura 6. Descrição do paciente #1.** **A.** Heredograma. O probando (III-1) é o único indivíduo afetado com XLT. A mãe está indicada como portadora. Os indivíduos assinalados em cinza foram investigados e foram negativos para a mutação encontrada no probando. **B.** Contagens plaquetárias do paciente, com um padrão de trombocitopenia intermitente, sem nenhum fator desencadeante detectável. **C.** Esfregaço do sangue periférico do paciente, mostrando duas plaquetas, uma de tamanho normal e uma de tamanho reduzido (seta). Imagem obtida com aumento de 100x. **D.** Expressão da WASP analisada por citometria de fluxo em monócitos e linfócitos. Em relação ao controle normal, o paciente #1 mostrou expressão reduzida da proteína nos monócitos e linfócitos (histogramas brancos). Histogramas cinzas representam anticorpo controle isotípico negativo. **E.** Sequenciamento do gene WAS do paciente #1, com uma mutação missense C>T no exon 2.



**Figura 7. Descrição do paciente #11.** **A.** Heredograma. XLT foi diagnosticada apenas no probando (III-6), e sua mãe era heterozigota para a mutação no gene *WAS*. Os indivíduos assinalados em cinza foram investigados e foram negativos para a mutação encontrada no probando. **B.** Contagens plaquetárias do paciente, com um padrão de trombocitopenia intermitente não associado a infecções ou outros fatores desencadeantes. **C.** Esfregaço do sangue periférico do paciente, mostrando uma plaqueta de tamanho normal e uma microplaqueta (seta). Imagem obtida com aumento de 100x. **D.** Expressão reduzida da WASP em monócitos e linfócitos do paciente #11 em relação ao controle normal (histogramas brancos). Anticorpo controle isotópico negativo está mostrado em cinza. **E.** Sequenciamento do gene *WAS* do paciente #11, mostrando uma troca de nucleotídeos C>T no exon 2.

## 6. DISCUSSÃO

Mutações no gene *WAS* estão associadas a um espectro de fenótipos clínicos, incluindo a *WAS* clássica, a trombocitopenia ligada ao X (XLT) e a neutropenia ligada ao X (XLN) (25, 33). A *WAS* clássica caracteriza-se não apenas por trombocitopenia com microplaquetas, mas também por outras complicações clínicas, como eczema, imunodeficiência e risco aumentado de doenças autoimunes e neoplasias(34). Manifestações hemorrágicas, como petéquias e equimoses, geralmente estão presentes desde o nascimento, e infecções recorrentes são um achado frequente(32). A trombocitopenia é grave na maioria dos casos e caracteriza-se invariavelmente por um volume plaquetário diminuído. Diante do risco de morte associado aos sangramentos e, sobretudo, às infecções decorrentes da deficiência imune, a *WAS* é uma doença grave, com um prognóstico a longo prazo bastante reservado nos casos que não recebem o único tratamento curativo disponível atualmente, o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH).

Levando-se em consideração a gravidade desta síndrome e a sua baixa incidência na população, torna-se imprescindível a realização de uma investigação diagnóstica sistematizada de todos os casos suspeitos, com o objetivo de evitar o diagnóstico equivocado, que poderia levar à instituição de tratamentos ineficazes e associados a frequentes efeitos colaterais, bem como identificar precocemente os casos mais graves, que seriam elegíveis para tratamentos mais agressivos.

A dificuldade do diagnóstico da *WAS* torna-se mais evidente quando se examina os casos mais leves, caracterizados exclusivamente por trombocitopenia com microplaquetas. Vale a pena destacar que, enquanto o aumento do VPM está associado a diferentes situações, incluindo as macrotrombocitopenias hereditárias e a destruição periférica de plaquetas, em que há liberação de formas plaquetárias imaturas para a circulação, a redução do VPM é observada exclusivamente na *WAS* e na XLT. Neste trabalho, nós identificamos 2 casos de XLT que haviam sido previamente diagnosticados de maneira equivocada como trombocitopenia imune. Ambos os casos apresentavam plaquetas pequenas, com VPM persistentemente baixo, o que

demonstra a importância da avaliação da morfologia plaquetária, combinando o esfregaço de sangue periférico com os parâmetros plaquetários fornecidos pelos contadores automatizados.

Com relação ao genótipo, mutações *missense* localizadas nos exons 1-3 do gene *WAS* são mais frequentemente identificadas em pacientes com formas mais leves, como a XLT(32). De fato, ambos os casos com XLT descritos neste trabalho apresentaram mutações *missense* localizadas no exon 2 do gene *WAS*, resultando nas mutações p.Thr45Met (paciente #1) e p.Pro58Leu (paciente #11). Interessantemente, a mutação encontrada no paciente #11 (p.Pro58Leu) afetou a WASP no mesmo resíduo que um outro paciente previamente descrito com trombocitopenia intermitente, uma variante ainda mais leve que a XLT, mas com a substituição por um outro aminoácido (p.Pro58Arg)(35).

Devido à ausência de eczema e infecções recorrentes nos pacientes com XLT, não é surpreendente que estes casos tenham sido previamente diagnosticados como PTI. Assim, em pacientes com trombocitopenia persistente ou mesmo com um padrão intermitente de contagens plaquetárias diminuídas, acompanhada de um volume plaquetário médio constantemente baixo, o diagnóstico de XLT deve ser considerado, de modo a evitar uma abordagem terapêutica incorreta.

Ainda no presente estudo foram identificados 7 casos de *WAS* clássica, sendo que 2 deles também haviam sido previamente diagnosticados de maneira equivocada como PTI. As mutações encontradas neste grupo de pacientes reforçam a hipótese de que há uma correlação bastante consistente entre o genótipo e o fenótipo na *WAS*: todos os casos, exceto os casos #13 e #16, apresentaram mutações localizadas na porção *downstream* do gene *WAS* (a partir do exon 4) e apresentaram expressão reduzida da WASP nos leucócitos do sangue periférico, nos casos em que foi possível realizar a análise da expressão.

Embora os pacientes #13 e #16 tenham apresentado mutações nos exons 1 (p.Phe36fsX) e 2 (p.Asn78AsnfsX48), respectivamente, ambas resultaram na criação de *stop codons* prematuros, que diminuíram a expressão da WASP

funcional, levando a um quadro clínico grave, com escore clínico de 3 em ambos os casos.

Outro caso neste grupo também merece destaque. Trata-se do paciente #4, que apresentou uma mutação provável no intron 6, levando à produção e 2 transcritos diferentes do RNAm da WASP. Devido a presença de plaquetopenia com microplaquetas e eczema leve, este paciente recebeu um escore de 2. No entanto, ele apresentava um quadro expressivo de sangramentos cutâneo-mucosos desde o nascimento (petéquias, equimoses, hematoquezia, hematomas em sítios de punção venosa), associados a plaquetopenia grave, tendo recebido 3 transfusões de plaquetas nos primeiros 3 meses de vida. Também apresentava história familiar de um irmão mais velho com quadro de sangramentos cutâneo-mucosos recorrentes associados a plaquetopenia grave, que recebeu múltiplas transfusões de plaquetas e faleceu aos 7 meses de idade por provável sangramento no sistema nervoso central. A intensidade das manifestações hemorrágicas nesta família motivou a indicação precoce do TCTH neste caso, apesar do escore clínico baixo. Este caso indica uma limitação do escore clínico utilizado para a classificação dos pacientes com WAS e XLT, que não leva em consideração a presença e a intensidade das manifestações hemorrágicas, que constituem importante elemento causador de morbidade e até de mortalidade nos pacientes portadores desta síndrome.

Considerando que o TCTH alogênico é o único tratamento curativo atualmente disponível para a WAS e que existem diversas complicações relacionadas a este procedimento, como a doença do enxerto contra o hospedeiro, as infecções graves e as hemorragias maciças, deve-se ter em conta a importância de diagnosticar corretamente os pacientes portadores desta síndrome e de selecionar precocemente os casos mais graves, potencialmente candidatos a terapias mais agressivas como o TCTH e, no futuro, também a terapia gênica.

Diante disso, uma das alternativas a serem implementadas na investigação diagnóstica da WAS e da XLT é a avaliação por citometria de fluxo da expressão intracelular da WASP em leucócitos do sangue periférico. De fato, uma das preocupações deste estudo foi a padronização e viabilização da técnica de citometria de fluxo como ferramenta para o diagnóstico dos pacientes com

quadro clínico e/ou história familiar sugestivos de XLT e de WAS no Hemocentro da Unicamp. Nos casos em que foi possível realizar esta investigação, notou-se que a redução da expressão da proteína associa-se à ocorrência da doença.

Finalmente neste estudo foram determinadas 9 mutações distintas em 9 pacientes não relacionados. Entre as 9 mutações identificadas, 4 não haviam sido descritas na literatura: a mutação p.Pro58Leu, localizada no exon 2 e associada ao diagnóstico de XLT, e as mutações p.Asn78AsnfsX48, p.Asp237AspfsX21 e p.Lys336ArgfsX108, localizadas nos exons 2, 7 e 10, respectivamente, e associadas ao diagnóstico de WAS. Com isso, este trabalho contribui para a ampliação do conhecimento acerca do espectro de mutações associado à WAS e reforça a hipótese de que há uma correlação consistente entre o genótipo e o fenótipo nesta síndrome.

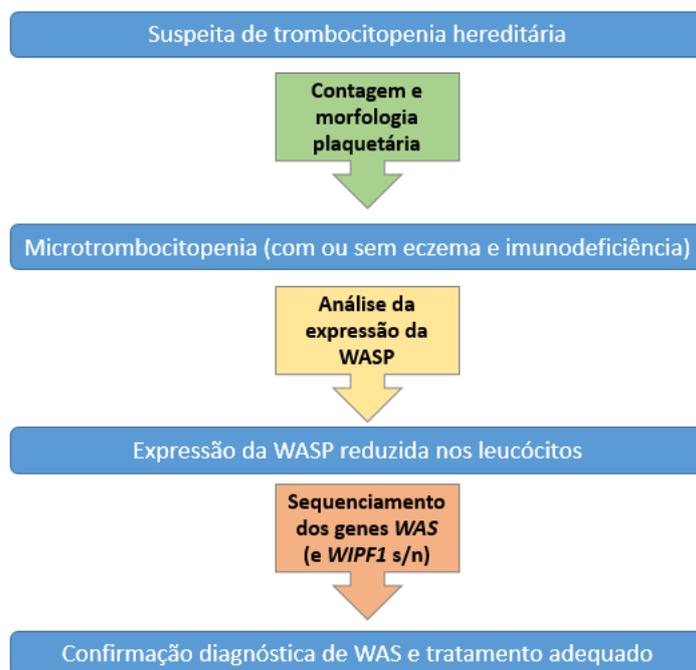
## 7. CONCLUSÃO

Em nosso conhecimento este é o primeiro estudo com o objetivo de caracterizar as alterações moleculares associadas à WAS e outras manifestações decorrentes de mutações no gene *WAS* no Brasil. Através dele e da colaboração com outros serviços que integram o Grupo Brasileiro de Imunodeficiências (BRAGID), foi possível proporcionar o acesso de um grupo de pacientes, de diferentes regiões do país, com suspeita clínica de mutações no gene *WAS* à confirmação diagnóstica através do estudo de expressão da WASP e da determinação da mutação envolvida. Isto resultou, como implicação imediata, no encaminhamento ao tratamento adequado, incluindo o TCTH, e no aconselhamento genético mais preciso das famílias envolvidas.

Do ponto de vista científico, ajudou a estabelecer as mutações envolvendo a WASP em nosso país, assim como ampliou nosso conhecimento acerca das doenças decorrentes destas mutações e corroborou a hipótese de que o fenótipo clínico da WAS é fortemente influenciado pelo efeito de mutações específicas no gene *WAS*.

Desta forma, propomos um algoritmo de investigação da síndrome de Wiskott-Aldrich e doenças correlatas, de maneira a permitir a avaliação

sistemática de todos os casos suspeitos, com o objetivo de evitar erros de diagnóstico e agilizar o encaminhamento dos pacientes ao tratamento adequado (Figura 8). Em primeiro lugar, para todos os pacientes com suspeita de trombocitopenia hereditária deve ser realizada a avaliação do esfregaço do sangue periférico, com atenção para a contagem e a morfologia plaquetária. Aqueles que apresentarem microtrombocitopenia (presença de microplaquetas no esfregaço de sangue periférico), principalmente se associada a outros sinais e sintomas tais como eczema e infecções recorrentes, devem ser encaminhados para avaliação específica, iniciando pela quantificação da expressão da WASP em leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. Ao se detectar uma expressão reduzida da WASP, o próximo passo deve ser a avaliação molecular, com sequenciamento do gene *WAS*. Para aqueles casos em que a paciente é do sexo feminino ou para casos em que há consanguinidade entre os pais, também deve ser realizada a investigação molecular do gene *WIPF1*, uma vez que a deficiência da *WIP*, descrita previamente como uma doença de herança autossômica recessiva, também pode levar a deficiência de WASP, produzindo os mesmos sinais e sintomas da WAS com mutação no gene *WAS*.



**Figura 8. Algoritmo de investigação da síndrome de Wiskott-Aldrich e doenças correlatas**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(4):725-38; quiz 39.
2. Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood.* 2004;103(2):456-64.
3. Bosticardo M, Marangoni F, Aiuti A, Villa A, Grazia Roncarolo M. Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood.* 2009;113(25):6288-95.
4. Kirchhausen T, Rosen FS. Disease mechanism: unravelling Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Biol.* 1996;6(6):676-8.
5. Sullivan KE, Mullen CA, Blaese RM, Winkelstein JA. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr.* 1994;125(6 Pt 1):876-85.
6. Villa A, Notarangelo L, Macchi P, Mantuano E, Cavagni G, Brugnoni D, et al. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat Genet.* 1995;9(4):414-7.
7. Zhu Q, Zhang M, Blaese RM, Derry JM, Junker A, Francke U, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood.* 1995;86(10):3797-804.
8. Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, Worth A, Kempinski H, et al. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood.* 2006;108(7):2182-9.
9. Beel K, Cotter MM, Blatny J, Bond J, Lucas G, Green F, et al. A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Br J Haematol.* 2009;144(1):120-6.
10. Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, Frints SG, Schwartz M, Van Den Oord JJ, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet.* 2001;27(3):313-7.
11. Stray-Pedersen A, Abrahamsen TG, Froland SS. Primary immunodeficiency diseases in Norway. *J Clin Immunol.* 2000;20(6):477-85.
12. Wiskott A. Familiarer, angeborener Morbus Werlhofii? *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 1937;68:212-6.

13. 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.
14. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*. 1994;78(4):635-44.
15. Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. 1998;8(25):1347-56.
16. Nonoyama S, Ochs HD. Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001;1(5):430-7.
17. de la Fuente MA, Sasahara Y, Calamito M, Anton IM, Elkhal A, Gallego MD, et al. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):926-31.
18. Sasahara Y, Rachid R, Byrne MJ, de la Fuente MA, Abraham RT, Ramesh N, et al. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell*. 2002;10(6):1269-81.
19. Volkman BF, Prehoda KE, Scott JA, Peterson FC, Lim WA. Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell*. 2002;111(4):565-76.
20. Lanzi G, Moratto D, Vairo D, Masneri S, Delmonte O, Paganini T, et al. A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med*. 2012;209(1):29-34.
21. Albert MH, Notarangelo LD, Ochs HD. Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(1):42-8.
22. Schindelhauer D, Weiss M, Hellebrand H, Golla A, Hergersberg M, Seger R, et al. Wiskott-Aldrich syndrome: no strict genotype-phenotype correlations but clustering of missense mutations in the amino-terminal part of the WASP gene product. *Hum Genet*. 1996;98(1):68-76.
23. Greer WL, Shehabeldin A, Schulman J, Junker A, Siminovitch KA. Identification of WASP mutations, mutation hotspots and genotype-phenotype disparities in 24 patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Genet*. 1996;98(6):685-90.

24. Zhu Q, Watanabe C, Liu T, Hollenbaugh D, Blaese RM, Kanner SB, et al. Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype. *Blood*. 1997;90(7):2680-9.
25. Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, et al. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood*. 2010;115(16):3231-8.
26. Blundell MP, Worth A, Bouma G, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Dis Markers*. 2010;29(3-4):157-75.
27. Catucci M, Castiello MC, Pala F, Bosticardo M, Villa A. Autoimmunity in wiskott-Aldrich syndrome: an unsolved enigma. *Front Immunol*. 2012;3:209.
28. Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E, Quartier P, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, et al. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics*. 2003;111(5 Pt 1):e622-7.
29. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
30. Kumar S, Xu J, Perkins C, Guo F, Snapper S, Finkelman FD, et al. Cdc42 regulates neutrophil migration via crosstalk between WASp, CD11b, and microtubules. *Blood*. 2012;120(17):3563-74.
31. Howie SR. Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bull World Health Organ*. 2011;89(1):46-53.
32. Ochs HD. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein affect protein expression and dictate the clinical phenotypes. *Immunol Res*. 2009;44(1-3):84-8.
33. Jin Y, Mazza C, Christie JR, Giliani S, Fiorini M, Mella P, et al. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood*. 2004;104(13):4010-9.
34. Notarangelo LD, Miao CH, Ochs HD. Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(1):30-6.

35. Notarangelo LD, Mazza C, Giliani S, D'Aria C, Gandellini F, Ravelli C, et al. Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood*. 2002;99(6):2268-9.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização clínica e molecular de pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich

**Pesquisador:** Samuel de Souza Medina

**Área Temática:** Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 24548313.1.0000.5404

**Instituição Proponente:** Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 496.796

**Data da Relatoria:** 23/12/2013

##### Apresentação do Projeto:

No presente estudo, propõe-se caracterizar os pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich acompanhados no Hemocentro da Unicamp do ponto de vista do fenótipo clínico, bem como do genótipo e do nível de expressão da proteína WASP e sua chaperona WIP, procurando estabelecer as associações entre eles como forma de identificar precocemente os casos mais graves, elegíveis para tratamentos mais agressivos. Serão convidados a participar deste estudo todos os pacientes (n=10) com o diagnóstico de síndrome de Wiskott-Aldrich acompanhados no ambulatório de hemostasia do Hemocentro da Unicamp e todos os pacientes consecutivamente diagnosticados com esta síndrome, com base nas manifestações clínicas de trombocitopenia, infecções recorrentes e eczema. Será obtido termo de consentimento livre e esclarecido de todas as famílias que concordarem em participar do estudo, de acordo com a declaração de Helsinque. Amostras de sangue periférico serão coletadas de todos os casos-índice e de seus pais, quando disponível. Será realizada extração de RNA total e DNA genômico dos leucócitos do sangue periférico, que serão utilizados para a pesquisa de mutações no gene da proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) e no gene da proteína que interage com a WASP (WASP-interacting protein - WIP). Os leucócitos do sangue periférico também serão utilizados para a quantificação das proteínas WASP

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 125  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 496.796

e WIP através da técnica de citometria de fluxo. As informações laboratoriais obtidas serão comparadas com os dados clínicos dos pacientes, com o objetivo de estabelecer uma correlação entre o genótipo e o fenótipo da síndrome de Wiskott-Aldrich na população estudada.

**Objetivo da Pesquisa:**

O presente estudo tem como objetivo contribuir para a investigação da associação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich.

Objetivos Secundários: 1) Quantificar, através da técnica de citometria de fluxo, a expressão das proteínas WASP e WIP em leucócitos de sangue periférico dos pacientes portadores da síndrome de Wiskott-Aldrich (e suas variantes mais leves XLT e XLN) acompanhados no Hemocentro da Unicamp. 2) Nos casos em que houver ausência ou redução da expressão das proteínas WASP e/ou WIP, sequenciar completamente os respectivos genes para determinar o genótipo dos pacientes. 3) Investigar a associação entre as mutações encontradas nos genes das proteínas WASP e WIP, o nível de expressão das respectivas proteínas nos leucócitos do sangue periférico, e as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes, quantificadas segundo critérios de escores clínicos previamente publicados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os autores do projeto informaram que o risco pode ser considerado mínimo e relacionado, principalmente, ao desconforto e às complicações associadas a punção venosa periférica. Quanto aos benefícios, informaram que os participantes não serão beneficiados diretamente pela participação no estudo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto proposto justifica-se na possibilidade de uma melhor caracterização clínica e molecular dos pacientes portadores da síndrome de Wiskott-Aldrich o que poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes e para a adequada estratificação dos pacientes, possivelmente influenciando a tomada de decisões terapêuticas.

Os autores do projeto esclareceram a questão levantada pelo CEP (parecer 245.483) sobre o número de participantes, explicando que o n=10 refere-se ao número de casos índices e, portanto o número total de participantes é n=30 doadores de sangue para o estudo (casos índices e pais).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pelo pesquisador principal e pela coordenadora associada do Hemocentro-FCM-UNICAMP, instituição indicada como proponente;

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS  
MEDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 496.796

2. Termo de consentimento Livre Esclarecido (adequado);
3. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.
4. Projeto completo.

**Recomendações:**

Uma vez que o TCLE têm várias páginas, o participante ou o representante legal pelo participante da pesquisa e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular no 003/2011/CONEP/CNS).

Incluir o n=30 no formulário da Plataforma Brasil com o detalhamento do projeto

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os autores do projeto esclareceram a questão levantada pelo CEP (parecer 245.483) sobre o número de participantes, explicando que o n=10 refere-se ao número de casos índices e, portanto, o número total de participantes é n=30 doadores de sangue para o estudo (casos índices e pais). Dessa forma, o Formulário da Plataforma Brasil com as informações sobre o projeto também deve ser modificada, indicando o número correto de participantes no estudo.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O pesquisador deverá desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parcial e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 496.796

CAMPINAS, 17 de Dezembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Fátima Aparecida Bottcher Luiz**  
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

## ANEXO 2. Termo de consentimento livre e esclarecido.



Centro de Hematologia e Hemoterapia  
UNICAMP



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE : .....  
 REGISTRO HOSPITALAR -HC : ..... DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F   
 ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
 BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....  
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F   
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
 ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
 BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).

#### II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Caracterização clínica e molecular de pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich.**

PESQUISADOR: Samuel de Souza Medina CRM: 124.670 CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente

UNIDADE DA FCM - UNICAMP: Serviço de Hematologia e Hemoterapia – HEMOCENTRO UNICAMP

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

### III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:** Os médicos do Hemocentro da UNICAMP estão fazendo uma pesquisa chamada: **Caracterização clínica e molecular de pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich**. O objetivo é avaliar em todos os pacientes do hemocentro com essa síndrome qual é o nível de expressão de duas proteínas cuja falta pode levar ao aparecimento da doença (a WASP e a WIP), bem como avaliar qual é a mutação genética que causou o problema. Sabemos até agora que determinadas mutações (alterações do DNA) que causaram a doença estão mais relacionadas do que outras ao aparecimento de quadros mais graves. Neste estudo faremos a correlação entre as manifestações clínicas dos pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich e os níveis das proteínas WASP e WIP, com as alterações genéticas que causaram a doença.
- 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** se você/seu filho concordar em participar deste estudo, após a assinatura deste documento, o Termo de Consentimento, serão coletadas amostras de sangue (em torno de 20 mL de sangue no total) que serão utilizadas para quantificar o nível das proteínas WASP e WIP nas células do sangue. Uma amostra também será usada para obter o DNA e o RNA que serão utilizados para determinar qual o tipo de mutação (alteração genética) que causou a síndrome de Wiskott-Aldrich. Nenhuma alteração ou interferência em seu tratamento será feita em decorrência de sua participação nesse estudo. Um questionário, com perguntas sobre você/seu filho, o diagnóstico e evolução da sua doença, assim como alguns dados de sua família, será feito por seu médico, para que se possa entender melhor os resultados que esperamos encontrar. Você terá assegurado o direito de livre acesso aos resultados dos exames realizados nesse estudo.
- 3. Desconfortos e riscos esperados:** durante a coleta de sangue você/seu filho pode sentir dor. Pode ficar uma mancha roxa no local da coleta.

---

### IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.** Se você tiver qualquer dúvida ou pergunta sobre este estudo, você pode entrar em contato com o Hemocentro para esclarecimento.
- 2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.** Mesmo que você concorde em participar no estudo **Caracterização clínica e molecular de pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich**,

você pode mudar de idéia e se retirar do estudo a qualquer momento. Se você não quiser participar, você continuará a ser tratado normalmente aqui no Hemocentro da UNICAMP.

3. **Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.** Será mantido sigilo dentro dos limites da lei. Os arquivos de pesquisa do estudo serão identificados por um código numérico e este código vai ficar em lugar seguro, com acesso restrito aos médicos do Hemocentro da UNICAMP.
4. **Disponibilidade de assistência no Hemocentro da UNICAMP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.** Caso aconteça algum problema durante a coleta, você terá atendimento gratuito da equipe do Hemocentro da UNICAMP.

---

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO  
ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO.**

Em caso de qualquer intercorrência, entrar em contato com o Hemocentro da UNICAMP (Dr. Samuel de Souza Medina) pelos telefones 19. 3521-8256; 19. 3521-8760. Nos finais de semana, feriados e no período das 19h às 8h, ligar para 19. 3521-7246 no serviço de Transfusão do HC-UNICAMP.

Comitê de Ética em Pesquisa – FCM Tel.: 3521.8936

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar/ autorizo meu filho a participar do presente Protocolo de Pesquisa, intitulado: **Caracterização clínica e molecular de pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich.**

\_\_\_\_\_

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

assinatura de uma testemunha (não poderá ser médico)

\_\_\_\_\_

Data

\_\_\_\_\_

assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome legível)

\_\_\_\_\_

Data

**VII - CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DE DNA / RNA**

Obs: Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter seu DNA / RNA (de seu filho (a)) armazenado em nosso **Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia do Hemocentro da Unicamp**, assine seu nome diante da opção "SIM, aceito que meu DNA / RNA seja armazenado". Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Além disso, você poderá retirar o seu material biológico a qualquer momento da pesquisa. Caso não concorde, assine seu nome diante da opção "Não, não aceito que meu DNA / RNA seja armazenado".

[ ] SIM, eu aceito que meu DNA / RNA seja armazenado \_\_\_\_\_

[ ] NÃO, não aceito que meu DNA / RNA seja armazenado \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_  
local                      dia                      mês                      ano

## ANEXO 3. Artigo submetido para publicação.

### BMC Pediatrics

#### Intermittent low platelet counts hampering differential diagnosis of thrombocytopenia in children: report of two unrelated cases and a novel mutation in the gene of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	BPED-D-15-00226
<b>Full Title:</b>	Intermittent low platelet counts hampering differential diagnosis of thrombocytopenia in children: report of two unrelated cases and a novel mutation in the gene of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
<b>Article Type:</b>	Case report
<b>Section/Category:</b>	Genetics and congenital disorders
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p>Background: Thrombocytopenia is common during childhood and although immune thrombocytopenia is its most frequent cause, it is important to consider other conditions, especially when there is a persistent or recurrent low platelet count. We report two cases of intermittent thrombocytopenia, previously misdiagnosed as immune thrombocytopenia. Cases presentation: The first case was a boy with caucasian ethnic background who presented with mucocutaneous bleedings since the age of 9 months, and was diagnosed as immune thrombocytopenia. However, additional evaluation revealed intermittent thrombocytopenia, with a persistently low mean platelet volume. Peripheral blood smear revealed small platelets. Flow cytometry showed low expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein in leucocytes. Molecular analysis identified a mutation in exon 2 of the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene, leading to a p.Thr45Met amino acid change and confirming the diagnosis of X-linked thrombocytopenia. The second case was an afro-brazilian boy who presented with an incidentally diagnosed thrombocytopenia in the neonatal period, also diagnosed as immune thrombocytopenia. Notably, low mean platelet volume and small platelets were present. X-linked thrombocytopenia was further confirmed based on the low expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein in leucocytes, and the presence of a novel missense mutation in exon 2 of the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene, resulting in p.Pro58Leu amino acid change. Conclusion: These two rare presentations of thrombocytopenia highlight the importance of evaluating the peripheral blood smear in the presence of thrombocytopenia and show that failing to do so can lead to misdiagnoses. Since thrombocytopenia is common in daily pediatric outpatient clinic, increased awareness among general pediatricians will help to improve the differential diagnosis of this condition.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	Samuel Souza Medina, M.D. University of Campinas Campinas, São Paulo BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	University of Campinas
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Samuel Souza Medina, M.D.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Samuel Souza Medina, M.D. Lucia Helena Siqueira, BSc Marina Pereira Colella, M.D., PhD Gabriela Goes Yamaguti-Hayakawa, M.D. Bruno Kosa Lino Duarte, M.D.

	Maria Marluce Santos Viela, M.D., PhD
	Margareth Castro Ozelo, M.D., PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Opposed Reviewers:</b>	