

UEA

UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

JULIA CAVALCANTE DO CARMO

**FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM PÚRPURA
TROMBOCITOPÊNICA IMUNOLÓGICA DA FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAZONAS TESTADOS
CITOGENETICAMENTE PARA A SÍNDROME DE DELEÇÃO DO 22q11.2.**

**MANAUS
2015**

JULIA CAVALCANTE DO CARMO

**FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM PÚRPURA
TROMBOCITOPÊNICA IMUNOLÓGICA DA FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAZONAS TESTADOS
CITOGENETICAMENTE PARA A SÍNDROME DE DELEÇÃO DO 22q11.2.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin
Co-Orientador: Prof. Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa

MANAUS
2015

JULIA CAVALCANTE DO CARMO

**FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM A
SÍNDROME DE DELEÇÃO DO 22q11.2 ENTRE PACIENTES DIAGNOSTICADOS
COM PÚPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNOLÓGICA NA FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Dr. Cleiton Fantin Rezende

Dra. Mirian Silvia Rafael

Dra. Simone Schneider Weber

**MANAUS
2015**

Ficha Catalográfica
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UEA)

--

*Aos pacientes com Púrpura Trombocitopênica
Imunológica e Síndrome de Deleção 22q11.2.*

*“Ainda que eu falasse a língua dos
homens, e falasse a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria”.*

I Coríntios 13

AGRADECIMENTOS

Ao chegar aqui, há tanto e a tantos a quem quero agradecer!

Primeiramente a Deus que me deu o sopro de vida e essa chama em meu coração que faz eu seguir um sonho que sei que e me faz continuar pondo anjos em meu caminho.

Aos meus primeiros anjos, àqueles que tive o privilégio de chamar de “pais” Carmen e Jorge a eles devo tudo, minha vida, meu caráter, quem eu sou hoje, se não fosse por eles não teria chegado a metade de onde cheguei, eles me dão força, coragem, motivação tudo que os pais precisam dar para encorajar seus filhos no caminho certo, e o melhor, o caminho que eu decidi escolher, por mais difícil que seja para eles aceitarem as vezes, sei que eles estarão lá por mim sempre torcendo pela minha felicidade.

Ao meu esposo Gilvan que vive por mim, que me apoia com todo o seu amor e que vive a vontade de realizar meus sonhos junto comigo, ele que segura a barra dos momentos difíceis e que me deu força pra enfrentar tudo o que se passou nesse mestrado.

À minha família, a de perto e a de longe que sempre estão na torcida por mim e em especial aos meus avós que me envolvem de um amor incondicional e que me protegem com as suas orações.

Ao meu orientador, Cleiton, que acabou se tornando um amigo, pelos conselhos, ajuda, esforço e dedicação. Muitas vezes só em ver o quanto se importava com um problema nosso do projeto, me fazia continuar, mesmo desanimada. Gostaria de agradecer por tudo que pude aprender nesses dois anos e meio e pela confiança depositada em mim.

Ao meu co-orientador Rafael que é alguém que admiro muito. Agradeço toda paciência que teve comigo e toda ajuda que mesmo de longe pude contar sempre. Obrigada por aceitar esse desafio de co-orientar alguém sem experiência do outro lado do país e por confiar em mim. Serei eternamente grata e feliz por ter tido a oportunidade de trabalhar com um pesquisador como ele.

À equipe do Laboratório de Citogenômica animal (LACA) da UFAM. Principalmente a Natália que estava fins de semana e feriado me ajudando no laboratório. E Cláudia e

Carlos por me abrirem as portas do laboratório para que eu pudesse fazer o FISH e todo apoio me dado sempre que eu precisava.

À equipe do laboratório de Citogenética do Hemoam, Angela e Francymeire e Anny pela abertura do espaço, ensinamentos e apoio durante o projeto.

À equipe do laboratório de Genômica do HEMOAM pela ajuda com a extração do DNA dos pacientes.

Ao pessoal do SAME do Hemoam que sempre me ajudaram com os prontuários dos pacientes.

Aos médicos hematologistas do HEMOAM, por pacientemente me encaminharem os pacientes com PTI e principalmente a Renata que sempre estava a postos quando eu precisava tirar uma dúvida e pelo companheirismo durante parte do projeto.

À equipe do laboratório de genética da UFCSPA pelo treinamento e paciência. Em especial a Patrícia que nos ensinou tão bem e ao professor Paulo pelas dicas e conselhos.

Aos pacientes com PTI que tão de bom grado aceitaram participar da pesquisa, agradeço por tudo que aprendi com vocês.

À turma de mestrado pelas risadas e coleguismo. E, especialmente aos que se tornaram meus amigos mais próximos Katia, Marta, Paulo, Sarah e Lana obrigada por todo o companheirismo, pelas risadas e amizade.

À secretária do programa de mestrado, Rafaela, que se tornou uma amiga em tão pouco tempo e que me ajuda sempre de várias formas.

Aos meus amigos de perto e de longe que de alguma maneira me apoiaram durante essa pequena jornada.

À Universidade do Estado do Amazonas.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

À FAPEAM pela bolsa concedida.

À todos que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui.

RESUMO

As trombocitopenias surgem no sangue periférico quando a destruição, utilização ou sequestro das plaquetas excede a capacidade medular de produzir as mesmas. Dentre as causas de trombocitopenia está a púrpura trombocitopenica imunológica (PTI), uma condição caracterizada pela formação de autoanticorpos contra o sistema de antígenos plaquetários humanos. A PTI é considerada um dos achados descritos dentro do amplo espectro clínico da síndrome da deleção 22q11.2 (SD22q11.2). Conhecida também como síndrome velocardiofacial ou DiGeorge, a SD22q11.2 é uma condição autossômica dominante com expressividade variável, causada por uma deleção envolvendo a região 11.2 do braço longo (q) do cromossomo 22. Ela possui uma prevalência estimada de 1 para cada 2000 a 4000 nascidos vivos, o que faz dela uma das doenças genéticas mais frequentes em humanos. Quanto ao seu diagnóstico, o cariótipo de alta resolução possui limitações, pois é capaz de identificar menos de 15% dos pacientes afetados (a maior parte dos pacientes apresenta uma deleção muito pequena – uma microdeleção – que escapa à detecção através deste exame). Por isso, o teste considerado mais adequado para o diagnóstico em até 90% dos casos é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), uma técnica de citogenética molecular que se utiliza de sondas de DNA marcadas com corante fluorescente. A Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (HEMOAM) é um centro de referência no Estado na avaliação e tratamento de pacientes com PTI, nosso objetivo foi avaliar a frequência e as características clínicas de indivíduos com a SD22q11.2 entre pacientes diagnosticados com PTI nesta instituição.

Palavras-chave: Alterações hematológicas, Plaquetopenia, Trombocitopenia, Síndrome de deleção 22q11.2, Síndrome velocardiofacial, Síndrome de DiGeorge, Hibridização *in situ* fluorescente.

ABSTRACT

The thrombocytopenia arise in peripheral blood when the destruction, utilization or sequestration of platelets exceeds the spinal cord ability to produce them. Among the causes of thrombocytopenia there is the immune thrombocytopenic purpura (ITP), a condition characterized by the formation of autoantibodies against human platelet antigen system. PTI is considered one of the findings described in the broad clinical spectrum of the 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS), Also known as DiGeorge syndrome or velocardiofacial, the 22q11.2DS is an autosomal dominant condition with variable expressivity, caused by a deletion involving the region 11.2 of the long arm (q) of chromosome 22. It has an estimated prevalence of 1 per 2000-4000 live births, making it one of the most common genetic diseases in humans. The diagnosis has some limitations, high-resolution karyotype, for instance, has limitations because it is able to identify less than 15% of affected patients (most patients have a very small deletion - A microdeletion - that escapes detection by this test). Therefore, the test considered most suitable for the diagnosis is the fluorescence in situ hybridization (FISH), a molecular cytogenetic technique which uses DNA probes marked with fluorescent material. FISH is capable of detecting more than 90% of cases. Knowing that Foundation of Hematology and Hemotherapy of the State of Amazonas (HEMOAM) is a referral center in the state in the evaluation and treatment of patients with ITP, the aim of this study was to evaluate the frequency and clinical characteristics of individuals with 22q11.2DS among patients diagnosed with ITP in this institution.

Keywords: Hematological alterations, Thrombocytopenia, immune thrombocytopenic purpura, deletion syndrome 22q11.2, velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome, Fluorescence in situ hybridization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
Alterações Hematológicas.....	16
Alterações Plaquetárias	17
Púrpura Trombocitopênica Imunológica.....	19
Síndrome de deleção 22q11.2	20
Citogenética e FISH	23
Síndrome de deleção 22q11.2 e alterações plaquetárias	25
OBJETIVOS.....	27
Objetivo Geral	27
Objetivos Específicos	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO I	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Pacientes	36
Protocolo de Pesquisa	37
Técnica de FISH	38
Análise Estatística	38
RESULTADOS	38
Características clínicas dos pacientes	39
Análise Citogenética Molecular pela técnica de FISH.....	42
DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS.....	50
ANEXO 1 - Protocolo de Pesquisa adaptado do Serviço de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.....	50
ANEXO 2 - Ficha de Análise ao Microscópio – FISH.....	55
ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adaptado do Serviço de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.....	56

ANEXO 4 – Descrição da metodologia desenvolvida para extração do DNA adaptado aos padrões do laboratório de genômica - LABGEN da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas – HEMOAM.....57

ANEXO 5 – Parecer Consusbtanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP.

59

ANEXO 6 – Carta de Anuência da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas – HEMOAM65

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2), é uma doença causada por uma deleção na região 11.2 do braço longo do cromossomo 22, os portadores dessa síndrome apresentam um amplo espectro clínico, que inclui deficiência intelectual, alterações imunológicas, face atípica e anomalias cardíacas e de palato. Outras características frequentes são anomalias oculares e musculoesqueléticas, além de alterações anais, cerebrais e hematológicas (MALUF et al., 2011). Dentre as anomalias hematológicas descritas na SD22q11.2, encontra-se a púrpura trombocitopênica imunológica (PTI), uma desordem autoimune caracterizada pela baixa contagem de plaquetas e sangramento mucocutâneo (CINES & BLANCHETTE, 2002). Estima-se que a PTI seja 200 vezes mais comum entre os indivíduos portadores da SD22q11.2, do que na população em geral (LAWRENCE, 2003).

Para o diagnóstico seguro da SD22q11.2, a análise citogenética deve ser realizada através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH – do inglês *Fluorescent in situ Hybridization*), uma metodologia que reúne a citogenética clássica com a biologia molecular. O método utiliza de sondas de DNA marcadas com material fluorescente para detecção de regiões específicas do genoma (HOOVERS, 1999; RAFF & SCHWANITZ, 2001).

Contudo, o exame de FISH ainda é um método caro, não podendo ser assim solicitado tão facilmente como outros exames mais comuns. Este, não está atualmente disponível na rede pública. Além disso, o amplo espectro e a grande variabilidade fenotípica da SD22q11.2 tornam o diagnóstico clínico da síndrome um verdadeiro desafio. Nenhum achado é considerado patognomônico, ou observado em 100% dos casos.

A literatura, não relata estudos que avaliem a frequência e as características clínicas de indivíduos com PTI, testados citogeneticamente para a SD22q11.2.

A PTI é um achado clínico descrito dentro do espectro da SD22q11.2, o que nos leva a pensar que pacientes com essa doença hematológica seriam uma população de risco para esta síndrome. A identificação destes pacientes é fundamental, pois o seu diagnóstico precoce é bastante importante para a adequada avaliação, manejo clínico e aconselhamento genético, tanto deles como de suas famílias.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Alterações Hematológicas

As alterações hematológicas caracterizam-se por modificações ou falhas na produção das células sanguíneas. Sinais e sintomas frequentemente associados a elas incluem: astenia ou fraqueza; hemorragias; febre; adenomegalias; esplenomegalia e hepatomegalia; dor; icterícia; manifestações cutâneas e sintomas osteoarticulares, cardiorrespiratórios, gastrointestinais, geniturinários e neurológicos (PORTO et al., 2005).

As hemácias, também conhecidas como eritrócitos, são as células mais abundantes do sangue. Elas são constituídas de hemoglobinas e sua principal função consiste no transporte de oxigênio do pulmão para os tecidos. A concentração de hemácias no sangue de um homem saudável é em média de 5.200.000 de hemácias por milímetro cúbico (GUYTON E HALL, 2011).

Além do transporte de oxigênio, nosso corpo possui um sistema especial para combater as diferentes infecções e agentes tóxicos. Os leucócitos são as principais células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória, embora plaquetas e eritrócitos também participem. Os leucócitos são classificados em neutrófilos (40-75%), linfócitos (20-50%), monócitos (2-10%), eosinófilos (1-6%) e basófilos (<1%). Destes, os neutrófilos são os mais importantes na patogênese da inflamação. São as células predominantes nas primeiras 6 a 24 horas nas inflamações agudas (FRANCISCHETTI, 2010). As principais alterações que podem ocorrer nos leucócitos são a leucopenia (que ocorre ocasionalmente quando a medula óssea produz poucos leucócitos, deixando o corpo desprotegido contra bactérias e agentes infecciosos) e a leucemia (que é usualmente caracterizada por um número muito aumentado de leucócitos anormais no sangue circulante) (GUYTON & HALL, 2011).

As plaquetas, por sua vez, são células efetoras da hemostasia e altamente especializadas, de origem mieloide, que circulam no sangue como citoplastos anucleados em estado de repouso. Em resposta a sinais de ativação, seu fenótipo quiescente muda para uma célula efetora e versátil, desempenhando funções como adesão, agregação e formação do “tampão” hemostático. Elas participam também de processos adicionais, desempenhando um papel chave em processos

inflamatórios e de reparo vascular e tecidual. Além disso, participam da modulação do sistema imunológico. Por isso, podem estar envolvidas em reações autoimunes e desordens aloimunes (como, por exemplo, trombocitopenia imune, refratariedade transfusional, trombocitopenia aloimune fetal e neonatal, e púrpura pós-transfusional) (SEMPLE et al., 2011).

2.1. Alterações Plaquetárias

As plaquetas promovem hemostasia por quatro mecanismos interligados: (1) aderência aos locais de lesão vascular ou superfícies artificiais, (2) liberação de grânulos, (3) agregação em conjunto para formar um tampão hemostático de plaquetas, e (4) formação de uma superfície pró-coagulante ativada por complexos de proteínas de coagulação em suas membranas fosfolipídicas (BRASS et al., 1992).

A adesão plaquetária ao subendotélio é o passo inicial para a ativação das plaquetas. O subendotélio é composto de proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno, a fibronectina, o Fator de Von Willebrand (FVW), a trombospondina e a laminina. Estas proteínas adesivas são expostas, quando a camada endotelial é rompida. Devido ao grande número de proteínas na matriz extracelular e à alta densidade de receptores na superfície das plaquetas, a adesão de plaquetas em áreas de lesão vascular é extremamente rápida. O FVW é uma proteína grande, multimétrica, que se segrega para dentro da matriz extracelular de células endoteliais, facilitando a adesão de plaquetas por ligação à glicoproteína de superfície das plaquetas Ib/IX/V (SIEDLECKI et al., 1996). As plaquetas também podem se aderir à fibrina vascular associada à parede ou ao fibrinogênio, através da interação com a glicoproteína IIb/IIIa, que se encontra na superfície das plaquetas (SAVAGE et al., 1996).

Após aderir ao subendotélio, as plaquetas sofrem uma ativação no citoesqueleto, que leva a uma mudança de forma, com o desenvolvimento de pseudópodes. Processos de sinalização intracelular levam a um aumento do cálcio citoplasmático e, em seguida, a uma reação de liberação de grânulos alfa (fator de plaquetas 4, β -tromboglobulina, trombospondina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fibrinogênio, FVW) e de grânulos densos [adenosina difosfato (ADP), serotonina] (FUKAMI, 2001). As membranas circundantes dos grânulos contêm

muitas glicoproteínas integrais no seu folheto interno, tais como a P-selectina (CD62p), no grânulo alfa, e a gp53 (CD63), no lisossomo, que se tornam expressas na membrana externa das plaquetas após a reação de liberação (McEver, 1989). A liberação do ADP a partir de grânulos densos, em conjunto com a mobilização de cálcio, levam a uma alteração conformacional do receptor de fibrinogênio, no complexo do receptor da glicoproteína IIb/IIIa (integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$). Esta mudança conformacional do receptor de fibrinogênio inicia o processo de agregação, pois um receptor da glicoproteína IIb/IIIa plaquetária está ligada de forma homotípica para o mesmo receptor em plaquetas adjacentes, por meio de uma ponte de fibrinogênio molecular central. Ao lado do ADP, outros agonistas, como a adrenalina, a trombina, o colágeno e o fator ativador de plaquetas, podem iniciar a agregação plaquetária pela interação com receptores da membrana. Esta reação de liberação de plaquetas e recrutamento de diversas outras à parede do vaso, forma um tampão de plaquetas hemostático (PLOW et al., 1991).

As plaquetas ativadas também desempenham um papel pró-coagulante vital, que serve como um elo entre a função plaquetária e a ativação da coagulação. Os fosfolipídeos da membrana das plaquetas sofrem um rearranjo durante a ativação, com transferência de fosfatidilserina da parte interna para a externa, o que proporciona a formação de um sítio de ligação para os complexos de coagulação dependentes de fosfolipídeos que ativam tanto o fator X quanto a prototrombina (ZWAAL, 1993).

A plaquetopenia, também conhecida como trombocitopenia, caracteriza-se por contagens de plaquetas menores que $125 \times 10^9/\text{L}$ (FIRNHABER et al., 2010). Distúrbios hemorrágicos mediados por plaquetopenia geralmente resultam em um padrão de sangramento mucocutâneo, com equimoses petéquias, púrpura, epistaxes e sangramento gengival (MARCUS, et al., 1996). A púrpura é uma hemorragia visível na pele ou nas membranas mucosas (PIETTE, 2009). As púrpuras adquiridas, tais como as observados na coagulação intravascular disseminada, vasculite, ou infecções, podem geralmente ser distinguidas da disfunção plaquetária, pois os distúrbios de plaquetas costumam causar sangramento das membranas mucosas (púrpura "molhada"), enquanto na vascular a púrpura é normalmente confinada à pele (púrpura "seca") (LOWE et al., 1996).

Muitas drogas, como a aspirina, o ibuprofeno e a penicilina, podem afetar a função plaquetária (GEORGE et al., 1991). E a alteração dessa função também se

associa a diversas desordens sistêmicas, como doenças renais, reumáticas, mielodisplásicas, cardiovasculares e do tecido conjuntivo; insuficiência hepática e neoplasias (MHAWECH et al., 2000).

As plaquetopenias podem ser congênitas ou adquiridas. Elas podem ser também agrupadas pelo tamanho das plaquetas. Trombocitopenias com plaquetas pequenas podem ser vistas em pacientes com síndrome de Wiskott-Aldrich e com aplasia de medula. As raras desordens com macrotrombocitopenia são congênitas por natureza e a maioria delas é herdada de forma autossômica dominante. Alguns pacientes com destruição plaquetária adquirida, tais como aqueles com PTI, podem ter altos volumes plaquetários médios devido à rápida liberação de novas plaquetas. Contudo, em geral, nas doenças com macrotrombocitopenia as plaquetas são muito maiores e mais uniformes em tamanho (MHAWECH et al., 2000).

3.1. Púrpura Trombocitopênica Imunológica

A PTI é uma condição que ocorre secundária à sensibilização das plaquetas (WINIARSKI et al, 1986). Clinicamente, a PTI caracteriza-se pelo início abrupto de equimoses e petéquias; sangramentos mucosos ativos como epistaxe, gengivorragia, hematúria e sangramento gastrointestinal, além de hemorragia intracraniana (esta é considerada a principal causa de morte) (WATERS, 1992). Na história clínica, é frequente o relato de infecção viral ou de imunização uma a três semanas antes da apresentação inicial da PTI (LUSHER & ZUELZER, 1996).

A PTI pode ser dividida nas formas infantil e adulta. A PTI infantil é uma doença, em geral, aguda, autolimitada e com remissão espontânea no período de seis meses, independentemente do tratamento (LUSHER & ZUELZER, 1996). A idade de pico é de aproximadamente 5 anos. Meninos e meninas são afetados igualmente. Ela se caracteriza clinicamente pelo início repentino de petéquias ou púrpuras poucos dias ou semanas depois de uma doença infecciosa. (CINES & BLANCHETTE, 2002). Contudo, ao redor de 10 a 20% dos casos de PTI aguda evoluem para a forma crônica, com persistência ou recorrência da trombocitopenia (abaixo de $150.000/\text{mm}^3$), por um período de mais de seis meses (WALKER & WALKER, 1984). Este curso clínico é mais parecido com o observado em adultos (STASI et al., 1995). O início da doença nestes pacientes é geralmente insidioso, sendo que as mulheres são afetadas duas vezes mais que os homens (CINES &

BLANCHETTE, 2002). A remissão espontânea nos casos crônicos ocorre em uma proporção muito menor (WALKER & WALKER, 1984).

O diagnóstico da PTI ainda é realizado por exclusão. Os autoanticorpos levam à destruição das plaquetas, de forma que no esfregaço de sangue periférico se pode observar macrotrombocitopenia. Além disso, os autoanticorpos contra as glicoproteínas de superfície podem ser detectados por citometria de fluxo ou por imunoensaio, embora o diagnóstico seja em grande parte realizado a partir dos achados clínicos (WINIARSKI et al., 1986). Formas secundárias da doença ocorrem em associação com o lúpus eritematoso sistêmico, a síndrome do anticorpo antifosfolípideo (SAF), os estados de imunodeficiência (deficiência da IgA e da hipogamaglobulinemia comum), desordens linfoproliferativas (leucemia linfocítica crônica, leucemia linfocítica granular grande e linfoma), infecções com os vírus da imunodeficiência humana e hepatite C, e terapias com drogas, como a heparina e a quinidina (CINES & BLANCHETTE, 2002). Anormalidades envolvendo o gene *FCGR2C* têm sido relatadas em associação com a PTI (BREUNIS et al., 2008). Mais recentemente, tem-se visto também que a PTI se encontra fortemente associada à síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2) (ROSA et al., 2011), considerada uma das doenças genéticas mais comuns em humanos.

4.1. Síndrome de deleção 22q11.2

A síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2) [*Mendelian Inheritance in Man (MIM) 611867*] é uma das síndromes genéticas mais comuns em humanos, com uma prevalência estimada de 1:4000 a 6000 nascimentos (BOTTO et al., 2003; OSKARDOTTI et al., 2004). Contudo, alguns autores acreditam que esta frequência seja ainda maior, possivelmente superior a 1:2000 nascimentos (SHPRINTZEN, 2008). A alteração genética relacionada à SD22q11.2 foi identificada no começo da década de 1990. Contudo, considerando-se o quão comum e variável é a síndrome, não é de se surpreender que ela tenha sido descrita de forma independente em diferentes momentos e de diversas formas em várias partes do mundo (ROSA et al., 2009). Assim, a síndrome possui diferentes nomes, que correspondem às suas diversas descrições e apresentações clínicas e que espelha a sua grande variabilidade fenotípica: síndrome de DiGeorge (*MIM* 188400), síndrome Velocardiofacial, síndrome da anomalia facial conotruncal, síndrome de Sedlackova

e síndrome cardiofacial de Cayler (RYAN et al., 1997; ROBIN & SHPRINTZEN, 2005)

A deleção é descrita como esporádica em 90% dos casos e herdada de um dos genitores em 10% deles (McDonald-McGinnnet et al., 2001). A grande maioria dos pacientes (87%) apresenta uma deleção de tamanho de 3Mb (SAITTA et al., 2004). A identificação de uma deleção esporádica (sem outros casos na família) tem um baixo risco de recorrência (1-3%). No entanto, um indivíduo afetado tem um risco de 50% de transmitir a deleção à sua prole (NORA & NORA, 1983; MCDONALD-MCGINN et al., 1999).

A SD22q11.2 caracteriza-se por um espectro fenotípico bastante amplo, com efeitos fenotípicos que resultam no acometimento de praticamente todos os órgãos e/ou sistemas. Mais de 180 achados clínicos, tanto físicos como comportamentais, têm sido relatados, incluindo anormalidades craniofaciais, oftalmológicas, otorrinolaringológicas, odontológicas, alimentares, gastrointestinais, neurológicas, de desenvolvimento psicossocial e de função cognitiva, psiquiátricas, autoimunes, hematológicas, imunológicas, endocrinológicas, vasculares, musculoesqueléticas e geniturinárias (ROBIN & SHPRINTZEN, 2005). Nenhuma dessas manifestações, no entanto, é patognomônica ou obrigatória para síndrome, o que leva a grandes dificuldades para o estabelecimento do diagnóstico clínico (SHPRINTZEN, 2005). Contudo, algumas características são mais frequentes, como o palato fendido, a hipoplasia do timo e da glândula paratireoide, as dismorfias faciais, a voz nasalada, a dificuldade de aprendizagem, as doenças psiquiátricas e o déficit intelectual (BELANGERO et al., 2009). Na Tabela 1, podemos observar algumas características clínicas comuns entre os pacientes com a SD22q11.2, de acordo com a idade, segundo Rosa et al. (2009).

Tabela 1 – Frequência de características clínicas descritas em pacientes com a SD22q11 em diferentes estudos. Observar as diferenças entre as frequências dos achados fenotípicos de acordo com a idade (Retirado de Rosa et al., 2009).

Tamanho amostral (N)	Ryan et al. (1997)	McDonald-McGinn et al. (1999)	Cohen et al. (1999)	Óskarsdóttir et al. (2005)	Bassett et al. (2005)
	558	250	126	100	78
N – Idade	473: <18 anos 61: >18 anos	140: ≤5 anos 80: 6-16 anos 30: >16 anos	126: ≥18 anos	100: ≤19 anos	78: ≥17 anos
Achados clínicos (%)					
Cardiopatía congênita	75	74	30	64	26
RDNPM	68	ND	ND	96	ND
Hipocalcemia	60	49	15	16	64
Retardo de crescimento	36	41	ND	ND	21
Anomalias renais	36	37	ND	2	26
Déficit auditivo	33	39	ND	ND	28
Insuficiência velofaríngea	32	27	47	68	42
Crises convulsivas	21	ND	ND	ND	40
Agenesia/hipoplasia de timo	17	ND	ND	91	10
Atraso de fala	11	ND	ND	92	ND
Transtornos psiquiátricos	9	ND	36	20	58
Fenda palatina	9	11	ND	ND	31
Escoliose	3	2	ND	9	47
Membrana laríngea	1	ND	2	ND	ND
Trombocitopenia	ND	ND	12	ND	28
Hipotireoidismo	1	ND	1	ND	21
Estrabismo	ND	13	ND	ND	15

*RDNPM: retardo de desenvolvimento neuropsicomotor; ND: não determinado ou ausente.

Quanto ao diagnóstico da SD22q11.2, o cariótipo de alta resolução é limitado. Ele é capaz de identificar a deleção em menos de 15% dos pacientes afetados. O teste mais adequado para o diagnóstico é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que é capaz de detectar mais de 90% dos pacientes (ROSA et al., 2011).

5.1. Citogenética e FISH

A palavra cromossomo foi introduzida em 1888 por Waldeyer, a partir da junção das palavras gregas “croma” (colorido) e “soma” (corpo) (GERSENS et al., 2013). A citogenética é definida como o estudo dos cromossomos. Apesar das descobertas nas décadas subsequentes, ao longo do início do século XIX, o ano de 1956 foi considerado chave, quando Tjio e Levan, mostraram que o número correto de cromossomos em células somáticas humanas era $2n=46$ e não $2n=48$, como previamente descrito. Esta descoberta foi confirmada por estudos com materiais testiculares por Ford e Hamerton. A partir disso, houve o surgimento de um maior interesse pela citogenética humana, sendo que por volta de 1959 vários laboratórios já estavam engajados em estudos dos cromossomos humanos (ISCN, 2013).

No início dos anos 60, em duas conferências, a de Denver (1960) e de Londres (1963), vários profissionais da área reuniram esforços para tentar padronizar a nomenclatura dos cromossomos. Em 1966, ocorreu a identificação do cromossomo Filadélfia (Ph) em pacientes com leucemia mieloide crônica, por Nowell e Hungerford. Esta foi a primeira anormalidade cromossômica descrita em um câncer humano. Neste mesmo ano, Steele e Breg relataram que as células do líquido amniótico poderiam ser utilizadas para determinar a constituição cromossômica do feto (SMEETS, 2004).

Foi na década de 70 que a identificação individual dos cromossomos se modificou radicalmente, pois neste período ocorreu a introdução das técnicas de bandamento cromossômico por Carpersson e colaboradores. Isto permitiu a identificação dos cromossomos por seu padrão único de regiões de coloração mais ou menos intensas (bandas). Assim, as alterações numéricas e os rearranjos estruturais puderam ter um reconhecimento e diagnóstico mais precisos (CASPERSSON et al., 1970).

Ainda na década de 70, houve a introdução do uso da coloração/bandamento com Giemsa e das técnicas de alta resolução cromossômica. Em 1978, lançou-se o primeiro ISCN, o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (a última versão é de 2013), sendo o sistema de nomenclatura aceito atualmente em todo o mundo.

Já na década de 80, o desenvolvimento da biologia molecular contribuiu para o surgimento da citogenética molecular. Este método identifica pequenas deleções, duplicações cromossômicas e mapeia genes nos cromossomos. Na década de 90, ocorreu o desenvolvimento e implantação de uma variedade de técnicas de hibridização *in situ*, utilizando-se de sequências de DNA específicas. Em 1993, Wiegant e colaboradores desenvolveram uma técnica de hibridização que utilizava sondas marcadas com fluorocromos, o FISH. Este método permitiu aos citogeneticistas identificar segmentos de cromossomos e assim correlacionar a sua estrutura com a localização de genes, além de revelar anomalias que não podiam ser detectadas através das técnicas de bandamento, como a microdeleção 22q11.2 (ver Figura 01).

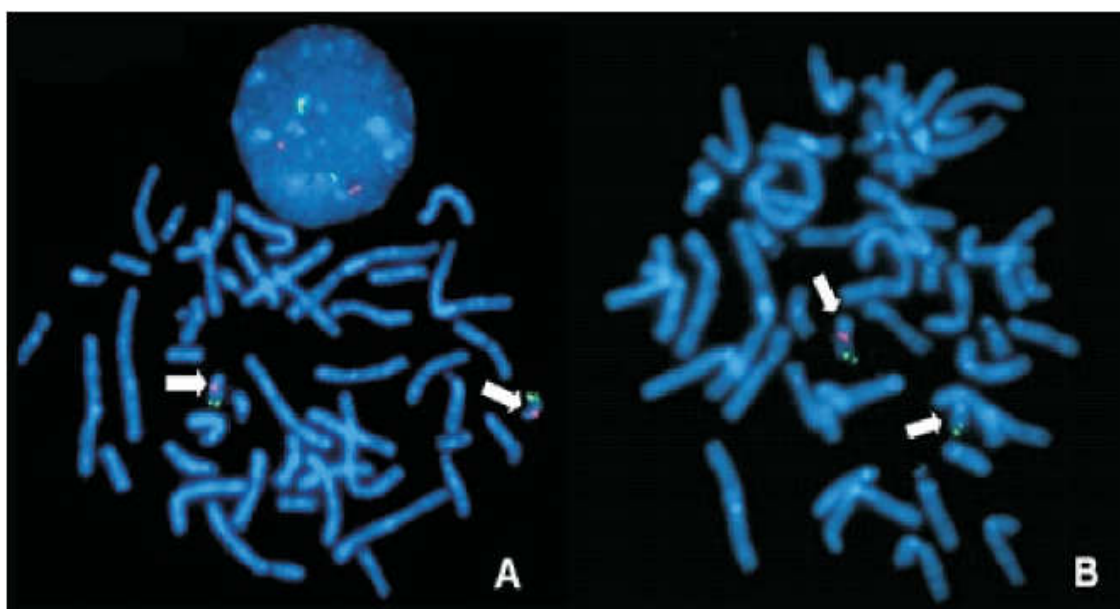


Figura 1. FISH - metáfase mostrando (A) os sinais esperados em ambos cromossomos 22 (padrão normal) e (B) ausência do sinal correspondendo à região 11.2 do braço longo (q) do cromossomo 22, compatível com a microdeleção 22q11.2 (as setas brancas indicam os cromossomos 22). Em (A) pode-se visualizar um núcleo interfásico com dois sinais vermelhos (padrão normal) (Retirado de Rosa et al., 2011).

6.1. Síndrome de deleção 22q11.2 e alterações plaquetárias

Dentro do amplo espectro clínico da SD22q11.2, podemos encontrar alterações hematológicas, incluindo plaquetárias. Segundo Rosa et al. (2011), apesar do pequeno número de estudos que descrevem mudanças hematológicas em indivíduos com a síndrome, essas podem ser mais comuns do que previamente pensadas.

Entre as alterações plaquetárias, a macrotrombocitopenia tem sido frequentemente descrita. No entanto, a mesma não tem sido correlacionada com defeitos cardíacos congênitos ou com achados imunológicos, que são duas características comumente encontradas em pacientes com a síndrome. Neste caso, a macrotrombocitopenia ocorre porque indivíduos com a SD22q11.2 apresentam deleção do gene *GPIb* em uma das cópias do cromossomo 22 e, por isso, são heterozigotos obrigatórios para a síndrome de Bernard-Soulier, uma desordem genética rara da coagulação que apresenta um padrão de herança autossômica recessivo. Este achado é consistente com a observação de que a macrotrombocitopenia é também descrita em pacientes heterozigotos para mutações do gene *GPIb*. Este gene codifica uma subunidade do receptor de plaqueta GPIb-IX-V, que é crítico para a adesão das plaquetas e importante para agregação e ativação da trombina (LAWRENCE et al., 2003, LIANG et al., 2007).

Pacientes com a SD22q11.2 apresentam uma queda significativa na contagem de plaquetas, enquanto seu tamanho e volume, é aumentado. Contudo, este não é tão marcado como na síndrome de Bernard-Soulier (LIANG et al., 2007). Além disso, os pacientes com a SD22q11.2 não manifestam um aumento de tendência de sangramento. O grau de trombocitopenia, que é mais pronunciado na síndrome de Bernard-Soulier, é considerado o preditor mais importante para o risco de sangramento (GEET et al., 1998). Entretanto, apesar de raros, casos de pacientes apresentando simultaneamente a SD22q11.2 e a síndrome de Bernard-Soulier têm sido descritos (SAVAGE et al., 1996; GEET et al., 1998; MHAWECH & SALEEM., 2000; LIANG et al., 2007; ROSA et al., 2011). Nestes, a síndrome de Bernard Soulier ocorre porque há deleção do gene *GPIb* em uma das cópias do cromossomos 22 (naquele com a microdeleção, o que faz o diagnóstico da SD22q11.2), enquanto que na outra cópia, sem deleção ou “íntegra”, há uma mutação do gene *GPIb* (GEET et al., 1998).

Relatos de pacientes com SD22q11.2 e trombocitopenia imunológica, com ou sem anemia autoimune hemolítica (isto é, síndrome de Evans), também já foram publicados. Estima-se que a PTI seja 200 vezes mais comum em indivíduos com a SD22q11.2 do que na população em geral (SULLIVAN, 2002). Acredita-se que isto esteja principalmente relacionado com a imunodeficiência, um achado bastante comum na síndrome (40-95% do pacientes) (AKAR & ADEKILE, 2007).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Verificar a frequência e caracterização clínica de indivíduos com a SD22q11.2 entre pacientes diagnosticados com PTI em um serviço de referência em Hematologia do Estado do Amazonas.

Objetivos Específicos

- Analisar a presença da deleção 22q11.2 através da técnica de citogenética molecular de FISH;

- Criar um biorrepositório a partir do DNA extraído do sangue periférico de sangue de cada paciente para pesquisa futura de fatores genéticos associados à PTI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAR, NA. ADEKILE, AD. **Chromosome 22q11.2 deletion presenting with immune-mediated cytopenias, macrothrombocytopenia and platelet dysfunction.** Medical Principles and Practice;16(4):318-20, 2007.

BELLAMY M.C., GEDNEY J.A. **Unrecognised iron deficiency in critical illness.** Lancet, 352, p. 1903, 1998

BELANGERO S, BELLUCO F, KULIKOWSKI L, CHRISTOLINI D, CERNACH M, MELARAGNO M. **Deleção 22q11.2 em pacientes com defeito conotruncal e fenótipo da síndrome da deleção 22q11.2.** Arquivo Brasileiro de Cardiologia v. 92 n. 4, p. 307 – 311, 2009.

BOTTO, LD. MAY, K. FERNHOFF, PM. CORREA, A. COLEMAN, K. RASMUSSEN, SA. RRRITT, RK O'LEARY, LA. WONG, L-Y. ELIXSON, EM. MAHLE, WT. CAMPBELL, RM. **A population-based study of the 22q11.2 deletion: Phenotype, incidence, and contribution to major defects in the population.** Pediatrics 112:101–107.

BRASS, L. F. R VASSALLO, R.R. JR., BELMONTE, E. AHUJA, M. CICHOWSKI, K. HOXIE J.A. **Structure and Function of the Human Platelet Thrombin Receptor.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 267, No. 20, Issue of July 15, pp. 13795-13798,1992

BREUNIS WB, VAN MIRRE E, BRUIN M, GEISSLER J, DE BOER M, PETERS M, ROOS D, DE HAAS M, KOENE HR, KUIJPERS TW. **Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura.** Blood. V. 111, p. 1029 - 1038, 2008.

CINES, DB. BLANCHETTE, VS. **Immune Thrombocytopenic Purpura.** New England Journal of Medicine. V. 346, No. 13, 2002.

FIRNHABER,C. SMEATON, L. SAUKILA, N. FLANIGAN,T. GANGAKHEDKAR R. KUMWENDA, J. LA ROSA, A. KUMARASAMY, N. GRUTTOLA, V., HAKIM, JG.

CAMPBELL, TB. **Comparisons of anemia, thrombocytopenia, and neutropenia at initiation of HIV antiretroviral therapy in Africa. Asia and Americas.** International Journal of infectious diseases, 2010.

FRANCISCHETTI, I; MORENO, JB. SCHOLZ, M. YOSHIDA, WB. **Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão.** Revista Brasileira de cirurgia cardiovascular. 25(4): 575-584, 2010

FUKAMI, MH. HOLMSEN, H. KOWALSKI, MA. NIEWIAROWSKI, S. COLMAN, RW. HIRSH, J. MARDER, VJ. CLOWES, AW. GEORGE, JN. **Platelet secretion. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.** 4th ed. Philadelphia, Pa: JB Lippincott Co; 561–574, 2001.

GEET CV, DEVRIENDT K, EYSKENS B, VERMYLEN J, HOYLAERTS MF. **Velocardiofacial syndrome patients with a heterozygous chromosome 22q11 deletion have giant platelets.** Pediatric Research; 44(4):607-11, 1998.

GEORGE, JN. SHATTIL, SJ. **The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function.** The New England Journal of Medicine. 324:27–39, 1991.

GERSEN, SL., KEAGLE, MB. **Principles of Clinical Cytogenetics.** 3 edição – Springer, 2013.

GUYTON, AC. E HALL, JE. **Tratado de Fisiologia Médica,** 12ª Edição. Editora Elsevier: São Paulo, 2011.

HOOVERS JM. **Fluorescence in situ hybridization in the study of chromosomal abnormalities** [Article in Dutch]. Ned Tijdschr Geneesk. 143:2265-2268. 1999;

ISCN (2013) **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.** Shafer LG, MCGOWAN-JORDAN, J. SCHMID, M.(eds) Basel: Karger.

KOBRYNSKI, LJ. SULLIVAN, KE. **Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes.** Lancet. 370:1443-52, 2007.

LAWRENCE, S. McDONALD-MCGINN, DM. ZACKAI, E. SULLIVAN, KE. **Thrombocytopenia in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome.** Journal of Pediatrics. 143(2):277-8,2003.

LEE, RG. FOERSTER, J. LUKENS, J. PARAKEVAS, F. GREER, JP. RODGERS, GM. **Wintrobe's Clinical Hematology.** 10 edicao - Maryland _USA, 1999.

LIANG HP, MOREL-KOPP MC, CURTIN J, WILSON M, HEWSON J, CHEN W, WARD, CM. **Heterozygous loss of platelet glycoprotein (GP) Ib-V-IX variably affects platelet function in velocardiofacial syndrome (VCFS) patients.** Thrombosis Haemostasis; 98(6):1298-308, 2007.

LORENZI, TF. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica.** 2 edicao - São Paulo: Medsi, 1999.

LOWE GDO. RATNOFF, OC. FORBES, CD. **Vascular disease and vasculitis.** Disorders of Hemostasis. 3rd ed. Philadelphia, Pa:WB Saunders; 489–504, 1996.

LUSHER, JM. ZUELZER, WW. **Idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood.** Medical Progress 68(6):971-9, 1966

MALUF, SW. RIEGEL, M. **Citogenética Humana.** 1 edição – Porto Alegre: Artmed, 2011

MARCUS, AJ. RATNOFF, OC, FORBES, CD. **Platelets and their disorders.** Disorders of Hemostasis. 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 79–137, 1996

MHAWECH, P. SALEEM, A. **Inherited giant platelet disorders: classification and literature review.** American Journal of Clinical Pathology. 113:176–190, 2000.

MCDONALD-MCGINN, DM. KIRSCHNER, R. GOLDMUNTZ, E. SULLIVAN, K. EICHER, P. GERDES, M. MOSS, E. SOLOT, C. WANG, P. JACOBS, I. HANDLER, S. KNIGHTLY, C. HEHER, K. WILSON, M. MING, JE. GRACE, K. DRISCOLL, D. MCDONALD-MCGINN, DM. TONNESEN, MK. LAUFER-CAHANA, A. FINUCANE, B. DRISCOLL, DA. EMANUEL, BS, ZACHAI, EH. **Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net!** Genetics in Medicine. 2001; 3: 23-9.

MCEVER, RP. BECKSTEAD, JH. MOORE. KL. MARSHALL-CARLSON, L. BAINTON, KF. **GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies.** Journal of Clinical Investigation. 84:92–99, 1989.

MEYER D, BAUMGARTNER HR. **Role of von Willebrand factor in platelet adhesion to the subendothelium.** British Journal Haematology. 54:1–9, 1983.

NORA, JJ. NORA, AH. **Genetic epidemiology of congenital heart diseases.** Prog Med Genet. V. 5: 91-137, 1983.

NUSSBAUM, ROBERT L. **Thompson & Thompson, genética médica.** 7 edição – Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLIVEIRA, HP. **Hematologia Clínica.** 3 edição - São Paulo:Livraria Atheneu Editora, 1990.

OSKARSDOTTIR S, VUJIC M, FASTH A. **Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden.** Archives Disease Child 2004; 89:148-51.

PASQUARIELLO, P. RANDALL, P. LAROSSA, D. EMANUEL, BS. ZACKAI, EH. **The Philadelphia Story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients.** Genetic Counseling. V10: 11-24, 1999.

PIETTE, WW. CALLEN, JP. JORIZZO, JL. BOLOGNIA, JL. ZONE, JJ. **Purpura: Dermatologic signs of internal disease.** 4th ed. London: Saunders Elsevier; 2009. p. 85–92.

PLOW EF, GINSBERG MH. Hoffman, R. Benz, EJ. Jr. Shattil, SJ. **The molecular basis of platelet function.** Hematology: Basic Principles and Practice. New York, NY: Churchill Livingstone; 1165–1176, 1991.

PORTO, CC. **Semiologia Médica.** 5 Edição – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

RAFF R, SCHWANITZ G. **Fluorescence in situ hybridization: general principles and clinical application with special emphasis to interphase diagnostics.** Indian Journal of Human Genetics, 1:65-75, 2001.

RAPAPORT, S. **Introdução à Hematologia.** 2 edição – São Paulo: Roca, 1990.

ROBIN, NH. SHPRINTZEN, RJ. Defining the **Clinical Spectrum of Deletion 22q11.2.** *The Journal of Pediatrics.* V 147, 1, p. 90–96, 2005

ROSA, FMR, ROSA, RCM. SANTOS, PPA., ZEN, PRG. PASKULIN, GA. **Hematological Abnormalities and 22q11.2 deletion Syndrome.** Revista Brasileira de Hematologia, v. 33(2) p. 151-154, 2011

ROSA FMR, TREVISAN P, KOSHIYAMA D, PILLA C, ZEN P, *et al.* **Síndrome de deleção 22q11 e cardiopatias congênitas complexas.** Rev Assoc Med Bras, v 57 n. 1, p. 62 – 65, 2011.

ROSA FMR, ZEN PRG, ROMAN T, GRAZIADIO C, PASKULIN G. **Síndrome de deleção 22q11.2: compreendendo o CATCH22.** Rev Paul Pediatr, v. 9 n. 27(2), p. 211 – 220, 2009.

ROSA R, PILLA C, PEREIRA V, FLORES J, GOLENDZINER E, *et al.* **Deletion syndrome in patients admitted to a cardiac pediatric intensive care unit in Brazil.** American Journal of Medical Genetics, v. 146A, p. 1655 – 1661, 2008.

RYAN, AK. GOODSHIP, JA. WILSON, DI. *et al.* **Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study.** Journal of Medical Genetics. 34:798–804, 1997.

SAITTA, SC. HARRIS, SE. GAETH, AP. DRISCOLL, DA. MCDONALD-MCGINN, DM. MAISENBACHER, MK. *et al.* YERSAK, JM. CHAKRABORTY, PK. HACKER, AM. ZACKAI, EH. ASHLEY, T. EMANUEL, BS. **Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion.** Human Molecular Genetics. 13: 417-28, 2004;

SAVAGE, B. SALDIVAR, E. RUGGERI, ZM. **Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor.** Cell. 84:289–297, 1996.

SEMPLE, JW. ITALIANO, JE. JR., FREEDMAN, J. **Platelets and the immune continuum.** Nature Reviews Immunology. 2011;11(4):264-74.

SIEDLECKI, CA. LESTINI, BJ. KOTTKE-MARCHANT, K. EPPELL, SJ. WILSON, DL. MARCHANT, RE. **Shear dependent changes in the three dimensional structure of human von Willebrand factor.** Blood. 88:2939–2950, 1996.

SCHAFFER AI. **Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders.** Blood. 64:1–12, 1984.

SHPRINTZEN RJ. **Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study.** Developmental Disabilities Research Reviews 2008;14:3-10

STASI R, STIPA E, MASI M, *et al.* **Long-term observation of 208 adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.** American Journal of Medicine 98:436-42; 1995.

VERRASTRO, T. **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica** / coordenação Therezinha Verrastro; colaboradores Therezinha F. Lorenzi, Silvano Wendel Neto – São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

WATERS AH. **Autoimmune thrombocytopenia: clinical aspects**. Seminars Hematology. 229(1):18-25, 1992.

WALKER, RW. WALKER, W. **Idiopathic thrombocytopenia, initial illness and long term follow up**. Archives of Disease in Childhood. 59:316-22, 1984.

WINIARSKI J, EKELUND E. **Antibody binding to platelet antigens in acute and chronic idiopathic thrombocytopenia purpura: a platelet membrane ELISA for the detection of antiplatelet antibodies in serum**. Clinical and Experimental Immunology. 63:459–465, 1986.

ZWAAL, RFA. COMFURIUS, P. BEVERS, EM. **Mechanisms and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes**. Biochemical Society Transactions 21:248–252, 1993.

CAPÍTULO I

FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM A SÍNDROME DE DELEÇÃO DO 22q11.2 ENTRE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM PÚPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNOLÓGICA NA FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAZONAS

Carmo, J.C¹.; Gross, M. C².; Prazeres, V. M. G³.; Zen, P. R. G⁴.; Rosa, R. F. M⁴.; Fantin, C¹.

1. Universidade do Estado do Amazonas, 2 Laboratório de Citogenômica Animal, 3 Universidade Federal do Amazonas, 4 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Resumo

A púrpura trombocitopenica imunológica (PTI) é uma anormalidade hematológica caracterizada pela formação de autoanticorpos contra o sistema de antígenos plaquetários humanos. Ela é considerada um dos achados descritos dentro do amplo espectro clínico da síndrome da deleção 22q11.2 (SD22q11.2). Conhecida também como síndrome velocardiofacial ou DiGeorge, a SD22q11.2. É uma condição autossômica dominante com expressividade variável, causada por uma deleção envolvendo a região 11.2 do braço longo (q) do cromossomo 22. É detectada por meio de exames de citogenética molecular, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Nosso objetivo foi avaliar a frequência e as características clínicas de indivíduos com a SD22q11.2 entre pacientes diagnosticados com PTI A Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (HEMOAM) que é um centro de referência no Estado para a avaliação e tratamento de pacientes com PTI. Para isso, realizou-se uma avaliação clínica e laboratorial dos pacientes, através da aplicação de um protocolo clínico padrão com coleta de dados relacionados à gestação, ao parto e à família dos indivíduos; realização de exame físico dismorfológico; revisão dos dados da avaliação hematológica e aplicação da técnica de FISH com pesquisa da microdeleção 22q11.2. A amostra final com 38 pacientes, dentre os quais, vinte e nove (76,3%) eram do sexo feminino, com idades de 3 a 69 anos (média de 33 anos). A maior parte dos pacientes apresentava PTI crônica (94,7%). A contagem de plaquetas variou de 3.000/mm³ a 140.000/mm³ (média de 52.947/mm³). Porém, a SD22q11.2 não foi identificada em nenhum paciente. Ao exame dismorfológico, 2 pacientes foram detectados com traços fenotípicos sugestivos da SD22q11.2. O método FISH não confirmou tal diagnóstico. Este foi o primeiro estudo a avaliar a frequência da SD22q11.2 entre indivíduos com PTI. Os resultados de nosso estudo sugerem a possibilidade de que a SD22q11.2 possa não ser tão frequente entre pacientes com a PTI quanto se acreditava. Contudo, nossos achados podem ter sido influenciados pelo pequeno tamanho amostral e pelo perfil de nossa amostra, com pacientes predominantemente adultos. Acreditamos que estudos com a inclusão de mais pacientes, apresentando especialmente idade mais precoce, são ainda necessários para se tentar melhor elucidar a relação da SD22q11.2 com a PTI.

1. INTRODUÇÃO

A desordem autoimune chamada púrpura trombocitopênica imunológica (PTI) caracteriza-se pela baixa contagem de plaquetas e por sangramento mucocutâneo. Estima-se que existam 100 casos por um milhão de pessoas por ano, sendo que metade deles ocorre em crianças (FREDERIKSEN & SCHMIDT, 1999; GEORGE et al, 1995).

Por sua vez, a SD22q11.2 [*Mendelian Inheritance in Man (MIM) 611867*] é considerada uma das síndromes genéticas mais comuns em humanos, com uma prevalência estimada de 1:4000 a 6000 nascimentos (BOTTO et al., 2003; OSKARDOTTI et al., 2004). Contudo, alguns autores acreditam que esta frequência seja ainda maior, possivelmente superior a 1:2000 nascimentos (SHPRINTZEN, 2008). A alteração genética relacionada à SD22q11.2 foi identificada no começo da década de 1990. Contudo, considerando-se o quão comum e variável é a síndrome, não é de se surpreender que ela tenha sido descrita de forma independente em diferentes momentos e de diversas formas em várias partes do mundo (ROSA et al., 2009). O seu espectro clínico é amplamente variável, com mais de 190 características clínicas já reportadas, incluindo doenças hematológicas e autoimunes, como a PTI (SHPRINTZEN, 2008; OSKARSDOTTIR et al, 2005).

A frequência da SD22q11.2 na população de pacientes com PTI ainda não foi relatada. Contudo, existem vários estudos descrevendo a presença de PTI em pacientes com a SD22q11.2 (LEVY et al; 1995; DePIERO et al, 1997; KATO et al, 2003; SCOTT et al, 2003; SAITO et al, 2003; KRATZ et al, 2003, & AKAR et al, 2007), sugerindo que a mesma possa ser muito mais frequente entre os indivíduos com a síndrome do que na população em geral (AKAR & ADEKILE, 2006; LIANG et al, 2007). Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a presença da SD22q11.2 em uma amostra aleatória de pacientes diagnosticados com PTI, tentando verificar a frequência dessa microdeleção e relacionar os achados clínicos desses pacientes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes

A amostra foi constituída por uma coorte prospectiva e consecutiva de pacientes com diagnóstico de PTI em consulta de rotina na Fundação de

Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (HEMOAM), durante o período de Novembro de 2014 a Abril de 2015. Essa Fundação é um centro de referência em doenças Hematológicas no Estado do Amazonas, atendendo também o Estado de Roraima, Brasil.

O diagnóstico de PTI foi realizado pelos médicos hematologistas do HEMOAM a partir dos resultados dos exames hematológicos, rotineiramente realizados na própria Fundação. Foram incluídos na amostra apenas pacientes que apresentavam trombocitopenia com nenhuma outra causa aparente, e que tinham passado por uma anamnese e exame físico, hemograma completo com exame de esfregaço periférico em conformidade com os critérios descritos pela Sociedade Americana de Hematologia (GEORGE et al., 1996).

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e do HEMOAM. Somente pacientes que assinaram o Termo de Consentimento de participação da pesquisa (e, no caso de menores de idade, seus responsáveis) foram incluídos na pesquisa.

2.2 Protocolo de Pesquisa

Para cada paciente, uma ficha de avaliação foi preenchida por uma enfermeira (JCC, principal investigadora do projeto), através de entrevista direta com os pacientes e familiares, e de revisão do prontuário hospitalar. A avaliação clínica dos pacientes foi realizada por uma médica geneticista (VMGP, colaboradora da pesquisa). Foram coletados dados referentes ao sexo, etnia, idade, procedência, motivo da avaliação e período de acompanhamento com o médico hematologista, época do diagnóstico da PTI, tipo de PTI (considerada aguda, com pacientes apresentando menos de dois meses de evolução, e crônica, quando este período foi superior a 6 meses) e história familiar de PTI. No exame físico, foram obtidas medidas antropométricas (altura/comprimento, peso e perímetro cefálico) que foram comparadas a tabelas específicas de crescimento (Jones, 2006). Foram considerados valores anormais aqueles que se encontravam dois desvios-padrões acima ou abaixo da média para a idade, com as devidas correções para o comprimento/altura de cada paciente. Quando presentes, dismorfias menores e maiores foram descritas de acordo com o segmento corporal envolvido (crânio, face,

olhos, nariz, boca, orelhas, tórax, abdome, membros superiores, membros inferiores e pele), seguindo a terminologia utilizada por Merks e cols. (2003).

2.3 Técnica de FISH

As lâminas para análise pela técnica de FISH foram preparadas a partir do material fixado (suspensão de células estocada em solução de Carnoy a -20°C, obtida a partir do cultivo de linfócitos de amostras de sangue periférico). Utilizou-se nos experimentos a sonda de DNA comercialmente disponível *DiGeorge/VCF5 (TUPLE 1) and 22q13.3 deletion Syndrome Probe combination* (Cytocell aquarius), seguindo um protocolo padrão de codensaturação, cedido pelo fabricante da sonda. Em cada caso, foram analisados 100 núcleos interfásicos e 20 placas metafásicas por meio do microscópio de epifluorescência Leica, equipado com os filtros *Texas Red, FITC e DAPI*. Esta contagem de metáfases exclui um mosaicismos de até 14% para um limite de confiança de 95% (Hook, 1977). Em casos com suspeita de mosaicismos, a contagem foi expandida para 500 núcleos interfásicos e 30 placas metafásicas. Toda a análise foi realizada pela mesma pessoa, no caso JCC, a principal investigadora do projeto. As imagens foram capturadas utilizando-se a câmera Leica DFC3000 G acoplada ao microscópio Leica DM2000. Núcleos interfásicos apresentando sobreposição, desgaste pelo tratamento químico, membranas rompidas ou um importante sinal de fundo, bem como placas metafásicas com alto sinal de fundo, incompletas ou muito próximas entre si foram excluídos da análise. Os resultados da técnica de FISH foram interpretados de acordo com as normas presentes no *International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2013)*.

2.4 Análise Estatística

O processamento e a análise dos dados foram realizados através dos programas SPSS para Windows (versão 20.0) e Microsoft® Excel 2010. Os testes estatísticos utilizados consistiram basicamente do cálculo da média e da mediana.

3. RESULTADOS

No período de 6 meses do estudo, foram atendidos 61 pacientes com diagnóstico de PTI pelos médicos hematologistas do HEMOAM. Destes, 41 (67,2%)

aceitaram participar do estudo. Em 3 casos (7,3%) não foi possível realizar o teste de FISH com sucesso. Desta forma, a amostra final foi constituída de 38 pacientes. Vinte e nove deles (76,3%) eram do sexo feminino, sendo que a idade dos pacientes da amostra variou de 3 a 69 anos (com uma média de idade de 33 anos). Quanto à etnia, 13 (34,2%) eram eurodescendentes. A maior parte dos pacientes (97,4%) foi procedente do próprio Estado do Amazonas, especialmente da capital (Manaus) (92,1%). Do restante, 2 (5,3%) pacientes foram oriundos do interior do Estado do Amazonas, da cidade de Itacoatiara, e 1 (2,6%) do Estado de Roraima, da capital Boa Vista.

A maioria dos pacientes (57,9%) foi encaminhada para o Serviço de Hematologia devido a um quadro plaquetopenia. Outros motivos incluíram: púrpuras (15,8%), suspeita de dengue hemorrágica (7,9%), petéquias (5,3%), menorragia (2,6%), pneumonia com hemorragia (5,3%) e tipagem Rh- (5,3%). Os médicos clínicos gerais encaminharam os pacientes em 63,1% dos casos. Os demais encaminhamentos foram realizados por médicos de outras áreas: pediatras (26,3%), hematologistas de fora do HEMOAM (2,6%), obstetras (5,3%) e dermatologistas (2,6%).

3.1 Características clínicas dos pacientes

O diagnóstico de PTI foi realizado em todos os casos através do hemograma com contagem de plaquetas e por exclusão de outras doenças. Quando necessário, foi solicitado pelo médico hematologista o mielograma para exclusão de outras doenças, como leucemia. Isto aconteceu em apenas um caso. Dos 38 pacientes, 36 (94,7%) apresentavam PTI crônica e 2 (5,3%), aguda. Não houve casos com história familiar positiva de PTI. Aos exames laboratoriais a contagem de plaquetas dos pacientes variou de 3.000/mm³ a 140.000/mm³ (média de 52.947/mm³) (GRÁFICO 01).

Gráfico 1. Contagem de plaquetas apresentada pelos pacientes da amostra. A mediana foi de 48.000/mm³.



Sete pacientes (18,4%) apresentavam descrição do tempo de sangramento, sendo que este variou de 12s a 5min e 2s. O tempo de trombina foi avaliado em 9 pacientes (23,7%), tendo o mesmo oscilado de 12 a 14,7s. No exame de tempo de trombotoplastina parcial ativada, 8 pacientes possuíam relato do mesmo, sendo que este tempo variou de 29 a 53,4s. O resultado do único medulograma realizado revelou a presença de hiperplasia megacariocítica.

Nas sorologias, 37 pacientes (97,4%) foram testados para o HIV, 34 (89,5%) para hepatite B, 34 (89,5%) para hepatite C, 19 (50%) para citomegalovírus e 11 (28,9%) para toxoplasmose.

Em relação à sua gestação, houve descrição de realização de pré-natal em 18 dos casos (47,3%). Destas, 2 (5,2%) apresentavam história de doença durante a gravidez (1 caso de anemia e 1 de pré-eclâmpsia). A maior parte dos pacientes (78,9%) nasceu de parto vaginal. Houve 3 casos de gêmeos, sendo que nenhum dos irmãos dos pacientes apresentava história também PTI.

Quanto ao exame físico dismorfológico, em 30 pacientes (78,9%) não foram observadas dismorfias. Anomalias observadas consistiram de fronte ampla (n= 1), pinçamento bitemporal (n= 1), face alongada (n= 1), hipertelorismo ocular/telecanto (n= 6), ponte nasal longa e alta (n= 1), ponte nasal achatada (n= 1) e lábio inferior grosso (n= 1). Dois pacientes (5,2%) apresentavam fenótipo sugestivo de SD22q11 (FIGURA 01).

Figura 01 – Paciente A apresentando pinçamento bitemporal, hipertelorismo, lábio inferior grosso e nariz com fenótipo compatível para SD22q11.2 (nariz proeminente com raiz nasal quadrada e base das asas estreitas). Paciente B apresentando telecanto e nariz com fenótipo compatível para SD22q11.2.



Avaliações complementares foram realizadas, nelas estão inclusas as avaliações neurológicas, otorrinolaringológicas e oftalmológicas, estas avaliações foram feitas segundo relatos dos pacientes na hora da entrevista, na maioria dos casos, os pacientes ainda não tinham nem tido contato com o especialista em questões, mesmo apresentando certo sintomas que seriam poderiam passar por uma avaliação mais aprofundada dos especialistas. Houve casos também em que os pacientes, não souberam relatar ou não lembravam de ter tido alguma alteração no momento da entrevista, esses foram marcados como “sem relato de problemas”. Os resultados obtidos nas avaliações complementares podem ser observados abaixo na tabela 02.

Tabela 02: Avaliações complementares dos pacientes diagnosticados com PTI.

AVALIAÇÕES COMPLEMENTARES		
Neurológica	Sem relato de problema	30
	Cefaléia	4
	Enxaqueca	1
	Esquecimento	1
	Parestesia nas mãos e língua	1
	AVC	1
Otorrinolaringológica	Sem relato de problema	27
	Rinite	3
	Sinusite	3
	Rinite e Sinusite Associados	2
	Amigdalite de Repetição	1
	Perda da audição direita	1
Oftalmológica	Sem relato de problema	24
	Catarata	5
	Miopia	5
	Miopia e astigmatismo	1
	Astigmatismo	1
	Miopia + leve grau de estrabismo	1
	Cegueira devido a Diabetes	

3.2 Análise Citogenética Molecular pela técnica de FISH

A microdeleção 22q11.2 não foi identificada em nenhum dos nossos pacientes testados. Não houve detecção nem de casos de mosaicismo. Houve também dois casos suspeitos de SD22q11, no entanto em ambos não foi detectada a microdeleção 22q11.2 (FIGURA 02 e 03).

Figura 02 – Resultado do exame de FISH. Núcleo interfásico apresentando um padrão de hibridização normal (sem microdeleção 22q11.2): presença de dois sinais verdes (correspondentes à região 22q13.3) e de dois sinais vermelhos (relacionados à região 22q11.2).

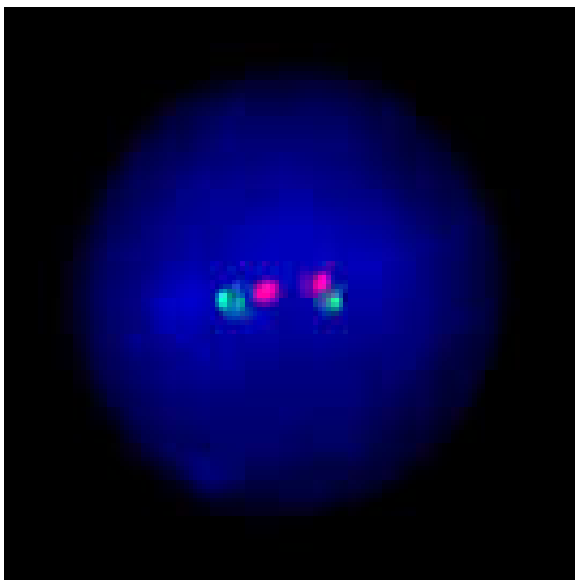
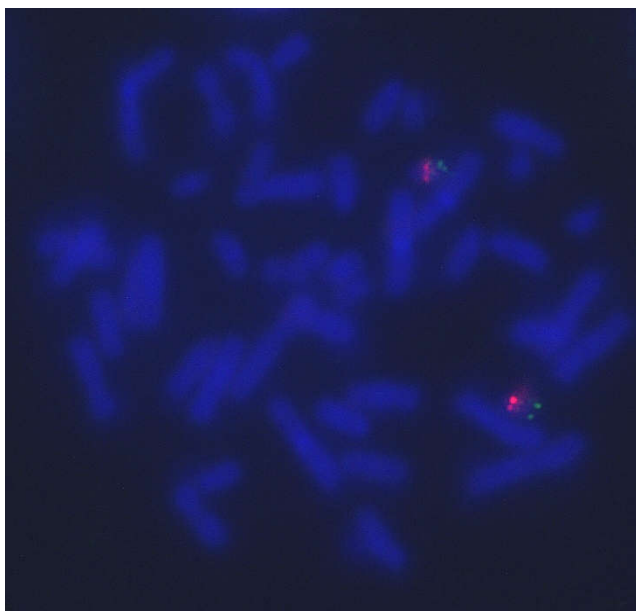


Figura 03 – Placa metafásica apresentando um padrão de hibridização normal (sem microdeleção 22q11.2): presença de dois sinais verdes (correspondentes à região 22q13.3) e de dois sinais vermelhos (relacionados à região 22q11.2).



4. DISCUSSÃO

A descoberta de uma doença genética em um paciente com uma enfermidade autoimune e de causa desconhecida como a PTI pode tanto trazer alívio para o paciente, por se saber de onde a enfermidade surgiu e assim porque aconteceu, como outras implicações para ele e para a equipe de saúde que o acompanha e trata.

A literatura mostra a descrição de vários pacientes com diagnóstico de SD22q11.2 associado à PTI (LEVY et al, 1997; DEPIERO et al, 1997; KATO et al, 2003; LAWRENCE et al, 2003; SAITO, 2004; KRATZ et al 2003; AKAR & ADEKILE, 2007; LATGER-CANNARD et al, 2004; ELMALLAH, 2011). Levy et al (1997) relataram duas famílias nas quais as mães apresentavam a deleção e foram diagnosticadas com PTI. Os autores comentam em seu relato que a trombocitopenia na época não era considerada uma manifestação clássica da SD22q11.2, apesar da descrição de casos da síndrome associados à síndrome de Bernard-Solier, uma condição hematológica rara caracterizada por trombocitopenia e plaquetas muito grandes. Contudo, é interessante notar que a síndrome de Bernard-Solier se associa a um defeito da glicoproteína 1b (GP1b), cujo gene se localiza dentro da região deletada na SD22q11.2 (BUDARF et al, 1995; LUDLOW et al, 1996). Levy et al (1997) postularam a hipótese de que os pacientes com a SD22q11.2, por apresentarem uma deficiência na função tímica, poderiam ter uma predisposição para doenças autoimunes, como a PTI.

DePiero et al (1997) descreveram o caso de dois pacientes com citopenias recorrentes, um de 15 anos que apresentou anemia hemolítica autoimune, PTI e neutropenia, e outro de 13 anos que apresentou episódios recorrentes de PTI. Eles, já na época sugeriram também que citopenias recorrentes poderiam fazer parte do espectro clínico associado à SD22q11.2. Os autores chamaram a atenção também para a demora da realização do diagnóstico da síndrome, devido ao fato dos demais achados clínicos dos pacientes serem bastante sutis. Por isso, recomendaram que o diagnóstico da SD22q11.2 fosse considerado em pacientes com citopenias de etiologia não conhecida. Kratz (2003) por sua vez relatou um caso de uma criança de 9 anos com SD22q11.2 e síndrome de Evans, uma condição caracterizada pela associação entre anemia hemolítica autoimune e PTI. Kratz sugeriu também que a SD22q11.2 fosse considerada nesses casos.

Estudos sugerem que a PTI seja cerca de 200 vezes mais comum em pacientes com a SD22q11.2 do que na população em geral (SULLIVAN, 2002). Kato et al (2003) verificaram uma frequência de PTI de 12,5% em uma amostra de 128 pacientes com a SD22q11.2. Os autores sugeriram que a alta frequência de PTI entre esses pacientes poderia ser o resultado em parte das anormalidades nas membranas das plaquetas, secundárias às alterações quantitativas da GPIb. Baseado nestas frequências e na prevalência estimada na população em geral tanto de PTI como de SD22q11.2 (BOTTO et al., 2003; OSKARDOTTI et al., 2004, SHPRINTZEN, 2008, CINES, 2002, ABRAHAMSON, 2009, BOTTON-MAGGS, 2015), esperávamos encontrar ao menos um indivíduo com a microdeleção em nossa amostra de 38 pacientes. Contudo, a SD22q11.2 não foi identificada em nenhum paciente de nossa amostra. Segundo nossa revisão da literatura, este foi o primeiro estudo a avaliar a frequência da síndrome entre indivíduos com PTI. Ao exame dismorfológico, 2 pacientes foram detectados com traços fenotípicos sugestivos da SD22q11.2. Contudo, a análise pela técnica de FISH não confirmou tal diagnóstico. A importância de um diagnóstico acurado da SD22q11.2 reside no fato de que tal informação nos auxilia tanto manejo dos pacientes como na determinação do seu prognóstico e realização do adequado aconselhamento genético do indivíduo e de sua família.

Nossos achados podem ser explicados devido ao pequeno tamanho amostral. Esta pode sem dúvida se constituir em uma limitação de nosso estudo. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de que certos fatores possam ter influenciado nossos resultados. Por exemplo, a maior parte dos pacientes de nossa amostra era adulta e portadora de PTI crônica. A média de idade dos pacientes foi de 33 anos (73% eram adultos). Sabe-se que pacientes com a SD22q11.2 muito frequentemente apresentam malformações maiores associadas, como anormalidades cardíacas complexas, que, pela sua gravidade, podem limitar a sua sobrevivência e, conseqüentemente, chegada até a idade adulta (SHPRINTZEN, 2008). De qualquer forma, acreditamos que estudos com a inclusão de mais pacientes são ainda necessários para se tentar melhor elucidar a relação da SD22q11.2 com a PTI.

5. CONCLUSÃO

Os resultados de nosso estudo sugerem a possibilidade de que a SD22q11.2 possa não ser tão frequente entre pacientes com a PTI quanto se acreditava. Contudo, talvez a detecção de pacientes com a síndrome possa ser [realizada](#) em estudos desenvolvidos com um número maior de indivíduos e com uma proporção maior de crianças (portadores de PTI aguda).

6. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSON, PE. HALL, SA. FEUDJO-TEPIE M. MITRANI-GOLD, FS. LOGIE, J. **The incidence of Idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review.** European Journal of Haematology 83: 83–89, 2009.

AKAR, NA. ADEKILE, AD. **Chromosome 22q11.2 deletion presenting with immune-mediated cytopenias, macrothrombocytopenia and platelet dysfunction.** Medical Principles and Practice;16(4):318-20, 2007.

BEAUCHESNE, LM. WARNES, CA. CONNOLLY, HM. AMMASH, NM. GROGAN, M. JALAL, SM. MICHELS, VV. **Prevalence and Clinical Manifestations of 22q11.2 Microdeletion in adults with selected conotruncal anomalies.** Journal of the American College of Cardiology: 45(4): 595-598, 2005

CINES, DB. BLANCHETTE, VS. **Immune Thrombocytopenic Purpura.** New England Journal of Medicine. V. 346, No. 13, 2002.

BOTTO, LD. MAY, K. FERNHOFF, PM. CORREA, A. COLEMAN, K. RASMUSSEN, SA. RITT, RK O'LEARY, LA. WONG, L-Y. ELIXSON, EM. MAHLE, WT. CAMPBELL, RM. **A population-based study of the 22q11.2 deletion: Phenotype, incidence, and contribution to major defects in the population.** Pediatrics 112:101–107, 2003.

BOLTON-MAGGS, PHB. **Idiopathic thrombocytopenic purpura.** Archives of Disease in Childhood; 83:220–222, 2000

BUDARF, ML. KONKLE, B. MICHAUD, D. LUDLOW, LB. MICHAUD, D. MENGRONG, L. YAMASHIRO, DJ. MCDONALD-MCGINN, D. ZACKAI, E. DRISCOLL, D. **Identification of a patient with Bernard-Soulier syndrome and a deletion in the DiGeorge/velo-cardio-facial chromossome region in 22q11.** Human Molecular Genetics 4:763-766, 1995

DePIERO, AD, LOURIE, EM. BERMAN, BW. ROBIN, NH. ZINN, AB. HOSTOFFER, RW. **Recurrent imune cytopenias in two patients with DiGeorge/velocardiofacial syndrome.** Journal of pediatrics; 131: 484-6, 1997.

ELMALLAH, MK. KHAN, Y. HOCHHAUS, G. SHUSTER, JJ. HENDELES, L. **Autoimmunity in a cohort of 130 pediatric patients with partial DiGeorge syndrome.** Journal of Allergy and Clinical Immunology; 128:5, 2011

FREDERIKSEN, H. SCHMIDT, K. **The incidence of idiopathic trombocytopenia purpura in adults increases with age.** Blood; 94: 909-13, 1999.

GEET CV, DEVRIENDT K, EYSKENS B, VERMYLEN J, HOYLAERTS MF. **Velocardiofacial syndrome patients with a heterozygous chromosome 22q11 deletion have giant platelets.** Pediatric Research; 44(4):607-11, 1998.

GEORGE, JN. EL HARAKE, MA. ASTER, RH. **Trombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms.** In: Beuter, E. Lichtman, MA. Collier, BA. Kipps, TJ. Eds. Williams hematology. 5th ed. New York: Mc Graw-Hill, 1315 – 55, 1995.

JONES, KL. **Smith's recognizable patterns of human malformation.** 7^a Edição – Philadelphia. Elsevier Saunders, 2013.

KATO, T. KOSAKA, K. KIMURA, M. IMAMURA, S. YAMADA, O. IWAI, K. ANDO, M. JOH-O, K. KUROE, K. OHTAKE, A. TAKAO, A. MOMMA, K. MATSUOKA, R. **Trombocytopenia in patients with 22q11.2 deletion syndrome and its association with glycoprotein Ib-beta.** Genetics in Medicine; 5(2): 113-9, 2003.

KRATZ, CP. NIEHUES, T. LYDING, S. HEUSCH, A. JANSSEN, G. GÖBEL, U. **Evans syndrome in a patient with chromosome 22q11.2 deletion syndrome: a case report.** Pediatric Hematology and Oncology; 20(02):167-72, 2003.

LATGER-CANNARD, V. BENSOUSSAN, D. GREGORIE, M-J. MARCON, F. CLOEZ, J-L. LEHEUP, B. JONVEAUX, TL. BORDIGONI, P. **Frequency of thrombocytopenia and large platelets correlates neither with conotruncal cardiac anomalies nor immunological features in the chromosome 22q11.2 deletion syndrome.** European Journal of Pediatrics; 163: 327-328, 2004.

LAWRENCE, S. McDONALD-MCGINN, DM. ZACKAI, E. SULLIVAN, KE. **Thrombocytopenia in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome.** Journal of Pediatrics. 143(2):277-8, 2003.

LÉVY, A. MICHEL, G. LEMERRER, M. PHILIP, N. **Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in two mothers of children with DiGeorge Sequence: A new componente manifestation of deletion 22q11?** American Journal of Medical Genetics; 69:356-359, 1997.

LIANG HP, MOREL-KOPP MC, CURTIN J, WILSON M, HEWSON J, CHEN W, WARD, CM. **Heterozygous loss of platelet glycoprotein (GP) Ib-V-IX variably**

affects platelet function in velocardiofacial syndrome (VCFS) patients. Thrombosis Haemostasis; 98(6):1298-308, 2007.

MERKS, JHM. VAN KARNEBEEK, CDM. CARON, HN. HENNEKAM, RC. **Phenotypic abnormalities: terminology and classification.** American Journal of Medical Genetics. 123(3):211-230, 2003

OSKARSDOTTIR S, VUJIC M, FASTH A. **Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden.** Archives Disease Child; 89:148-51, 2004

OSKARSDOTTIR, S. PERSSON, C. ERIKSSON, BO. FASTH, A. **Presenting phenotype in 100 children with 22q11 deletion syndrome.** Europe Journal pediatric; 164:146-53, 2005.

SAITO, M. ISHIKAWA, T. YOSHINORI, I. SHIMIZU, H. **Hematological abnormalities in a patient with a 22q11.2 deletion.** Brain & Development; 26: 342-344, 2004.

SHPRINTZEN, RJ. **Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study.** Developmental disabilities research reviews; 14:3-10, 2008

SULLIVAN, KE. **Immunologic issues in VCFS / chromosome 22q11.2 deletion syndrome.** Progress in Pediatric Cardiology: 15: 103-108, 2002

3. ANEXOS

ANEXO 1 - Protocolo de Pesquisa adaptado do Serviço de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

Identificação

1. Ficha (Pesquisa): _____ Prontuário (HEMOAM):

2. Idade na avaliação: _____ anos _____ meses DN: ____ / ____ / ____
3. Sexo: 1. Masculino 2. Feminino
4. Etnia: 1. Caucasoide 2. Negroide 3. Mista 4. Outra
5. Endereço: _____
6. Telefone de contato: _____
5. Motivo do encaminhamento: _____
6. Encaminhado pelo (Especialidade): _____
7. Profissão paterna: _____ Profissão materna: _____

História gestacional

1. Pré-natal: 1. Sim 2. Não
2. Gemelaridade: 1. Sim 2. Não
- Gêmeos: 1. Monozigóticos 2. Dizigóticos
3. História de fertilização in vitro: 1. Sim 2. Não
3. Doenças maternas: _____
4. Época das doenças (mês): 1 2 3 4 5 6 7 8 9
5. Drogas/fármacos na gestação: _____
6. Época do uso das drogas (mês): 1 2 3 4 5 6 7 8 9
7. Outros agentes: _____
8. Época dos agentes (mês): 1 2 3 4 5 6 7 8 9
9. Ameaça de aborto: 1. Sim 2. Não
10. Época da ameaça (mês): 1 2 3

(...continuação)

11. Trabalho de parto prematuro: 1. Sim 2. Não
12. Época (mês): 4 5 6 7 8 9
13. Ultra-som obstétrico: 1. Sim _____ 2. Não

Obs.1: _____

História do parto-perinatal

1. Tipo de parto: 1. Vaginal 2. Cesariana _____
2. Apresentação fetal: 1. Cefálica 2. Pélvica 3. Transversa
3. Idade gestacional: 1. <37 sem. 2. 37-42 semanas 3. >42 semanas

Dados do nascimento

Peso: _____ gramas (P_____) Comprimento: _____ cm (P_____)
 Perímetro cefálico: _____ cm (P_____) Perímetro torácico: _____ cm (P_____)
 Apgar 1': _____ Apgar 5': _____

História familiar

1. Idade do pai: _____ Idade da mãe: _____ (ao nascimento)
2. História familiar de PTI: 1. Sim 2. Não
3. Consanguinidade entre os pais: 1. Sim 2. Não
4. Número total de gestações: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 _____
5. Ordem do nascimento: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 _____
6. Número de partos: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 _____
7. Número de cesarianas: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 _____
8. Número de abortos espontâneos: 1 2 3 _____
9. Número de abortos provocados: 1 2 3 _____
10. Número de nativos: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 _____
11. Número de natimortos: 1 2 3 _____
12. Sexo do natimorto: 1. M 2. F 3. Indeterminado 4. Desconhecido

(...continuação)

Exame físico

1. Medidas antropométricas (na avaliação):

Altura: ____ cm (P____) # Peso: ____ Kg (P____) # PC: ____ cm (P____)
 DII: ____ (P____) DIE: ____ (P____) CMao: ____ (P____) CDedoMedio: ____ (P____)

2. Exame Físico/Dismorfológico:

I. ANORMALIDADES CRANIOFACIAIS

CRÂNIO: _____

FACE: _____

OLHOS: _____

NARIZ: _____

BOCA: _____

ORELHAS: _____

II. TORAX: _____

III. ABDOME: _____

IV. ANOGENITAL: _____

V. MEMBRO SUPERIOR: _____

VI. MEMBRO INFERIOR: _____

VI. PELE E ANEXOS: _____

OUTRAS: _____

Exames e avaliações complementares

Avaliação Oftalmológica: _____

Avaliação Otorrinolaringológica: _____

Avaliação Neurológica: _____

Ecocardiografia: _____

Raio-X de coluna: _____

Avaliação Hematológica:

Contagem de plaquetas: _____

Tempo de sangramento: _____

Tempo de protrombina: _____

(...continuação)

Tempo de tromboplastina parcial ativada: _____

Medulograma: _____

Sorologias

HIV	1. Positiva	2. Negativa
Vírus da hepatite B	1. Positiva	2. Negativa
Vírus da hepatite C	1. Postiva	2. Negativa
Citomegalovírus	1. Positiva	2. Negativa
Mononucleose	1. Positiva	2. Negativa
Toxoplasmose (se criança)	1. Positiva	2. Negativa

Púrpura trombocitopênica imunológica (PTI):

Tipo:	1. Aguda (< 2 meses)	2. Crônica (> 6 meses)
Causa medicamentosa?	1. Sim	2. Não
Síndrome paraneoplásica?	1. Sim	2. Não
Síndrome mielodisplásica?	1. Sim	2. Não
Lúpus eritematoso sistêmico?	1. Sim	2. Não
Tireoidopatia?	1. Sim	2. Não

Outros:

Desenvolvimento neuropsicomotor

*RDNPM: 1. Não 2. Sim

* Fisioterapia/ terapia ocupacional: 1. Não 2. Sim: _____

Sorriso social: _____ Sustentou a cabeça: _____ Sentou com apoio: _____

Sentou sem apoio: _____ Ficou em pé: _____ Engatinhou: _____

Andou com apoio: _____ Andou sem apoio: _____ Controle esfinteriano: _____

Fala/ Linguagem

*Atraso de fala: 1. Não 2. Sim

*Fonoaudiologia: 1. Não 2. Sim: _____

(...continuação)

Sons: _____ Dissílabas: _____ Palavras: _____

Frases incompletas: _____ Frases completas: _____

Aprendizagem

Escola especial: 1. Não 2. Sim: _____

Entrou na escola (série atual): _____

Repetências: _____

Evolução Intercorrências: _____

ANEXO 2 - Ficha de Análise ao Microscópio – FISH

22q11 FISH

Data: _____ Am: _____ Ensaio FISH: _____ Microscópio: _____

Localização inicial: _____ Localização final: _____

NÚCLEOS INTERFÁSICOS

R	G			
1	1			
1	2			
2	1			
2	2			

Imagens	Comentários
Comentários:	

METÁFASES

M#	Localização	Imagem	Sinal			M#	Localização	Imagem	Sinal		
			N						N		
1						11					
2						12					
3						13					
4						14					
5						15					
6						16					
7						17					
8						18					
9						19					
10						20					

Comentários do Revisor

X (R) = vermelho • (G) = verde

ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adaptado do Serviço de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

A síndrome de deleção 22q11.2, ou velocardiofacial/DiGeorge é uma doença genética comum causada pela falta de um pedaço bastante pequeno de material genético (DNA) em um dos nossos cromossomos (o de número 22). Ela é uma alteração que pode se acompanhar de defeitos/problemas ao nascimento e, em algumas famílias, envolver um risco maior de acontecer novamente em futuras gestações. Problemas envolvendo o sangue parecem também ser comuns, incluindo a doença das plaquetas chamada púrpura trombocitopênica imunológica. Assim, o trabalho “**Frequência e caracterização clínica de indivíduos com a síndrome de deleção 22q11.2 entre pacientes diagnosticados com púrpura trombocitopênica imunológica na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas**” tem o objetivo de verificar a frequência e caracterização clínica de indivíduos com a síndrome de deleção 22q11.2 entre pacientes diagnosticados com púrpura trombocitopênica imunológica.

Após a realização do consentimento informado, você ou seu(sua) filho(a) será submetido(a) a uma avaliação clínica, com coleta de dados sobre a sua gestação, o seu parto e a sua história familiar, além de um exame físico detalhado. Também após a sua permissão por escrito, será feita uma documentação fotográfica de você ou seu filho, com o objetivo de complementar a avaliação clínica (para comparação das características físicas com programas de computador utilizados para estudar as doenças genéticas). As imagens serão também utilizadas na publicação de artigos científicos em revistas médicas. O nome do(a) paciente e seus familiares não serão divulgados.

Você também será perguntado a consentir sobre a coleta de uma amostra de 6 mL de sangue de você ou do seu filho, que será utilizada para extração de DNA e análise genética do cromossomo 22. Esta tem como objetivo tentar entender melhor a doença, no caso a púrpura. O DNA extraído será utilizado apenas em estudos sobre a origem genética da púrpura trombocitopênica imunológica. As complicações da coleta de sangue são raras e geralmente pequenas, podendo ocorrer alguma dor ou certo desconforto em decorrência da picada da pele. A sua amostra ou de seu(sua) filho(a), bem como os dados clínicos e as fotos, serão confidenciais e utilizados exclusivamente neste projeto. Nenhum outro teste ou pesquisa será feito sem a sua permissão ou de seu filho por escrito, sendo que também não haverá nenhum custo para vocês para a realização destes exames. Os resultados da análise do cromossomo 22 serão fornecidos aos pacientes ou responsáveis, o que também será de grande benefício para sua avaliação e acompanhamento. No caso de identificação de necessidade de avaliação e acompanhamento com a Genética Clínica, você ou seu(sua) filho(a), caso não estejam em atendimento, poderão ser encaminhados a locais que possam oferecer este serviço.

Existe a possibilidade de que a participação neste estudo possa fazer você ou o(a) seu(sua) filho(a) se sentirem emocionalmente desconfortáveis. **A sua participação ou de seu(sua) filho(a) é inteiramente voluntária.** *Você tem o direito de não fazer parte, ou mesmo de pedir desistência na participação desta pesquisa sem que isso represente qualquer forma de prejuízo para o seu atendimento ou do(a) seu(sua) filho(a) dentro da Instituição onde o projeto está sendo realizado.* Não se dará qualquer informação genética sobre você ou o seu(sua) filho(a) e sua família, a outros membros da família, ou a terceiros sem a sua permissão por escrito. Os resultados da avaliação dos cromossomos serão disponibilizados a você ou aos pais do(a) paciente.

“Pelo presente Consentimento Informado, eu declaro que fui informado de forma clara, detalhada e livre de qualquer constrangimento ou obrigação, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que eu ou meu filho(a) será submetido(a), bem como dos riscos, desconfortos e benefícios do presente trabalho. Tive também a oportunidade de discutir e fazer perguntas sobre a pesquisa. Eu e/ou meu(minha) filho(a) voluntariamente concordamos em participar deste estudo”.

Nome e RG do paciente

Nome do responsável

Assinatura do responsável

Grau de parentesco e RG do responsável

Nome do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador responsável

O responsável por este projeto de pesquisa é Julia Cavalcante do Carmo (Fones: 81405674/ 96227021).

* Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa: 36550100

Manaus, ____/____/____.



Impressão do dedo polegar caso o paciente não saiba assinar

ANEXO 4 – Descrição da metodologia desenvolvida para extração do DNA adaptado aos padrões do laboratório de genômica - LABGEN da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas – HEMOAM

7.

FASE (1-7) - Antes da extração de DNA, realizou-se primeiramente a separação dos leucócitos;

FASE (2-7) - fazendo-se a centrifugação do sangue extraído em tubo de EDTA, a 1.000 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos;

FASE (3-7) - Após, retirou-se 500 mL da camada leucocitária, que foi transferido para um eppendorf de 1,5 mL e acrescentando 1 mL de tampão de lise de hemácias;

FASE (4-7) - Depois, colocou-se o eppendorf no gelo por 30 minutos;

FASE (5-7) - Depois de meia hora, a amostra foi colocada em uma centrífuga refrigerada a 4°C por 10 minutos;

FASE (6-7) - Em seguida foi realizada a retirada do sobrenadante e acrescentado mais 1 mL de tampão de lise, para novamente ser centrifugada a 4°C por 10 minutos até se obter um *pellet* claro;

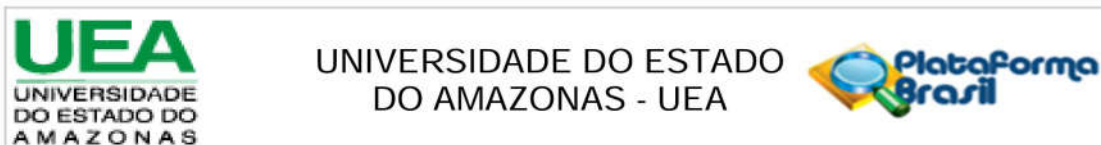
FASE (7-7) - O material foi armazenado a -20°C.

Para a extração de DNA, utilizou-se o seguinte protocolo:

- pipetou-se 200 µL (microlitros) da amostra de leucócitos em um microtubo de 2 mL;
- Adicionou-se 400 µL de Brazol gelado (4°C) e agitou-se no vórtex até a amostra adquirir um aspecto homogêneo;
- Após, adicionou-se 100 µL de clorofórmio gelado (4°C) e misturou-se no vórtex até a amostra adquirir uma coloração de “chocolate”;
- Centrifugou-se a seguir o material por 12 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente;
- Após a centrifugação, retirou-se o microtubo cuidadosamente da centrífuga e verificou-se se a solução estava dividida em 2 partes;
- A seguir, pipetou-se cuidadosamente a fase superior (sobrenadante) e transferiu-se a mesma para tubos de 1,5 mL devidamente identificados;

- Na fase de precipitação do DNA genômico, adicionou-se 500 μL de etanol gelado a 100% (armazenado a 4°C), homogeneizou-se o material no vórtex e observou-se a formação de um precipitado;
- Este foi usualmente visualizado após 30 a 60 segundos;
- Centrifugou-se por 15 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente;
- Decantou-se o sobrenadante e adicionou-se novamente 500 μL de etanol a 100% gelado (armazenado a 4°C);
- A seguir, centrifugou-se o material por 12 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente;
- O sobrenadante foi decantado e removeu-se o etanol residual com o uso de uma pipeta e colocou-se o material no banho seco a 56°C por 10 minutos;
- Após, adicionou-se 100 μL de água destilada estéril em cada tubo;
- O DNA genômico foi quantificado utilizando-se do equipamento vDrop1000;
- Após a quantificação, o DNA purificado foi armazenado a -20°C.

ANEXO 5 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FREQUENCIA E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM A SÍNDROME DE DELEÇÃO 22Q11.2 ENTRE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNOLÓGICA NA FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAZONAS

Pesquisador: Julia Cavalcante do Carmo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31253914.9.0000.5016

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 803.634

Data da Relatoria: 24/09/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo prospectivo, transversal e observacional, onde será avaliada a frequência e as características clínicas de indivíduos com a SD22q11.2 entre pacientes diagnosticados com PTI na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (HEMOAM. Realizar-se-á uma avaliação clínica e laboratorial de 50 pacientes, através da aplicação de um protocolo padrão com coleta de dados relacionados à gestação, parto e família dos indivíduos; realização de exame físico dismórfico; revisão dos dados da avaliação hematológica e aplicação da técnica de FISH com pesquisa da microdeleção 22q11.2.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar a frequência e caracterização clínica de indivíduos com a SD22q11.2 entre pacientes diagnosticados com PTI em um serviço de referência em Hematologia do Estado do Amazonas.

Objetivo Secundário:

- Analisar a presença da deleção 22q11.2 através da técnica de citogenética molecular de FISH;- Criar um biorepositório a partir do DNA extraído do sangue periférico de sangue de cada paciente

Endereço: Av. Djalma Batista, nº 3578, Chapada

Bairro: chapada

CEP: 69.050-030

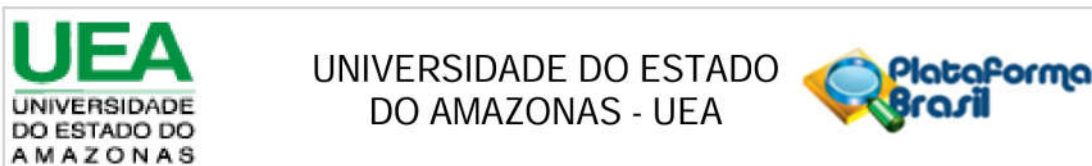
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3878-4368

Fax: (92)3878-4368

E-mail: cep.uea@gmail.com



Continuação do Parecer: 803.634

para pesquisa futura de fatores genéticos associados à PTI.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos para o paciente nessa pesquisa. A coleta de sangue é um procedimento simples e rotineiramente realizado. Além disso, o procedimento será realizado por profissionais experientes, que trabalham no próprio hospital.

Benefícios:

Os resultados da análise pela técnica de FISH serão fornecidos aos pacientes ou responsáveis, o que também será de grande benefício para sua avaliação e acompanhamento. No caso de identificação de necessidade de avaliação e acompanhamento com a Genética Clínica, os pacientes, caso não estejam em atendimento, serão encaminhados a locais que possam oferecer estes serviços.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa relevante para determinar a frequência e caracterização de indivíduos com síndrome de deleção 22q11.2 entre pacientes diagnosticados com púrpura trombocitopênica na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Endereço: Av. Djalma Batista, nº 3578, Chapada

Bairro: chapada

CEP: 69.050-030

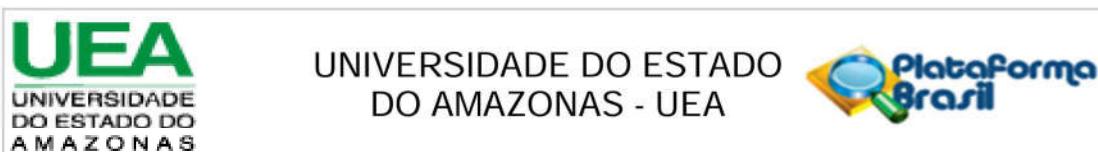
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3878-4368

Fax: (92)3878-4368

E-mail: cep.uea@gmail.com



Continuação do Parecer: 803.634

MANAUS, 24 de Setembro de 2014

Assinado por:
Manoel Luiz Neto
(Coordenador)

Endereço: Av. Djalma Batista, nº 3578, Chapada

Bairro: chapada

CEP: 69.050-030

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3878-4368

Fax: (92)3878-4368

E-mail: cep.uea@gmail.com

ANEXO 6 – Carta de Anuência da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas – HEMOAM



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA-MBT

CARTA DE ANUÊNCIA PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

Ilmo Sr. Prof. Dr. Nelson Fraiji

Solicitamos autorização institucional para realização da pesquisa intitulada **Frequência e caracterização clínica de indivíduos com a síndrome de deleção 22q11.2 entre pacientes diagnosticados com púrpura trombocitopênica imunológica na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas** a ser realizada na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, pela aluna deste programa de pós-graduação *Julia Cavalcante do Carmo*, sob orientação do *Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende*, com o(s) seguinte(s) objetivo(s): Verificar a frequência e caracterização clínica de indivíduos com a SD22q11.2 entre pacientes diagnosticados com PTI em um serviço de referência em Hematologia do Amazonas; Analisar a presença da deleção 22q11.2 através da técnica de citogenética molecular de FISH; Criar um biorepositório a partir do DNA extraído do sangue periférico de sangue de cada paciente para pesquisa futura de fatores genéticos associados à PTI. Necessitando portanto, ter acesso aos dados a serem colhidos em prontuários, arquivos e questionários juntos aos pacientes diagnosticados com PTI, da instituição. Ao mesmo tempo, pedimos autorização para que o nome desta instituição possa constar no relatório final bem como em futuras publicações na forma de artigo científico.

Ressaltamos que os dados coletados serão mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS) 466/12 que trata da Pesquisa envolvendo Seres Humanos. Salientamos ainda que tais dados sejam utilizados tão somente para realização deste estudo.

Na certeza de contarmos com a colaboração e empenho desta Diretoria, agradecemos antecipadamente a atenção, ficando à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária.

Universidade do Estado do Amazonas
Av.: Djalma Batista, 3578 - Flores
CEP: 69050-010 / Manaus - AM
www.uea.edu.br

UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS


AMAZONAS
GOVERNO DO ESTADO



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

Manaus, 16 de abril de 2014.

Cleiton Fantin Rezende

Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende
Pesquisador(a) Responsável do Projeto

Concordamos com a solicitação Não concordamos com a solicitação

PIP *Nelson Fraiji*

Prof. Dr. Nelson Fraiji

Diretor da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

Universidade do Estado do Amazonas
Av.: Djalma Batista, 3578 - Flores
CEP: 69050-010 / Manaus - AM
www.uea.edu.br

UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS


AMAZONAS
GOVERNO DO ESTADO