

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/55153

IB/ 81967

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DAVID ENRIQUE AGUILAR RODRIGUEZ

Estudo Molecular da Anemia de Fanconi

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
David Enrique Aguilar
Rodriguez
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular, na área de Genética
Humana e Médica.

Ossetti

Orientadora: Profa. Dra. CARMEN SILVIA BERTUZZO

Campinas, 2003

UNIDADE	I B / 81
NR. CHAV. DE	
	1 / Unicamp
	Ag 93e
V. EX.	
TÍTULO	55153
PRECO	16.24103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PRECO	R\$ 11,00
DATA	07/08/03
Nº CPD	

167

0700167291-3
 Rubricol 297802

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Ag93e Aguilar Rodriguez, David Enrique
 Estudo molecular da anemia de Fanconi / David Enrique
 Aguilar Rodriguez. -- Campinas, SP : [s.n.], 2003.

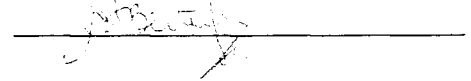
Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo.
 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
 Instituto de Biologia.

1. Fanconi, Anemia de. 2. Biologia molecular.
 3. Genética molecular. I. Bertuzzo, Carmen Sílvia.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Biologia. III. Título.

Campinas 13 de Março de 2003

BANCA EXAMINADORA:

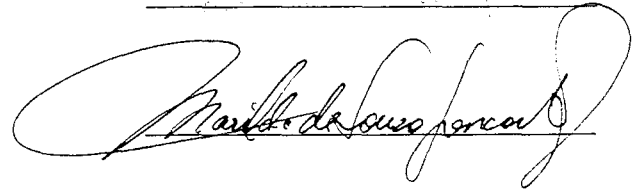
Profª. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo (Orientadora)



Profª. Dra. Carmen Silva. Passos Lima



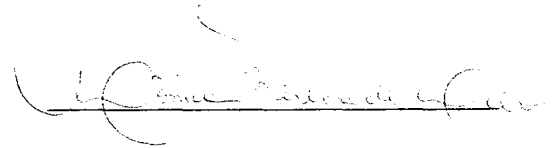
Profª. Dra. Marilda de Souza Gonçalves



Profª. Dra. Vera Lúcia Gil da Sílvia Lopez



Profª. Dra. Mônica Barbosa de Melo

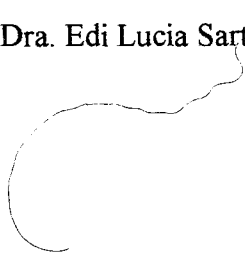



SUPLENTES:

Profª. Dra. Carla Franchi Pinto



Profª. Dra. Edi Lucia Sartorato



Dedico este trabalho a Cidinha, Jaqueline e Caio, pelas muitas horas de compreensão e carinho e aos meus pais Pelayo e Inés, pelo amor e carinho com que me criaram.

In memoriam,
Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênico Piedrabuena, um grande amigo.

AGRADECIMENTOS

Aos professores:

- Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, pela sua orientação, amizade e consideração no decorrer de minha formação como pesquisador.
- Dra. Carmen Sílvia Passos Lima, pela sua colaboração e apoio para realizar este trabalho em conjunto.
- Dr. Walter Pinto Jr., pelo apoio e oportunidade que me foram oferecidos dentro do seu Laboratório na fase inicial de minha pesquisa.
- Dr. Bernardo Beiguelman, pela amizade e o apoio recebidos, além do incentivo na minha formação e pelo grande exemplo que ele representa.

Às Instituições:

- Ao Departamento da Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas, por ter-me cedido suas instalações para desenvolver minha pesquisa.
- Ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por ter-me aceitado no curso de Pós-graduação em Genética.
- Ao Laboratório de Citogenética do HEMOCENTRO-UNICAMP e funcionários, pela colaboração no desenvolvimento de meu trabalho de investigação.
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Agradecimentos especiais:

- À Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, não só pela orientação e conhecimentos transmitidos desde o início do curso, como também pela amizade e paciência com que sempre me incentivou a descobrir o caminho da pesquisa.
- A Cidinha, pelo amor e carinho que me deu sempre e também por ter-me dado a Jaqueline e Caio, tornando minha vida mais feliz.
- A meu compadre Miguel Lizarraga Espinosa, pela sua amizade e pelo apoio que me tem dado em todo momento.
- A minha amiga Valéria Salaro, pela importante colaboração na correção da presente tese.

SUMÁRIO

Lista das figuras.....	x
Lista das tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xii
Resumo.....	xiii
Summary.....	xiv
Resumen.....	xv
I INTRODUÇÃO.....	1
- Incidência e prevalência.....	3
- Manifestações clínicas.....	4
A) Principais.....	4
B) Pacientes sem anomalias congênitas.....	8
C) Manifestações hematológicas.....	8
D) Doenças malignas.....	9
D.1. Tipos mais freqüentes.....	9
D.1.a. Leucemia.....	9
D.1.b. Tumores sólidos.....	10
- Fenótipo celular.....	11
A) Instabilidade cromossômica na Anemia de Fanconi.....	11
- Diagnóstico citogenético.....	14
- Grupos de complementação.....	15
- Os genes da Anemia de Fanconi.....	17
A) Gene <i>FANCC</i>	19
B) Gene <i>FANCA</i>	20
- As proteínas da Anemia de Fanconi.....	22
II OBJETIVOS.....	25

III CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
- Casuística.....	28
- Métodos.....	28
- Análise citogenética.....	28
- Análise molecular.....	32
IV RESULTADOS.....	41
V DISCUSSÃO.....	58
VI CONCLUSÕES.....	65
ANEXOS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

Lista das Figuras

Figura I	Principais manifestações clínicas da Anemia de Fanconi. a) Duplicação e alteração da implantação dos dedos polegares. b) Ausência de dedo polegar e anomalias de raios. c) Um irmão e irmã (de 7 e 11 anos de idade) com hiperpigmentação, pancitopenia, anomalias de dedo polegar e inteligência normal. Os polegares do menino com implantação distal e hipoplásicos. A mão direita da menina apresenta um dedo polegar pequeno. Aparência facial característica que lembra “duendes”, sendo causada por cabeça e boca pequenas, fendas palpebrais estreitas, epicanto e micrognatia. d) Manchas hipopigmentadas (manchas café-com-leite).....	05
Figura II	Representação esquemática das aberrações cromossômicas estruturais presentes em pacientes com Anemia de Fanconi. A figura mostra as quebras cromatídicas dos cromossomos não homólogos e o rearranjo defeituoso na formação de um cromossomo quadrirradial.....	12
Figura III	Representação esquemática do teste de complementação realizado em células de pacientes portadores da Anemia de Fanconi. (FA-1 e FA-2, células de pacientes da AF que pertencem ao mesmo grupo de complementação) (FA-2 e FA-3, células de pacientes da AF que pertencem a grupos de complementação diferentes).....	16
Figura IV	Representação esquemática das estruturas dos genes <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> , <i>FANCD2</i> , <i>FANCE</i> , <i>FANCF</i> e <i>FANCG</i>	21
Figura V	Interação entre as proteínas da AF e o mecanismo de reparo do DNA. As proteínas <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> , <i>FANCE</i> , <i>FANCF</i> e <i>FANCG</i> formariam um complexo nuclear. Em resposta ao dano do DNA ou durante a replicação do DNA, o complexo pode resultar na ativação de monoubiquilação da proteína <i>FANCD2</i> . <i>BRCA1</i> seria também necessária para a ubiquilação da proteína <i>FANCD2</i> . A proteína <i>FANCD2</i> ativada, localizada dentro do mesmo loci nuclear que a <i>BRCA1</i> , onde iria interagir com outras proteínas de reparo. A interação da <i>BRCA1</i> com <i>BRCA2</i> é bem conhecida, Em um próximo passo a <i>BRCA2</i> iria interagir com a proteína <i>RAD51</i> . A proteína <i>RAD51</i> é provável que tenha um papel direto no reparo do DNA completando assim o ciclo.....	24
Figura VI	Alterações citogenéticas no DEB teste em um caso de Anemia de Fanconi. Onde podemos observar: a) duplicação cromossômica; b) presença de quebras cromossômicas e quebras cromatídicas.....	43
Figura VII	Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% para a mutação <i>IVS4+4A→T</i> , presente no gene <i>FANCC</i> em pacientes portadores da Anemia de Fanconi. Coluna 1 - leader de 100 pb, coluna 2 - amplificado não digerido, coluna 3 a 5 - indivíduos heterozigoto para a mutação <i>IVS4+ 4A→T</i>	46
Figura VIII	Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% para a mutação $\Delta G322$, presente no gene <i>FANCC</i> em pacientes portadores da Anemia de Fanconi. Coluna 1 - controle normal, coluna 2 a 5 - indivíduos heterozigoto para a mutação $\Delta G322$	46
Figura IX	Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% para a mutação <i>L554P</i> , presente no gene <i>FANCC</i> em pacientes portadores da Anemia de Fanconi. Coluna 1 - leader de 100 pb, coluna 2 - amplificados não digerido, colunas 3, 4 e 6 - indivíduos sem a mutação e coluna 5 - indivíduo heterozigoto para a mutação <i>L554P</i>	47
Figura X	Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% para a mutação <i>Q13X</i> , presente no gene <i>FANCC</i> em pacientes portadores da Anemia de Fanconi. Coluna 1 - leader de 100 pb, coluna 2 - amplificados não digerido, coluna 3 - indivíduo heterozigoto para a mutação <i>Q13X</i> e colunas 4 e 5 - indivíduos sem a mutação.....	47

Figura XI	Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% para a mutação $\Delta 3788-3790$, presente no gene <i>FANCA</i> em pacientes portadores da Anemia de Fanconi. Colunas 1 e 14 - leader de 100 pb, coluna 2 - amplificadas não digerido, colunas 3 a 12 - indivíduos sem a mutação e coluna 13 - indivíduo heterozigose.....	48
Figura XII	Autorradiografia do polimorfismo da conformação da fita simples (SSCP) radiativo do exon 16, dos pacientes 6, 7 e controle normal mostrando uma alteração de corrida.....	54
Figura XIII	Autorradiografia do seqüenciamento manual do controle normal e do caso 6. No caso 6 na posição 1475 verificamos a presença de uma troca nucleotídica de adenina (A) para guanina (G) em heterozigose.....	55
Figura XIV	Distribuição dos grupos de complementação na amostra de 22 pacientes portadores da Anemia de Fanconi.....	56
Figura XV	Distribuição das mutações identificadas na investigação molecular dos genes <i>FANCC</i> e <i>FANCA</i> em 22 pacientes com o diagnóstico de Anemia de Fanconi confirmado.....	57

Lista das Tabelas

Tabela I	Tabela com a relação dos genes de Anemia de Fanconi identificados até o momento, com sua localização cromossômica, número de exons, número de aminoácidos nas proteínas e o número das mutações descritas.....	18
Tabela II	Produtos da reação de amplificação dos genes <i>FANCC</i> e <i>FANCA</i> para as diferentes mutações com suas respectivas seqüências desencadeadoras e temperaturas de hibridização.....	35
Tabela III	Temperaturas de incubação e tamanhos dos fragmentos observados nas diferentes mutações após digestão com enzimas de restrição específica.....	36
Tabela IV	Produtos da reação de amplificação dos genes <i>FANCC</i> e <i>FANCA</i> para as diferentes mutações com suas respectivas seqüências desencadeadoras e temperaturas de hibridização.....	38
Tabela V	Resultados da caracterização molecular dos 22 casos comprovados da Anemia de Fanconi, mostrando a idade, sexo e tipo racial dos pacientes e as diversas mutações encontradas para os genes <i>FANCC</i> e <i>FANCA</i> através da reação de PCR e posterior digestão com enzima de restrição. (x - representa o alelo que não porta a mutação estudada).....	44
Tabela VI	Sumário dos resultados citogenéticos e moleculares obtidos nos 22 pacientes com manifestações clínicas de Anemia de Fanconi.....	64

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

AF	- Anemia de Fanconi
C	- Caucasoíde
dATP	- Desoxiadenocinatrifosfato
DEB	- Diepoxibutano
dCTP	- Desoxiciditidinatrifosfato
dGTP	- Desoxiguanocinatrifosfato
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dTTP	- Desoxitimidinatrifosfato
IFAR	- Registro Internacional da Anemia de Fanconi “International Fanconi Anemia Registry”.
Kda	- kilodaltons
MMC	- Mitomicina C
MO	- Medula óssea
N	- Negróide
pb	- Pares de bases
PCR	- Reação em cadeia da polimerase “ Polymerase chain reaction”
RNA	- Ácido ribonucléico
SSCP	- Polimorfismo da conformação da fita simples “Single-strands conformation polymorphysm”

RESUMO

Anemia de Fanconi (AF) é uma doença autossômica recessiva com diversas características clínicas, caracterizadas por anemia aplástica, anomalias congênitas variáveis e instabilidade cromossômica. As células dos pacientes apresentam perda ou demora espontâneas da fase G2 (4n pós-replicação) do ciclo celular; instabilidade cromossômica espontânea (quebras cromatídicas e intercâmbios); hipersensibilidade para quebras cromossômicas por agentes clastogênicos, como mitomicina C, diepoxibutano, cisplatina e ciclofosfamida. Através de estudos de complementação, foi possível evidenciar 8 grupos de complementação: A, B, C, D1, D2, E, F e G. Para cada grupo de complementação foi identificado o gene responsável, sendo que uma das grandes surpresas foi a descoberta de que o gene *BRCA2* do Câncer de Mama é o gene responsável pela Anemia de Fanconi D1. As proteínas codificadas por esses genes formam complexos, que estão envolvidos na sinalização de mecanismos de reparo. O presente projeto estudou as alterações nos genes *FANCC* e *FANCA* comparando-as com o fenótipo celular (DEB teste). Foram avaliados 52 pacientes com clínica sugestiva de Anemia de Fanconi. Destes, 22 tiveram o diagnóstico confirmado ou pelo DEB teste ou pela análise das mutações. As mutações analisadas no gene *FANCC* foram $\Delta G322$, $IVS4+4A \rightarrow T$, $W22X$, $L496R$, $R548X$, $Q13X$, $R185X$, e $L554P$, e a mutação encontrada no gene *FANCA* foi $\Delta 3788-3790$, através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR) associada à utilização de enzimas de restrição específicas. Uma outra mutação $H492G$ no gene *FANCA* foi detectada pelo método de polimorfismo da conformação da fita simples (SSCP) e posterior seqüenciamento. A triagem feita por estas últimas técnicas foi realizada em pacientes heterozigotos para a mutação $\Delta 3788-3790$. Em nossa amostra de 22 casos, o DEB teste foi positivo em 20 casos (90,9%). A análise molecular encontrou alterações em 20 casos (90,9%), sendo que em 14 casos possuíam mutações pertencem ao grupo C, 6 casos ao grupo A e em 2 casos não foram detectas mutações. As mutações prevalentes do grupo C foram $IVS4+4A \rightarrow T$ e $\Delta G322$, as mesmas que são freqüentes entre os pacientes Judeus Ashkenazim. No grupo A, a mutação predominante foi a $\Delta 3788-3790$. Estes dois testes, citogenético e análise molecular, empregados juntos não foram capazes de definir todos os casos. Sendo assim, é necessário introduzir no Brasil o teste de complementação, a fim de direcionar a análise molecular.

SUMMARY

Fanconi Anemia (FA) is a recessive autosomal disease with several clinical characteristics, determined by aplastic anemia, variable congenital anomalies and chromosomal instability. The cells of the patients present loss or spontaneous delay of G2 phase (4n post-replication) of the cellular cycle; chromosomal spontaneous instability (chromatid breaks and interchanges); hypersensitivity to chromosomal breaks by crosslinking agents like mitomycin C, diepoxybutane, cisplatin and cyclophosphamide. Through complementation studies, it was possible to prove that there are eight complementation groups: A, B, C, D1, D2, E, F and G. The responsible gene for each complementation group was identified and one of the greatest surprises was to discover that the *BRCA2* gene for breast cancer was responsible for Fanconi Anemia D1. The proteins codified by these genes form complexes, which are involved in mechanism signaling repair. The present project studied *FANCC* and *FANCA* gene alterations comparing them with cellular phenotype (DEB test). Fifty-two patients with symptoms suggestive of Fanconi anemia were analyzed. Among them 22 had diagnosis confirmed by either the DEB test or mutation analysis. The mutations analyzed on the *FANCC* gene were $\Delta 322G$, $IVS4+4A \rightarrow T$, $W22X$, $L496R$, $R548X$, $Q13X$, $R185X$ and $L554P$, and the found mutations in the *FANCA* gene, was $\Delta 3788-3790$, through the test polymerase chain reaction (PCR) associated with the use of specific restriction enzymes. Another mutation $H492G$ was detected by single-strands conformation polymorphism (SSCP) with posterior sequencing in the same *FANCA* gene. These last techniques were using to heterozygous patients to $\Delta 3788-3790$ mutations. Among the 22 cases, the DEB test was positive in 20 cases (90.9%). Molecular analysis found alterations in 20 cases (90.9%), being 14 cases with mutations of the group C, 6 cases of the group A and 2 cases in which mutations were not detected. The prevalent mutations of group C were $IVS4+4A \rightarrow T$ and $\Delta G322$, the same that are frequent among the Ashkenazim Jew patients. The prevalent mutation of group A was the $\Delta 3788-3790$. These two tests cytogenetic and molecular analysis used at the same time were not able to define all of the cases. Therefore, it is necessary to introduce the use of complementary tests in Brazil, in order to address the molecular analysis.

RESUMEN

La Anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva con diferentes características clínicas, caracterizada por anemia aplásica, anomalías congénitas variables e inestabilidad cromosomática. Las células de los pacientes presentan pérdida o demora espontáneas de la fase G2 (4n post-replicación) del ciclo celular, inestabilidad cromosomática espontánea (quebras cromatídicas e intercambios), hipersensibilidad para quebras cromosomáticas por agentes clastogénicos (mitomicina C, diepoxibutano, cisplatina y ciclofosfamida). A través de estudios de complementación fue posible identificar 8 grupos de complementares: A, B, C, D1, D2, E, F y G. Para cada grupo de complementación fue identificado su correspondiente gen responsable, siendo una de las grandes sorpresas la descubierta de que el gen *BRCA2* del Cáncer de Mama es el gen responsable por la Anemia de Fanconi D1. Las proteínas codificadas por esos genes forman complejos, que están envueltos en la señalización de los mecanismos de reparo. Este proyecto estudió las alteraciones en los genes *FANCC* y *FANCA* comparándolas con el fenotipo celular (examen DEB). Fueron analizados 52 pacientes con un fenotipo que sugería Anemia de Fanconi, de los cuales, 22 tuvieron el diagnóstico confirmado o por el examen DEB o por el análisis de las mutaciones. Las mutaciones analizadas para el gen *FANCC* fueron $\Delta G322$, $IVS4+4A \rightarrow T$, W22X, L496R, R548X, Q13X, R185X y L554P, e la mutación encontrada en el gen *FANCA* fue $\Delta 3788-3790$, por le método de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) asociada a la utilización de enzimas de restricción específica. Otra mutación H492G fue detectada en el gen *FANCA* por el método de SSCP y posteriormente fue realizado el secuenciamiento. Estas técnicas fueron utilizadas para rastrear las mutaciones sólo en pacientes que presentaron apenas un alelo para la mutación $\Delta 3788-3790$. De los 22 pacientes examinados por el método DEB 20 (90,9%) fueron positivos. Mediante el análisis molecular se encontraron alteraciones en 20 casos (99,9%), encontrando en 14 de ellos mutaciones pertenecientes al grupo C, en 6 al grupo A y en 2 no fueron encontradas mutaciones. Las mutaciones del grupo C que prevalecieron fueron $IVS4+4A \rightarrow T$ y $\Delta G322$, las mismas que son frecuentes entre los pacientes judíos Ashkenazim. En el grupo A, la mutación predominante fue $\Delta 3788-3790$. Estos dos exámenes citogenético y análisis molecular, empleados juntos no fueron capaces de definir todos los casos, por lo tanto, se considera necesario introducir en el Brasil el examen de complementación, con la finalidad de direccionar el análisis molecular.

I - INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença autossômica recessiva com quadro clínico heterogêneo, caracterizado por anemia aplástica, anomalias congênitas variáveis, instabilidade cromossômica e hipersensibilidade a agentes clastogênicos como a Mitomicina C (MMC) e o Diepoxibutano (DEB). Os pacientes portadores de AF possuem um aumento da susceptibilidade à neoplasia, necessitando portanto de controles periódicos para tal identificação (GIBSON *et al.*, 1996).

A doença foi descrita pela primeira vez em 1927 pelo pediatra suíço Guido Fanconi, que descreveu uma família com três crianças afetadas as quais apresentavam anemia aplástica, malformações esqueléticas, retardo do crescimento, hipogonadismo e manchas hipopigmentadas no tronco.

Em 1964, SCHROEDER *et al.*, descreveram a presença de quebras cromossômicas espontâneas na cultura de linfócitos dos pacientes com AF. Esse mesmo grupo, em 1976, analisando a segregação da doença em 90 famílias com membros portadores da AF, estabeleceu o padrão de herança autossômica recessiva para essa doença e sugeriu a existência de uma heterogeneidade genética. Esse fato foi comprovado por ZAKRZEWSKI & SPERLING, em 1980, que demonstraram a existência de pelo menos dois grupos de complementação na AF. JOENJE *et al.*, em 1997, demonstraram a existência de pelo menos 8 grupos de complementação.

INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA

ALTER *et al.*, em 1978, analisaram 134 crianças com anemia aplástica do Hospital de Crianças de Boston e encontraram 40 com insuficiência da medula óssea (MO), sendo que 26 delas (65%) foram reconhecidas como AF. Em um estudo similar realizado no Hospital Príncipe de Gales, na Austrália, de 1964 a 1984, foram analisadas 34 crianças, nas quais 8 apresentavam AF (WINDASS *et al.*, 1987).

A AF é raramente vista em negróides. MACDOUGALL *et al.*, (1990) descreveram 25 crianças africanas com AF em um período de 11 anos de estudo e estimaram a prevalência de homozigotos nessa população de 1 em 476.000. Por outro lado, ROSENDORFF *et al.*, (1987) investigaram a prevalência de indivíduos homozigotos e heterozigotos na comunidade de descendentes de holandeses (caucasóides) do sul da Província de Transvaal, na África do Sul, e estimaram que a incidência mínima ao nascimento é de 1 em 22.000, com a prevalência de heterozigotos de aproximadamente 1 em 77, sendo assim, atribuíram esta alta frequência incomum do gene nesta população a um efeito fundador.

A frequência de heterozigotos foi estimada de 1 em 300 nos Estados Unidos, na Europa e no Japão (SCHROEDER *et al.*, 1976a; SWIFT, 1976 e ALIMENA *et al.*, 1983).

VERLANDER *et al.*, (1995) testaram 3.104 indivíduos Judeus, de descendência Ashkenazim, para as duas mutações mais comuns no gene *FANCC* e encontraram 35 portadores da mutação IVS4+4A→T, com uma frequência de 1 em 89; e nenhum indivíduo com a mutação $\Delta G322$. O mesmo grupo analisou também 563 Judeus Iraquianos (Sefaradim),

nos quais não foram encontrados portadores da mutação IVS4+4A→T, demonstrando que esta mutação encontra-se confinada à população de Judeus Ashkenazim.

No Brasil, não há até o momento nenhum levantamento de prevalência da AF.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A) PRINCIPAIS

Um paciente com um quadro clínico característico de AF apresenta estatura baixa, ausência dos dedos polegares ou anomalias de rádios, microcefalia, manchas café-com-leite, manchas hipopigmentadas e uma aparência facial característica que lembra “duendes” causada por uma cabeça e boca pequenas, fendas palpebrais estreitas, epicanto e micrognatia (Figura I) (FANCONI 1967, HAGERMAN & WILLIAMS, 1993). Mais de 90% dos pacientes com AF desenvolvem anemia aplástica durante o curso da doença (ALTER, 1993). A maioria dos pacientes com AF apresentam anomalias congênitas e (ou) anomalias ao exame físico, e as mais frequentemente encontradas são: alterações de pigmentação de pele (64%), estatura baixa (62%), malformações do eixo radial (50%), anomalias oculares (41%), microcefalia (37%), anomalias renais (34%) e deficiência mental (25%) (JONES, 1997).

GIAMPIETRO *et al.*, (1994) analisaram os dados clínicos de 370 pacientes com AF e encontraram 220 (60%) com malformações congênitas. Os pacientes apresentam também uma frequência aumentada de doenças malignas, como a leucemia aguda, ocorrendo em

aproximadamente 10% dos pacientes; síndrome mielodisplástica em aproximadamente 5%; tumores hepáticos em pelo menos 5% e uma porcentagem semelhante com relação a outros tipos de câncer (ALTER, 1996).

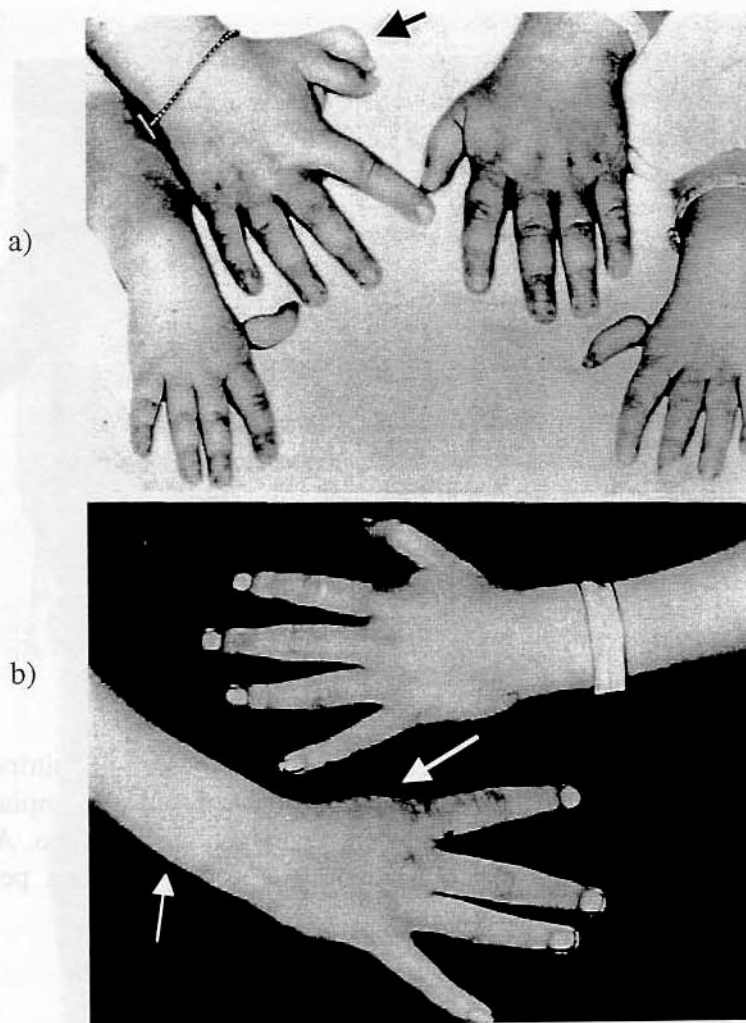


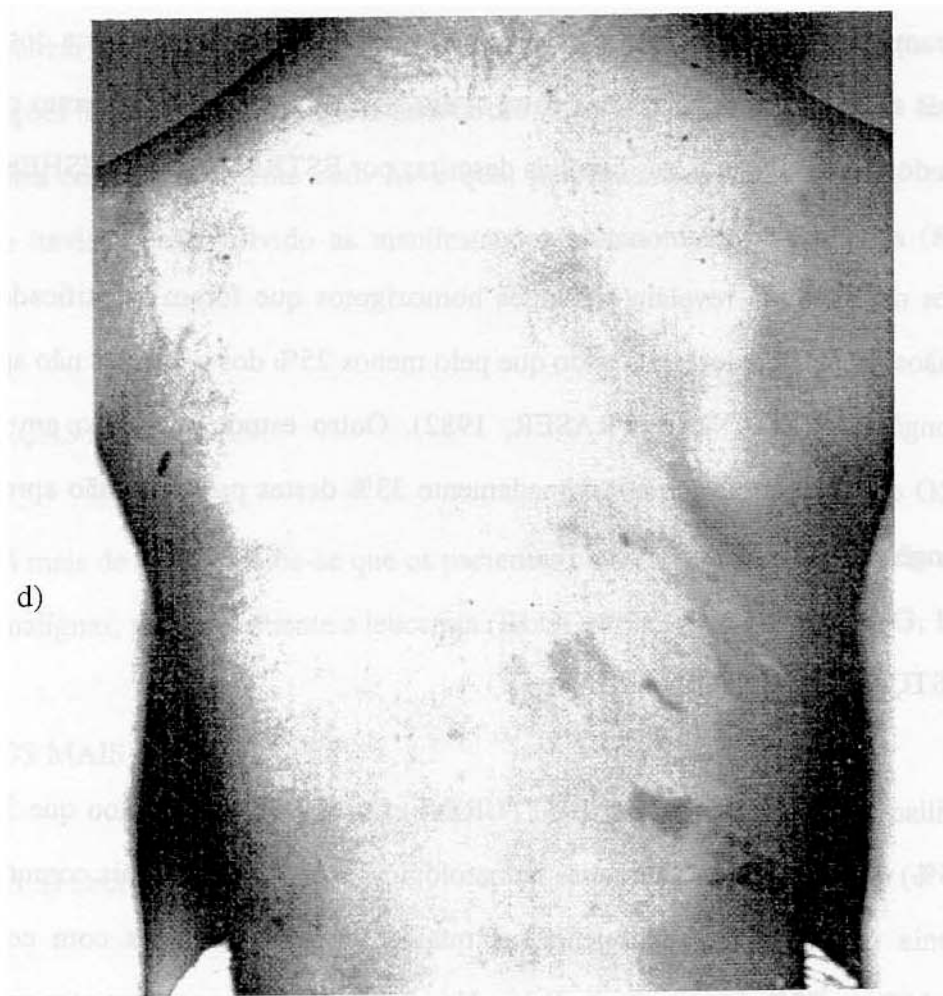
Figura I - Principais manifestações clínicas da Anemia de Fanconi.

- a) Duplicação e alteração da implantação dos dedos polegares.
- b) Ausência de dedo polegar e anomalias de rádios.



Figura I - Principais manifestações clínicas da Anemia de Fanconi.

c) Um irmão e irmã (de 7 e 11 anos de idade) com hiperpigmentação, pancitopenia, anomalias de dedo polegar e inteligência normal. Os polegares do menino com implantação distal e hipoplásicos. A mão direita da menina apresenta um dedo polegar pequeno. Aparência facial característica que lembra “duendes”, sendo causada por cabeça e boca pequenas, fendas palpebrais estreitas, epicanto e micrognatia.



d)

Figura I - Principais manifestações clínicas da Anemia de Fanconi.
d) Manchas hipopigmentadas (manchas café-com-leite).

B) PACIENTES SEM ANOMALIAS CONGÊNITAS

Duas famílias apresentando pacientes com AF de aparência normal, foram descritas pela primeira vez por ESTREN & DAMESHEK (1947). Subseqüentemente, LI & POTTER (1978) relataram que um primo de uma dessas famílias apresentava AF típica com quebras cromossômicas e cujos pais eram primos entre si em segundo grau, também eram primos em primeiro grau dos filhos afetados das famílias descritas por ESTREN & DAMESHEK (1947).

Relatos da literatura revelam pacientes homozigotos que foram identificados porque possuíam irmãos/irmãs afetados, indicando que pelo menos 25% dos pacientes não apresentam anomalias congênitas (GLANZ & FRASER, 1982). Outro estudo realizado em 1997 por GIAMPIETRO *et al.* mostrou que aproximadamente 33% destes pacientes não apresentavam anomalias congênitas definidas.

C) MANIFESTAÇÃO HEMATOLÓGICAS

A análise de 388 pacientes por BUTTURINI *et al.* (1994) evidenciou que 332 destes pacientes (85%) desenvolveram anomalias hematológicas, sendo que as mais comuns foram a trombocitopenia isolada e a pancitopenia, as quais estavam associadas com celularidade diminuída na MO em 75% dos casos estudados. Um caso mais grave ocorreu com um paciente que apresentou um quadro de mielodisplasia com manifestações da AF (McMULLIN *et al.*, 1991). Esse mesmo estudo mostrou também que o início das manifestações hematológicas ocorreu aos 7 anos de idade no paciente, observando que o risco estatístico de óbito devido a causas hematológicas (incluindo insuficiência da MO, síndrome mielodisplástica, leucemia

mielóide aguda ou complicações relacionadas ao tratamento) é de 81% até a idade de 40 anos, conforme análises de outros casos.

Vários trabalhos enfatizam que mesmo pacientes adultos que apresentam pancitopenia devem realizar um teste para detecção de fragilidade cromossômica, já que o início das manifestações hematológicas pode ser bem tardio (ZATTERALE *et al.*, 1995). Existem relatos de pacientes comprovadamente com AF e que, por ocasião do relato aos 56 anos de idade, ainda não haviam desenvolvido as manifestações hematológicas da doença (KWEE *et al.*, 1997).

D) DOENÇAS MALIGNAS.

Há mais de 20 anos sabe-se que os pacientes com AF têm uma tendência a desenvolver doenças malignas, particularmente a leucemia (BLOOMFIELD & BRUNNING, 1976).

D.1. TIPOS MAIS FREQUENTES:

D.1.a) Leucemia

SCHAISON *et al.*, (1983) acompanharam a evolução de 44 pacientes com AF, dos quais 27 foram homens e 17 mulheres, entre os anos de 1962 e 1980, na França. A idade média do diagnóstico foi de 8 anos (7 meses a 29 anos) e a incidência de leucemia foi de 30% durante este período de acompanhamento dos pacientes.

AUERBACH & ALLEN (1991) fizeram uma análise de todos os pacientes com AF do IFAR e com leucemia, e encontraram uma incidência de leucemia mielóide aguda nesses pacientes, 15.000 vezes maior que a observada em crianças da população em geral. De acordo com AUERBACH (1992), uma revisão de todos os pacientes com AF indicou que pelo menos 15% manifestaram leucemia mielóide aguda.

D.1.b) Tumores Sólidos

Vários autores descreveram o aparecimento de tumores sólidos durante a evolução da AF, e sobre eles estão relatados: a) os carcinomas de células escamosas, que geralmente acometem as mucosas oral e anogenital (SWIFT *et al.*, 1971; SARNA *et al.*, 1975; KENNEDY & HART, 1982; MURAYAMA *et al.*, 1990 e LUSTIG *et al.*, 1995); b) os tumores hepáticos, que são os adenomas e os carcinomas hepatocelulares, sendo que os adenomas ocorrem primariamente, mas não exclusivamente em pacientes tratados com andrógenos (HOLDER *et al.*, 1975; SHAPIRO *et al.*, 1977; ABBONDANZO *et al.*, 1986, BESSHO *et al.*, 1989 e ALTER, 1993); c) os adenocarcinomas do estômago (HILL *et al.*, 1981); d) os tumores de mama (JACOBS & KARABUS, 1984); e) os meduloblastomas e os tumores de Wilms (de CHADARÉVIAN *et al.*, 1985); f) os linfomas (VAN NIEKERK *et al.*, 1987) e g) os retinoblastomas (GIBBONS *et al.*, 1995) e os osteossarcomas (LEVINSON & VICENT, 1977).

Em uma análise de 700 pacientes com anemia aplástica grave, incluindo 79 pacientes com AF, com idade em média de 10 anos (4 a 31 anos), que foram transplantados entre os anos de 1970 e 1993, foi observado o desenvolvimento de uma doença maligna em 23 casos, em um período de tempo que variou entre 6 e 11 anos após o transplante (DEEG *et al.*, 1996).

As doenças malignas neste estudo foram do tipo: tumores sólidos em 18 pacientes, (17 com carcinoma de células escamosas e 1 com carcinoma mucoepidermóide), doença linfoproliferativa pós-transplante em 3 pacientes e leucemia linfóide aguda em 2 pacientes.

FENÓTIPO CELULAR

Os pacientes apresentam perda ou demora espontâneas da fase G2 (4n pós-replicação) do ciclo celular; instabilidade cromossômica espontânea (quebras cromatídicas e intercâmbios); hipersensibilidade para quebras cromossômicas por agentes clastogênicos, como mitomicina C, diepoxibutano, cisplatina e ciclofosfamida.

A) INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA NA ANEMIA DE FANCONI

A AF sempre foi referida como uma síndrome da instabilidade cromossômica (MAGDALENA, 1999). As aberrações cromossômicas que ocorrem espontaneamente em pacientes com AF são do tipo cromatídicas. As aberrações originam-se durante a fase de replicação do DNA das células, afetando principalmente o DNA recém produzido. Microscopicamente nas metáfases são visíveis as quebras das cromátides, cujos pontos de quebra em dois cromossomos podem ser mal reparados gerando uma figura de intercâmbio cromatídico, como quadrirradial. Ver Figura II.

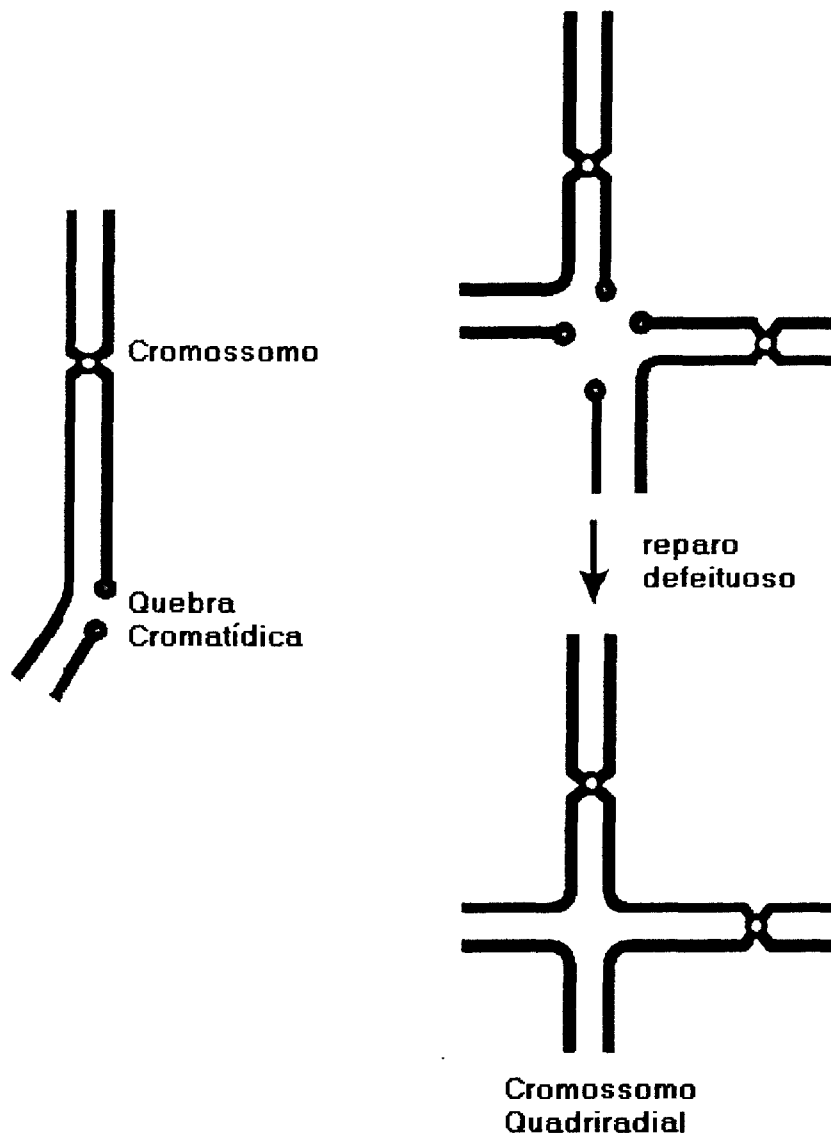


Figura II - Representação esquemática das aberrações cromossômicas estruturais presentes em pacientes com Anemia de Fanconi. A figura mostra as quebras cromatídicas de dos cromossomos não homólogos e o rearranjo defeituoso na formação de um cromossomo quadrirradial (adaptado de JOENJE, H. & PATEL, K.J., 2001).

Até 50% das células de portadores da AF quando estimuladas, apresentam de 1 a 3 aberrações por célula. Este dano do cromossomo é uma causa provável da perda espontânea ou demora na fase S recente ou G2 do ciclo celular, como está tipicamente observada em células de pacientes com AF. Quando expostos a uma dose baixa de um agente clastogênico como a MMC, as células dos pacientes com AF respondem notadamente acrescentando quebras cromatídicas e intercâmbios, diferentes das células controles, que não respondem a este tratamento. (JOENJE & PATEL, 2001).

A instabilidade cromossômica espontânea observada em células da AF é diferente e distinta do que se observou em outras síndromes, embora se assemelhe àquelas presentes em células de portadores da síndrome de Bloom. Na AF o intercâmbio cromatídico parece envolver pontos de ruptura entre cromossomos não homólogos, considerando que na síndrome de Bloom, o intercâmbio envolve preferencialmente cromossomos homólogos. (JOENJE & PATEL, 2001).

Entre outras doenças associadas à instabilidade cromossômica temos: a Ataxia-Telangiectasia, o Xeroderma pigmentoso, a Síndrome de Cockayne, o Câncer de Colón hereditário sem Polipose, a Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1, e a Síndrome de Nijmegen (MAGALENA 1999).

DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO

AUERBACH *et al.*, (1981) desenvolveram um método citogenético para o diagnóstico rápido dos pacientes com AF, que utiliza preparações de metáfases obtidas a partir de culturas de linfócitos de sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina e tratados com o DEB, tendo sido utilizado por estes autores pela primeira vez em 1977.

Em 1984, foi estabelecido um laboratório de referência para a realização do teste citogenético com o DEB na Universidade Rockefeller, em Nova York, EUA (AUERBACH, 1995). De acordo com o Registro Internacional de AF (IFAR), os homozigotos têm uma média de 8,96% quebras cromossômicas por células (variação de 1,3 a 23,9%), após cultura dos linfócitos do sangue periférico com DEB, comparados com uma média de 0,06% (variação de 0 a 0,36%) em controles normais (AUERBACH *et al.*, 1989).

Apesar do teste do DEB não detectar heterozigotos, e também de, em algumas situações, este apresenta resultados falso-negativos, a grande maioria dos autores confirma que o teste permanece sendo o método principal a ser usado no diagnóstico de AF (SHIMAMURA *et al.*, 2002).

CERVENKA *et al.*, (1981) usaram a MMC como substância clastogênica ao desenvolver um teste citogenético que permite diferenciar entre a AF e o grupo de doenças classificadas como anemia aplástica idiopática. Na concentração de 80 ng/ml de MMC no meio de cultura dos linfócitos, foi observado um aumento de 50 vezes nas quebras cromossômicas e de 200 vezes nas figuras radiais dos linfócitos de pacientes com AF, quando

comparado com os valores médios para as células de pacientes com anemia aplástica ou as células de indivíduos saudáveis do grupo controle.

GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO

Complementação refere-se à correção do defeito celular evidenciado por meio de diferentes parâmetros de avaliação; no caso, a sensibilidade aumenta quando submetidas às substâncias clastogênicas, tais como a MMC e o DEB.

YOSHIDA (1980) obteve fusão de fibroblastos entre indivíduos normais e pacientes afetados com AF, e observou uma taxa elevada da correção das aberrações cromossômicas, tanto espontâneas quanto induzidas pela mitomicina C; ou seja, ocorreu complementação.

Esta mesma linha de raciocínio levou alguns pesquisadores (ZAKRZEWSKI & SPERLING, 1980; DUCKWORTH-RYSIECKI *et al.*, 1985; JOENJE *et al.*, 1995 e JOENJE *et al.*, 1997) a obterem a fusão de células de dois pacientes com AF, observando que, quando linhagens celulares linfoblastóides derivadas de pacientes não consangüíneos são fundidas, são obtidas células híbridas que mostram resistência às substâncias clastogênicas (complementação) ou células híbridas que continuam a ser sensíveis a estas substâncias (ausência de complementação). Os pacientes cujas linhagens celulares não se complementam na célula híbrida, pertencem ao mesmo grupo de complementação (Figura III).

Através desses estudos foi possível evidenciar 8 grupos de complementação: A, B, C, D1, D2, E, F e G (JOENJE *et al.*, 2000). De acordo com o registro internacional da Anemia de Fanconi (IFAR), 65% dos pacientes pertencem ao grupo de complementação A; 15% ao grupo C e 10% ao grupo G (KUTLER *et al.*, 2003).

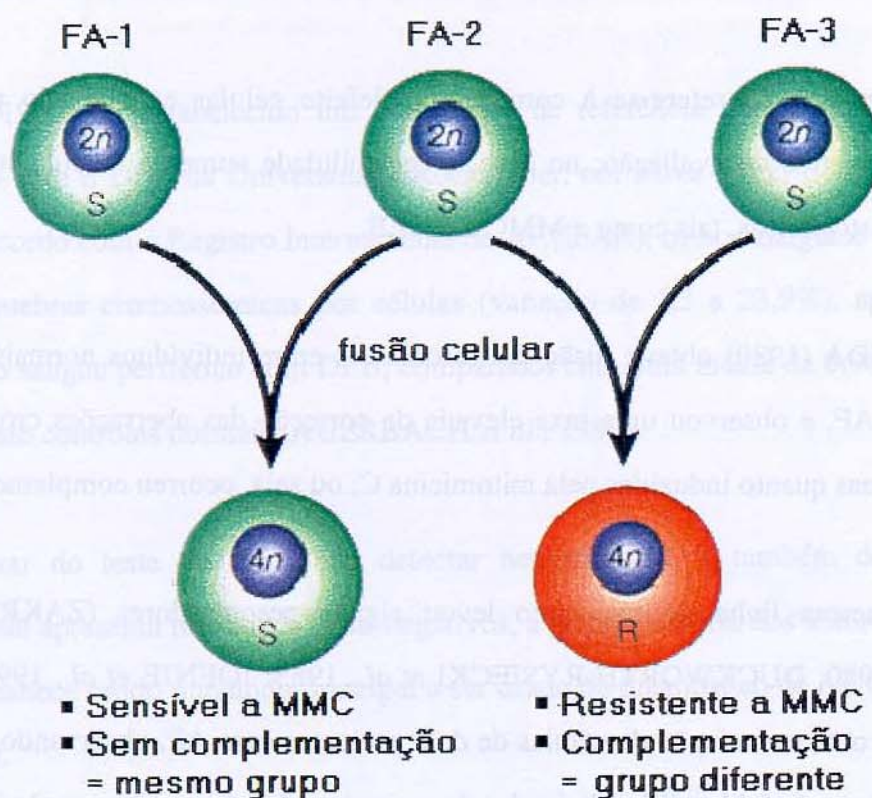


Figura III - Representação esquemática do teste de complementação realizado em células de pacientes portadores da Anemia de Fanconi. (FA-1 e FA-2, células de pacientes da AF que pertencem ao mesmo grupo de complementação) (FA-2 e FA-3, células de pacientes da AF que pertencem a grupos de complementação diferentes) (adaptado de JOENJE, H. & PATEL, K.J., 2001)

OS GENES DA ANEMIA DE FANCONI

Considerando a raridade da doença, a clonagem dos genes da AF só foi possível através da combinação da tecnologia de clonagem posicional e análise de complementação. Assim, dos 8 genes da AF, 6 foram clonados e estão dispersos pelo genoma (Tabela I), (Figura IV). A clonagem posicional foi utilizada na clonagem de dois genes (*FANCA* e *FANCD2*). O número de exons varia de 1 (*FANCF*) a 44 (*FANCD2*). Análises das seqüências presumíveis de aminoácidos mostraram um grau de conservação significativo apenas entre seqüências de vertebrados. Uma exceção é a proteína *FANCD2*, que mostrou alinhamento elevado com seqüências encontradas em organismos como a *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Arabidopsis thaliana*. Esses dados demonstram uma conservação elevada da proteína *FANCD2* na evolução (JOENJE & PATEL, 2001).

Tabela I - Tabela com a relação dos genes de Anemia de Fanconi identificados até o momento, com sua localização cromossômica, número de exons, número de aminoácidos nas proteínas e o número das mutações descritas.

Genes	Mutações Descritas	Localização	Exons	No. de aminoácidos nas proteínas
<i>FANCA</i>	~100	16q24.3	43	1455
<i>FANCB</i>	(<i>BRCA2</i>)?	—	—	—
<i>FANCC</i>	10	9p22.3	14	558
<i>FANCD1</i> (<i>BRCA2</i>)	1237	13q12.3	27	3418
<i>FANCD2</i>	5	3p25.3	44	1451
<i>FANCE</i>	3	6p21.3	10	536
<i>FANCF</i>	6	11p15	1	374
<i>FANCG</i>	18	9p13	14	622

A) GENE *FANCC*

O gene responsável pelo grupo C (*FANCC*) foi clonado por STRATHDEE *et al.*, (1992) e encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 9 região 22.3. Possui 1.674 pb codificadoras, distribuídas em 14 exons. Os exons variam de 53 a 204 pb de extensão. Todos os sítios doadores e receptores de processamento do RNA são circundados por regiões de consenso (GIBSON *et al.*, 1993).

O gene codifica uma proteína de cerca de 63.000 daltons. A função da proteína não está estabelecida, mas acredita-se que media a resistência do DNA a agentes clastogênicos e facilita o funcionamento do sistema de reparo do DNA. Algumas evidências demonstram que essa proteína localiza-se no citoplasma celular, mas que também exerce uma importante função a nível nuclear, o que vem de encontro às teorias existentes de sua função ao nível de reparo de DNA (HOATLIN, 1998).

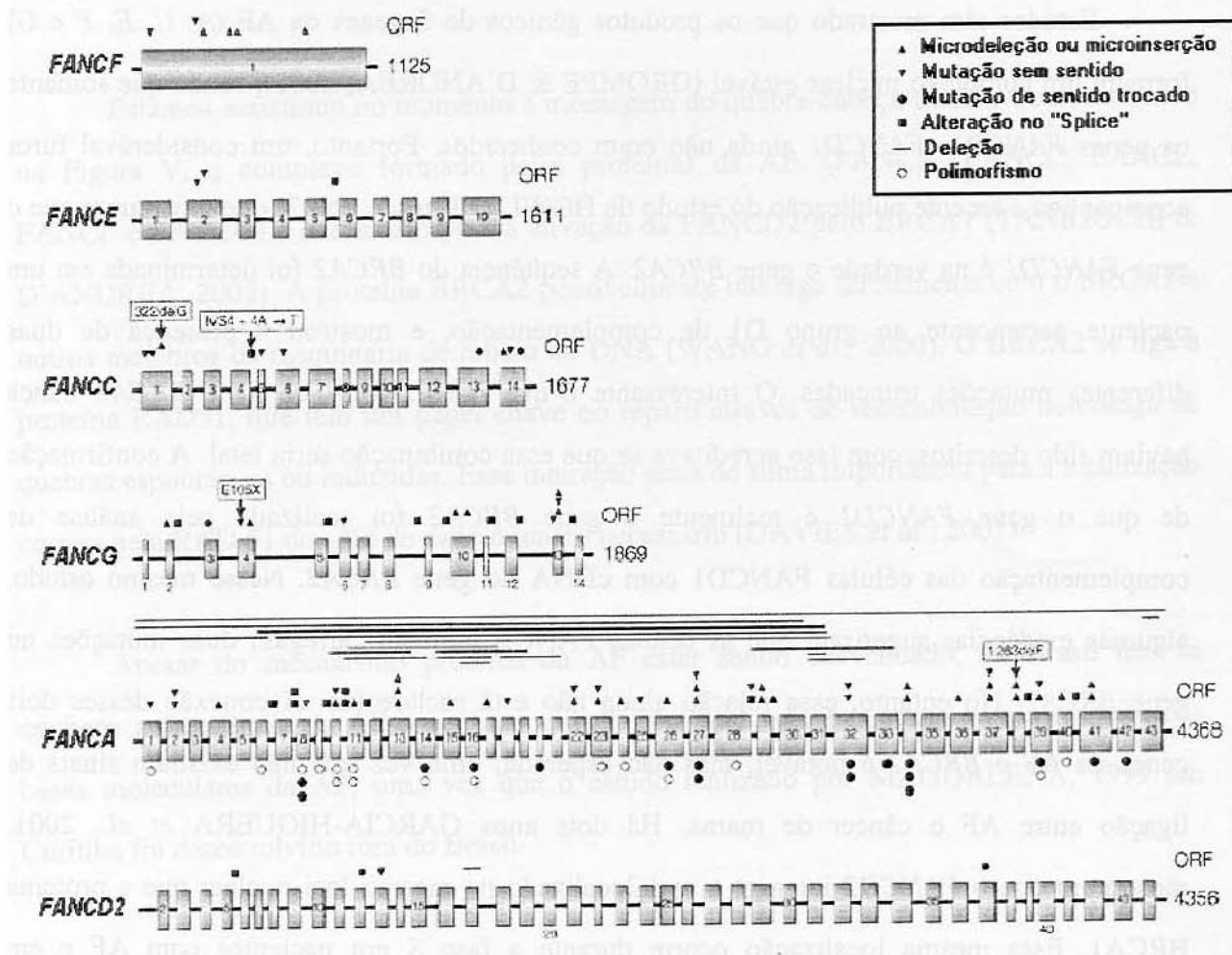
Mutações no gene *FANCC* acometem aproximadamente 14% dos casos de AF diagnosticados. Na análise de 174 famílias do Registro Internacional da AF (IFAR), 8 diferentes variantes foram identificadas em 32 famílias. As mais freqüentes foram a $\Delta G322$ e a $IVS4+4A \rightarrow T$. Outras mutações menos comuns incluem Q13X, R185X, D195V e L554P (VERLANDER *et al.*, 1994). Em todos os trabalhos de análise molecular as duas mutações mais freqüentes estão localizadas: no exon 4, a $IVS4+4A \rightarrow T$ e no exon 1 a $\Delta G322$, acometendo cerca de 90% dos casos de AF de grupo C. A mutação $\Delta G322$ resulta em um fenótipo leve da AF, já a mutação $IVS4+4A \rightarrow T$ resulta num quadro clínico grave de AF (YAMASHITA *et al.*, 1996).

B) GENE *FANCA*

O segundo gene a ser clonado foi o *FANCA* (Grupo de complementação A), por dois grupos de pesquisadores independentes (APOSTOLOU *et al.*, 1996 e LO TEM FOE *et al.*, 1996). O gene *FANCA* localiza-se no braço longo do cromossomo 19 na região 24.3, entre os marcadores D16S3121 e D16S303 (PRONK *et al.*, 1995). O gene *FANCA* tem 5.5 Kb e codifica uma proteína com 1.455 aminoácidos, com uma massa molecular de 163 Kda, que também não tem homologia significativa com outras proteínas conhecidas, e pode, portanto, representar uma classe nova de genes associados com a prevenção ou reparo do dano ao DNA. Consiste de 43 exons, que variam de 34 a 188 pb, em um total de 4.368 nucleotídeos. Até o momento, foram descritas várias mutações do gene *FANCA*, sem aparente predominância de algum alelo específico, dificultando a correlação genótipo/fenótipo.

LEVRAN *et al.*, (1997) pesquisaram a mutação $\Delta 3788-3790$ em 350 pacientes com AF que não pertenciam ao *FANCC*, sendo que 30 eram de origem brasileira. Encontraram 10% dessa mutação no total de pacientes, sendo que esta mutação era especialmente comum entre os pacientes brasileiros existentes em sua amostra, fato este que levou aos autores a chamá-la de mutação brasileira "the common Brazilian mutation".

Para uma relação completa das mutações dos genes *FANCA* e *FANCC*, pode ser consultado o site <http://www.rockefeller.edu/fanconi/mutate>. As mutações dos genes *FANCA* e *FANCC* são responsáveis por aproximadamente 75% dos casos de AF.



Nature Reviews | Genetics

Figura IV - Representação esquemática das estruturas dos genes *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF* e *FANCG*. (adaptado de JOENJE, H.& PATEL K.J., 2001)

AS PROTEÍNAS DA ANEMIA DE FANCONI

Estudos têm mostrado que os produtos gênicos de 5 genes da AF (*A, C, E, F e G*) formam um complexo nuclear estável (GROMPE & D'ANDREA, 2001), sendo que somente os genes *FANCB* e *FANCD1* ainda não eram conhecidos. Portanto, um considerável furor acompanhou a recente publicação do estudo de HOWLETT *et al.*, (2002) que mostraram que o gene *FANCD1* é na verdade o gene *BRCA2*. A seqüência do *BRCA2* foi determinada em um paciente pertencente ao grupo D1 de complementação, e mostrou a presença de duas diferentes mutações truncadas. O interessante é que homocigotos do gene *BRCA2* nunca haviam sido descritos, com isso acreditava-se que essa combinação seria letal. A confirmação de que o gene *FANCD1* é realmente o gene *BRCA2* foi realizada pela análise de complementação das células *FANCD1* com cDNA do gene *BRCA2*. Nesse mesmo estudo, algumas evidências sugeriram que as células *FANCB* também carregam duas mutações no gene *BRCA2*. No entanto, essa relação ainda não está esclarecida. A conexão desses dois genes da AF e *BRCA2* é notável, mas não esperada, uma vez que não existiam sinais de ligação entre AF e câncer de mama. Há dois anos GARCIA-HIGUERA *et al.*, 2001, mostraram que o *FANCD2* interage e está localizado no mesmo loci nuclear que a proteína *BRCA1*. Essa mesma localização ocorre durante a fase S em pacientes com AF e em indivíduos normais após terem sido tratados com agentes clastogênicos, os quais provocam lesões no DNA. A proteína *FANCD2* é ativada por monoubiquilação da lisina na posição 561, numa reação que é dependente do *BRCA1*. Essa modificação é essencial para a resistência celular a agentes clastogênicos. Como o *BRCA1* tem um domínio "RING-finger" com atividade ubiquitina ligase (RUFFNER *et al.*, 2001), é obviamente tentador especular que o *FANCD2* é um substrato para a atividade ubiquitina ligase do *BRCA1*. Entretanto, isto não

tem sido demonstrado diretamente, mas é interessante notar que células com BRCA1 defeituosas, como as células AF, são sensíveis a Mitomicina C (MOYNAHAN *et al.*, 2001).

Estamos assistindo no momento à montagem do quebra-cabeça da AF. Como indicado na Figura V, o complexo formado pelas proteínas da AF. (FANCA, FANCC, FANCE, FANCF e FANCG) é necessário para a ativação da FANCD2 pelo BRCA1 (TANIGUCHI & D'ANDREA, 2002). A proteína BRCA2 possivelmente interage diretamente com o BRCA1 e outros membros da maquinaria de reparo do DNA (WANG *et al.*, 2000). O BRCA2 se liga à proteína RAD51, que tem um papel chave no reparo através de recombinação homóloga de quebras espontâneas ou induzidas. Essa interação seria de suma importância para a localização correta pela RAD 51 do sítio de dano e reparo necessário (DAVIES *et al.*, 2001).

Apesar do mecanismo protéico da AF estar sendo desvendado, no Brasil não se conhece a frequência da AF e nenhum trabalho foi realizado em nosso país a respeito das bases moleculares da AF, uma vez que o estudo realizado por MAGDALENA, 1999 em Curitiba foi desenvolvido fora do Brasil.

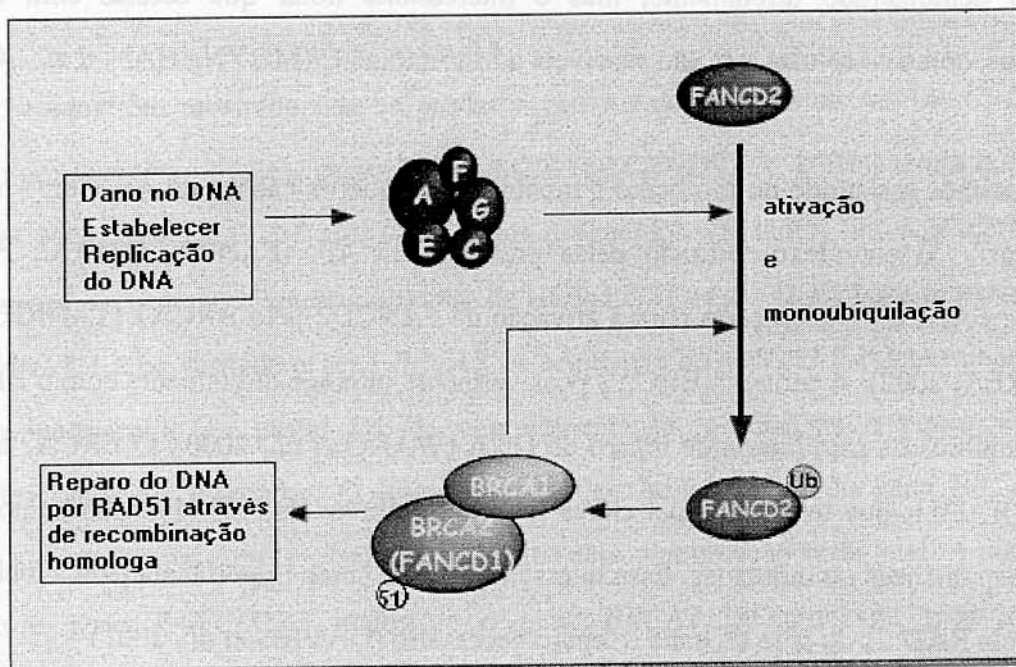


Figura V - Interação entre as proteínas da AF e o mecanismo de reparo do DNA. As proteínas FANCA, FANCC, FANCE, FANCF e FANCG formariam um complexo nuclear. Em resposta ao dano do DNA ou durante a replicação do DNA, o complexo pode resultar na ativação de monoubiquilação da proteína FANCD2. BRCA1 seria também necessária para a ubiquilação da proteína FANCD2. A proteína FANCD2 ativada, localizada dentro do mesmo loci nuclear que a BRCA1, onde iria interagir com outras proteínas de reparo. A interação da BRCA1 com BRCA2 é bem conhecida, Em um próximo passo a BRCA2 iria interagir com a proteína RAD51. A proteína RAD51 é provável que tenha um papel direto no reparo do DNA completando assim o ciclo. (adaptado de WEST, S.C., 2002).

II - OBJETIVO

Investigar as alterações moleculares mais frequentes no gene *FANCC*, bem como a mutação $\Delta 3788-3790$ do gene *FANCA*, nos pacientes que apresentaram manifestações clínicas sugestivas de AF. Nos casos em que apenas uma mutação for detectada no gene *FANCA*, será realizada a triagem pelo método de polimorfismo da conformação da fita simples (SSCP), nos exons onde há um grande número de mutações descritas. Quando alguma alteração for detectada faremos o seqüenciamento.

Com isso, pretendemos padronizar a investigação molecular de pacientes com AF em nosso país, uma vez que esse estudo atualmente tem sido realizado no exterior.

III – CASUÍSTICA E MÉTODO

CASUÍSTICA

Foram analisados 52 pacientes com suspeita clínica de AF triados nos ambulatórios de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica, nos ambulatórios de Hematologia do Hemocentro e casos que nos foram enviados por diversos hematologistas.

O critério de inclusão no estudo foi a presença de sinais clínicos que permitiam a suspeita de AF.

MÉTODOS

Os métodos utilizados foram: 1 - cultura de linfócitos com o agente clastogênico diepoxibutano (DEB), realizado pelo Laboratório de Citogenética do Hemocentro, coordenado pela Profa. Dra. Carmen Sílvia Passos Lima e 2 - análise molecular por PCR (SAIKI *et al.*, 1989) associada a digestão enzimática. Em alguns casos foi realizada uma triagem de mutações e seqüenciamento.

A) ANÁLISE CITOGENÉTICA

A.1. CULTURA DE LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO PARA DETECÇÃO DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS NA AF COM USO DE DIEPOXIBUTANO (DEB).

A técnica utilizada seguiu o protocolo proposto por ROSENDORFF *et al.* (1987) e AUERBACH *et al.* (1989) com algumas modificações, atualmente empregadas na rotina do Laboratório de Citogenética do HEMOCENTRO-UNICAMP (Profa. Dra Carmen Sílvia Passos Lima).

a) Coleta de Sangue: Foram retirados assepticamente 20 ml de sangue venoso de cada um dos 52 pacientes com auxílio de agulha e seringa heparinizada.

b) Meio de Cultura: O meio utilizado para o cultivo dos linfócitos foi RPMI 1640 (CULTILAB) num volume de 10 ml por frasco plano de cultura de células, contendo 20% de Soro Fetal Bovino (CULTILAB), 1% de Heparina (ORGANON TEKNIKA) e 1% de Penicilina G potássica, em pH 6,8.

c) Semeadura: Foram inoculados cerca de 1×10^7 leucócitos por frasco num volume final de 10 ml de meio de cultura, sendo esta operação realizada em câmara asséptica ou fluxo laminar. Esse conteúdo foi lançado em 4 frascos por paciente: 2 com DEB e 2 sem DEB, acrescentando-se 200 µl de fitohemaglutinina M (DIFCO) em cada frasco de cultura.

d) Período de incubação: As culturas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C, a fim de verificar a frequência de alterações cromossômicas nas células "*in vitro*".

e) Adicionar o DEB: Após 24 horas do início da incubação foram acrescentados 10 µl de DEB (0,1 µg/ml) em apenas dois frascos de cada paciente.

f) Interrupção da cultura: Foram adicionados aos quatro tubos de cultura 100 µl de demecolcine (INC) (5 µg/ml) 20 minutos antes do final do período de incubação. Ao término do período de incubação, foram retirados os frascos de cultura da estufa, agitando-os levemente e o conteúdo transferido para tubos cônicos de vidro de 15 ml (15x123mm). A suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 1100 rpm e posteriormente foi removido o sobrenadante e homogeneizado em “vortex”.

g) Hipotonia: Foi utilizada a solução hipotônica de KCl 0,075 M aquecida a 37°C. A hipotonia foi realizada de forma progressiva (PINTO Jr, 1985), acrescentando 1 ml de solução a cada 10 minutos, ressuspensando delicadamente o sedimento com pipeta PASTEUR. Após 50 minutos, a hipotonia foi interrompida quando se acrescentou 0,5 ml de fixador, recém preparado (metanol-ácido acético glacial em uma proporção 3:1), homogeneizando a solução.

h) Fixação: O material foi centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. Em seguida removeu-se o sobrenadante, logo após foi ressuspensado o sedimento. Foram acrescentados 4 ml de fixador em cada tubo, homogeneizando o material com uma pipeta PASTEUR e centrifugando a 1100 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento por mais três vezes. Após a última lavagem com fixador foi deixada uma quantidade do sobrenadante proporcional ao sedimento e refrigerou-se a -20°C por um período de no mínimo 1 hora. Ao término da refrigeração, as amostras foram retiradas do “freezer” e colocadas a temperatura ambiente e procedeu-se com uma última lavagem. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para eliminar o sobrenadante, deixando uma proporção igual ao sedimento, para serem ressuspensadas com ajuda de uma pipeta PASTEUR.

i) Preparação das lâminas: Após a lavagem das lâminas com sabão e água corrente, as mesmas foram submetidas à solução de ácido nítrico a 10% por 1 hora, posteriormente foram lavadas com água desionizada quente por 10 vezes e com água desionizada fria por 10 vezes, na seqüência as lâminas foram submersas em álcool etílico comum por 5 minutos. Em seguida foram secas com papel absorvente macio para depois pingar de 3 a 4 gotas do material homogeneizado sobre as lâminas levemente inclinadas. Ao término, as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C até a secagem.

j) Coloração das lâminas: as lâminas foram coradas pela coloração usual com Giemsa (GURR) a 6% diluído em tampão Fosfato de Sorensen 0,1M (0,2M KH_2PO_4 + 0,2M $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), a pH 6,8 por 10 a 15 minutos.

A.2. ANÁLISE DAS LÂMINAS:

Na determinação das aberrações cromossômicas estruturais foram selecionadas metáfases em boas condições de análise, espalhadas e bem coradas. Foram analisadas células com o conteúdo diplóide de 46 cromossomos ou mais, desprezando-se as metáfases com menos de 46 cromossomos. A análise foi feita sob lente de imersão de 100x e ocular de 10x.

As lâminas foram codificadas para análise em teste-cego. Sempre que possível, foram analisadas 100 metáfases por indivíduo processado, sendo 50 metáfases das expostas ao DEB e 50 metáfases das não expostas ao DEB.

B) ANÁLISE MOLECULAR

B.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE LEUCÓCITOS

O DNA foi extraído de células de sangue periférico, segundo o método clássico com Proteinase K e Cloreto de Lítio, atualmente empregado na rotina do Departamento de Genética Médica da Unicamp.

a) Coleta de Sangue: Foram retirados assepticamente 5 ml de sangue venoso de cada um dos 52 pacientes com auxílio de agulha e tubo “vacutainer” contendo anticoagulante (EDTA 10%).

b) Preparação das alíquotas: a amostra de sangue foi centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos, e após o descarte do plasma, foi cuidadosamente transferida uma alíquota de 500 µl da papa de hemácias e leucócitos para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Esta alíquota foi armazenada no “freezer” a -20°C até a obtenção de uma quantidade de amostras suficientes para o início da extração de DNA.

c) Protocolo de extração do DNA: Para cada tubo de microcentrífuga contendo a alíquota preparada foi adicionado 1,0 ml de tampão de lise celular “cell lysis buffer” (Sacarose 320 mM; Tris HCl 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 5mM e Triton x100 1%). Tampou-se o tubo de microcentrífuga e homogeneizou-se em “vortex” por 10 a 15 segundos e centrifugou-se a 6000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente por decantação, sem eliminar o pellet. Os passos da lavagem foram repetidos por duas vezes. Posteriormente, para cada tubo de amostra foram adicionados 395 µl de tampão de digestão

“protein digestion buffer” (Tris HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; NaCl 10 mM e SDS 0,5%) e 5 µl de Proteinase K (20 mg/ml), homogeneizando cada amostra no “vortex” por 10 a 15 segundos. Logo após, as amostras foram levadas ao banho Maria a 55°C por 2 horas. Ao término desse período, as mesmas foram resfriadas na geladeira por pelo menos 10 minutos e em seguida adicionados 200 µl de LiCl 7,5M em cada uma delas, as quais foram agitadas por 15 segundos no “vortex” e depois colocadas no “freezer” por 10 minutos. Na seqüência, foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos, com a finalidade de retirar cuidadosamente o sobrenadante o qual foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga devidamente rotulado, evitando transferir qualquer precipitado. Posteriormente foi adicionado 1ml de etanol absoluto no novo tubo. Na seqüência, o tubo foi homogeneizado por inversão, até que o DNA ficasse visivelmente precipitado. Não obtendo esse resultado, a amostra foi deixada por 2 horas no “freezer” a -20°C e se após esse período, a precipitação não ocorrer, as amostras permaneceram no freezer por toda a noite. Depois desse período, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos, a fim de retirar o etanol por decantação. Lavou-se novamente o pellet com 1 ml de etanol 70%, repetindo a operação de centrifugação a 13000 rpm por mais 10 minutos. Posteriormente o etanol foi descartado por decantação, restando somente o DNA que secou a temperatura ambiente. Depois de seco, ao DNA foram adicionados 60 µl de água de ampola para a hidratação. A solução foi agitada no “vortex” por 10 segundos e em seguida, incubada a 55°C por 15 min no banho-maria. Na seqüência, realizou-se uma centrifugação a 13000 rpm por 15 segundos. O DNA obtido foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8% a 100 volts e corado com brometo de etídio.

B.2. AMPLIFICAÇÃO GÊNICA (PCR)

Os componentes da reação de amplificação foram 30 pmol de cada “primer” ou desencadeador (GIBSON *et al.*, 1996 e MADALENA, 1999); 200 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP); Taq DNA polimerase 5 U/ μ l; tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,4; 1,5 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂) e 1 μ g de DNA genômico.

A reação de amplificação foi realizada em aparelho termociclador e consistiu numa desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos. Em seguida, a reação foi submetida a 30 ciclos de três etapas: iniciando com uma desnaturação de 94°C por 1 minuto, seguida de uma temperatura de hibridização (°C) por 1 minuto de acordo com a Tabela II que indica as diferentes temperaturas para cada mutação, e fechando o ciclo, uma extensão de 72°C por 1 minuto. Ao término dos 30 ciclos, seguiu-se uma extensão final de 72°C por 7 minutos. As mutações foram detectadas por digestão utilizando enzimas de restrição específicas, conforme tabela III.

B.3. VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

O resultado da digestão foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida 7% e corado com brometo de etídio.

Tabela II - Produtos da reação de amplificação dos genes *FANCC* e *FANCA* para as diferentes mutações com suas respectivas seqüências desencadeadoras e temperaturas de hibridização.

Genes da AF	Mutações Estudadas	Seqüência dos Iniciadores ou Desencadeadores "Forward" e "Reverse" 5'→3'	T (°C) Hibridização	Produto do PCR
<i>FANCC</i>	Q13X	F: 5' CAG TAG ATC TTT CTT GTG ATG AT 3' R: 5' ACC ACA AGT CCC GAT TCT GGG 3'	56	250 pb
<i>FANCC</i>	W22X	F: 5' TGG ATG CAG AAG CTT TCT GGA TG 3' R: 5' ACC ACA AGT CCC GAT TCT GGG 3'	55	221 pb
<i>FANCC</i>	ΔG322	F: 5' ACC ATT TCC TCC AGT GTC GG 3' R: 5' GTT TCC AAA GTG GAA GCC TGA GCC 3'	59	151 pb
<i>FANCC</i>	IVS4+4A→T	F: 5' CTC ATA TAC TTT CAG CAC TCA G 3' R: 5' TTT CAA AAG TGA TAA ATA TTA AGT AC3'	51	131 pb
<i>FANCC</i>	R185X	F: 5' GTC CTT AAT TAT GCA TGG CTC 3' R: 5' CCA CTT ATT ACC CTG ACA 3'	53	122 pb
<i>FANCC</i>	L496R	F: 5' CCT AGA AGT ATG TCT GTC CTG 3' R: 5' CTC TCC TTG ACT AGG ATG CTG 3'	50	303 pb
<i>FANCC</i>	R548X	F: 5' GTT ATG GTC CGT CCC TGG AC 3' R: 5' ACT TAC TCC ACA AAT GCG TGG 3'	60	364 pb
<i>FANCC</i>	L554P	F: 5' GTT ATG GTC CGT CCC TGG AC 3' R: 5' ACT TAC TCC ACA AAT GCG TGG 3'	55	364 pb
<i>FANCA</i>	Δ3788-3790	F: 5' ACG ATT TAT GGC CTA GAT GTA AAA 3' R: 5' GAC GAC AGC AGG CCC ATC AAG GAA 3'	55	160 pb

(Adptado de GIBSON, R.A . *et al*, 1996 e MAGDALENA, 1999)

Tabela III - Temperaturas de incubação e tamanhos dos fragmentos observados nas diferentes mutações após digestão com enzimas de restrição específica.

Genes da AF	Mutações Estudadas	Enzima de Restrição	T (°C) Incubação	Fragmentos Normais (pb)	Fragmentos Mutantes (pb)
<i>FANCC</i>	Q13X	<i>Bcl</i> I	50	227 + 23	250
<i>FANCC</i>	W22X	<i>Fok</i> I	37	204 + 17	187 + 17 + 17
<i>FANCC</i>	ΔG322	<i>Bsp1286</i> I	37	128 + 22	151
<i>FANCC</i>	IVS4+4A→T	<i>Sca</i> I	37	108 + 23	131
<i>FANCC</i>	R185X	<i>Nla</i> III	37	105 + 17	74 + 31 + 17
<i>FANCC</i>	L496R	<i>Hha</i> I	37	303	218 + 85
<i>FANCC</i>	R548X	<i>Ava</i> I	37	231 + 133	364
<i>FANCC</i>	L554P	<i>Bbv</i> I	37	260 + 104	364
<i>FANCA</i>	Δ3788-3790	<i>Mbo</i> II	37	130 + 30	160

(Adptado de GIBSON, R.A . *et al*, 1996 e MAGDALENA, 1999)

B.4. SSCP (SINGLE STRANDS CONFORMATION POLYMORPHYSM)

O SSCP dos exons 1,4,6,7,8,10,11,13 a 19, 22, 23, 26 a 29, 32,34, 36 a 41 do gene *FANCA* foi realizada nas amostras em que foi detectado um alelo da mutação $\Delta 3788-3790$. As amostras de PCR radioativo foram amplificadas segundo VERLANDER *et al.*,1994 (Tabela IV), foram diluídas em uma solução de formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% e xilenocianol 0.05%, na proporção 1:4; e posteriormente desnaturadas entre as temperaturas de 80 a 100°C por 5 minutos. Desta solução, 1 ul foi aplicado em gel de poliacrilamida 7% não desnaturante.

As condições de eletroforese foram de 25 volts por 2 horas a 15°C. O gel foi seco em aparelho apropriado e exposto por cerca de 5 dias. A seguir foi colocado em um cassete com filme de raio X. A autorradiografia foi revelada cerca de 5 dias após a exposição a temperatura ambiente.

Tabela IV - Produtos da reação de amplificação nas diferentes mutações com suas respectivas seqüências desencadeadoras e temperaturas de hibridização do gene *FANCA*.

Exon	Seqüência dos Iniciadores ou Desencadeadores "Forward" e "Reverse" 5'→3'	T (°C) Hibridização	Produto do PCR
1	F: 5'GGCCGCAGCCAATAGGAAGG 3' R: 5' GATCGGGAACCGGCGAAAC 3'	60	222 pb
4	F: 5' GTGTTGCATCTTAAAATAAGGC 3' R: 5' GCTATGTCCTATTTTCCCAAC 3'	60	315 pb
6	F: 5' GCCCAAAGGCCAGGGAGTTT 3' R: 5' AGCCAGAAATCAAACCCGTCTGA 3'	58	384 pb
7	F: 5' GGGACATATGGCTCAACTCAATC 3' R: 5' GAGACAGGCTGTTCTGCCTCGC 3'	60	291 pb
8	F: 5' CTGAAGTGGATGGTCTGTGCC3' R: 5' CCCGTAATAGGTACAAACAGC 3'	59	278 pb
10	F: 5' GTAGAAGTCTTGATGGATGTG 3' R: 5' CTGCTGAAGCTCTGGAAGTG 3'	60	297 pb
11	F: 5' GATTGGTGGGTTGCGTGCAAGGC 3' R: 5' AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC 3'	60	272 pb
13	F: 5' GAGCTGTCACAGCTCCATGTG 3' R: 5' GTGGGAAGGGCTTCACTGAG 3'	60	398 pb
14	F: 5' GGAATACTTGATCACCCAGC3' R: 5' GCTGACAGCAAGGTTGCTCAC 3'	59	337 pb
15	F: 5' AGGAGGCCGACTACAGC 3' R: 5' CTTGGGGAGGCCAAGGCAGTC 3'	58	268 pb
16	F: 5' CAGCACTGTGGATGTTGGAAG 3' R: 5' GAAAACAAAGCAGTTTCTGCTGG 3'	58	202 pb
18	F: 5' CGCACAGCATGTGGGCCTTTACC 3' R: 5' GAATAGAGTGGCCAACCTG 3'	59	277 pb
19	F: 5' GAAACACCGGTCACCGTCTGTG 3' R: 5' AGATCCACGATTCTTCGCATTGTC 3'	55	353 pb
22	F: 5' GTTCACAGCTCTGTATTTGAC 3' R: 5' CTA CTGGACTAGGAAGAC 3'	58	330 pb

Cont.

Exon	Seqüência dos Iniciadores ou Desencadeadores "Forward" e "Reverse" 5'→3'	T (°C) Hibridização	Produto do PCR
23	F: 5' AGCAGGATCCGTGGAATCGTAC 3' R: 5' GAGAAGGCTCCATGCGTCTAATG 3'	55	328 pb
26	F: 5' GAGGGCCAGGCTGCTACTT 3' R: 5' GACAGATAAAATTCTGGAAGG 3'	60	424 pb
27	F: 5' CAGGCCATCCAGTTCGGAATG 3' R: 5' CCTTCCGGTCCGAAAGCTGC 3'	60	284 pb
28	F: 5' GTGTGGGCTGTTGATGGTCTGTT 3' R: 5' CTGTTCTTGCCCGAGGAGCACA 3'	55	361 pb
29	F: 5' GTGTGTTCTGTCCTCATTG 3' R: 5' GATTCAAGAGATCTCCTGCC 3'	58	214 pb
32	F: 5' CTTGCCCTGTCCACTGTGGAG 3' R: 5' CTCACTACAAAGAACCTCTAGG 3'	58	369 pb
34	F: 5' GCCAAGCCTTAGCGAGTGTTT 3' R: 5' AGCAGGAGGTCAGCGGTTTGT 3'	56	300 pb
36	F: 5' GTCATGGCTGGGGCAGCGGAG 3' R: 5' GCATCTGGGCGGGCACAC 3'	62	260 pb
37	F: 5' GGTGACAGGTGGGAATAAGGAC 3' R: 5' CTTGCTCCAAGCCACATATTTG 3'	59	347 pb
38	F: 5' AGGATTTATGGCCTAGATGTAAAAA 3' R: 5' CTGGTGCCCCTGCCTGG 3'	50	240 pb
39	F: 5' GCAAAGAGGAAATGCCCTGTT 3' R: 5' GGGCTCGTTCCTTAACCATTTG 3'	55	288 pb
40	F: 5' CCAGCTGCTGACAGGTACC 3' R: 5' GGACCCAGAAGTGCTGAGATG 3'	55	310 pb
41	F: 5' CCCCATCTCAGCACTTCTGGGTCC 3' R: 5' CCATAGTCTCCATGCTGTGC 3'	60	382 pb
42	F: 5' GCACAGCATGCAGACTATGG 3' R: 5' GTCGAGTTGTATTGCCAGCC 3'	58	271 pb

(Adptado de MAGDALENA, 1999)

B.5. SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos que apresentaram alteração na corrida quando comparados ao controle normal, foram seqüenciados para verificar a existência de alguma mutação.

Para a realização do seqüenciamento utilizamos o Kit “Sequenase PCR Product Sequencing da United States Biochemical (USB)”, seguindo as especificações do fabricante.

O gel para o seqüenciamento consistiu em gel de poliacrilamida 8% em tampão TEB (Tris - 0.89M, Ácido Bórico - 0.89 M e EDTA - 20 mM) e Uréia 8M, em placas de 33 x 38 e 33 x 40 cm com espessura de 0.4 mm.

Aproximadamente 4 µl do produto de reação de seqüenciamento foram desnaturados e aplicados no gel. O tampão utilizado foi o TEB 1X, a 60 volts por 2 a 3 horas, a temperatura ambiente. O gel foi seco e colocado em um cassete com filme de raio X. A autoradiografia foi revelada após 5 dias de exposição.

IV - RESULTADOS

Dos 52 pacientes com suspeita clínica de AF, em 22 casos, foi possível confirmar o diagnóstico por meio do DEB teste (Figura VI) e (ou) pela análise molecular. Nos outros 30 casos (57,7%) apesar de existir a suspeita clínica, nenhum dos dois métodos possibilitou o diagnóstico de certeza e, portanto, o diagnóstico de AF não pôde ser nem confirmado nem afastado. Para efeito desse estudo, analisaremos os 22 casos em que o diagnóstico foi confirmado.

A nossa amostra foi composta por 7 homens e 15 mulheres com uma idade variando entre 2 a 33 anos, com média de 14,1 anos, desvio padrão de 7,8 e uma mediana de 14,0, sendo 14 caucasóides (C) e 8 negróides (N). A análise familiar foi possível em alguns casos.

Os pacientes não eram relacionados, com exceção dos casos 6 e 7, que são irmãos. Em três casos tivemos consangüinidade na família (verificar Detalhamentos dos casos, pág. 47).

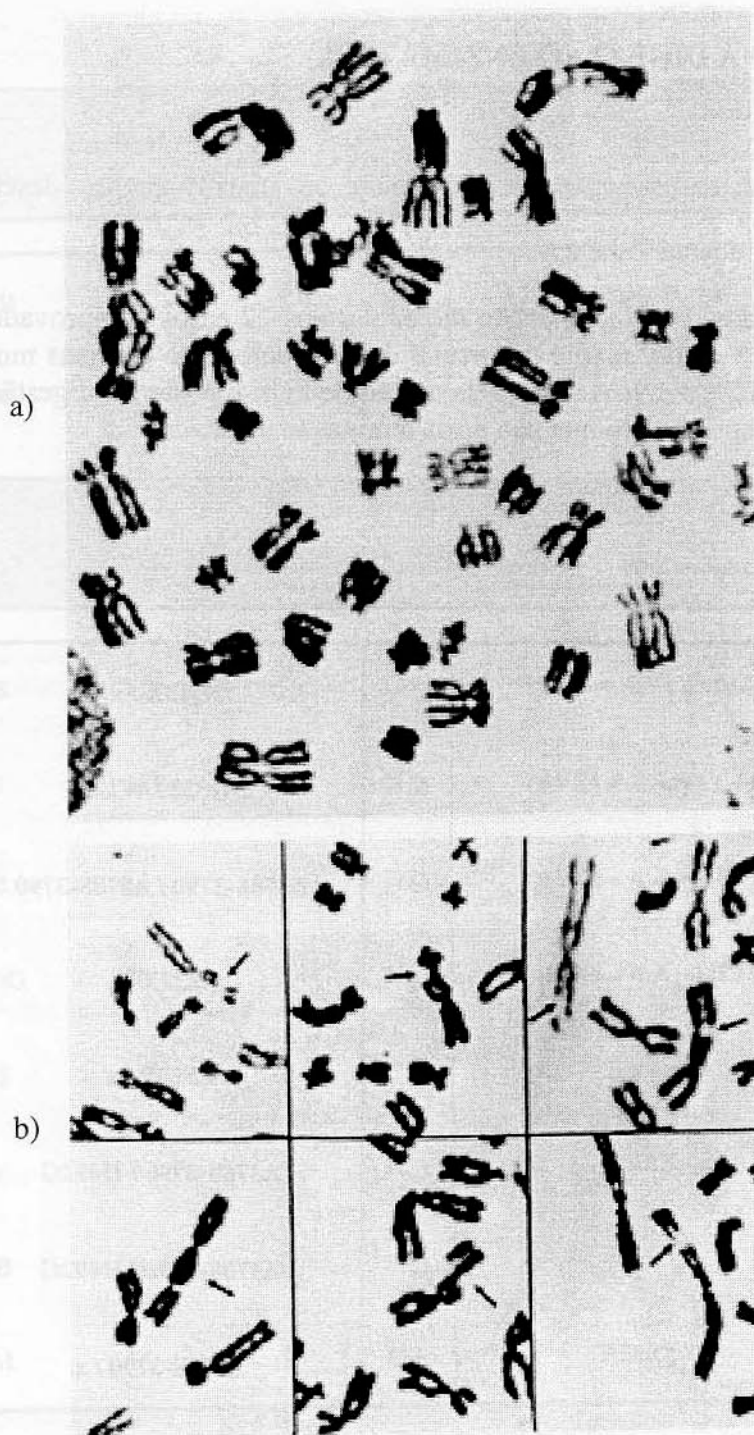


Figura VI - Alterações citogenéticas no DEB teste em um caso de Anemia de Fanconi. Onde podemos observar: a) duplicação cromossômica; b) presença de quebras cromossômicas e quebras cromatídicas.

PCR ASSOCIADO À DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Os resultados referentes à procura das mutações mais frequentes descritas na literatura encontram-se resumidos na Tabela V.

Tabela V - Resultados da caracterização molecular dos 22 casos comprovados da Anemia de Fanconi, mostrando a idade, sexo e tipo racial dos pacientes e as diversas mutações encontradas para os genes *FANCC* e *FANCA* através da reação de PCR e posterior digestão com enzima de restrição. (x - representa o alelo que não porta a mutação estudada).

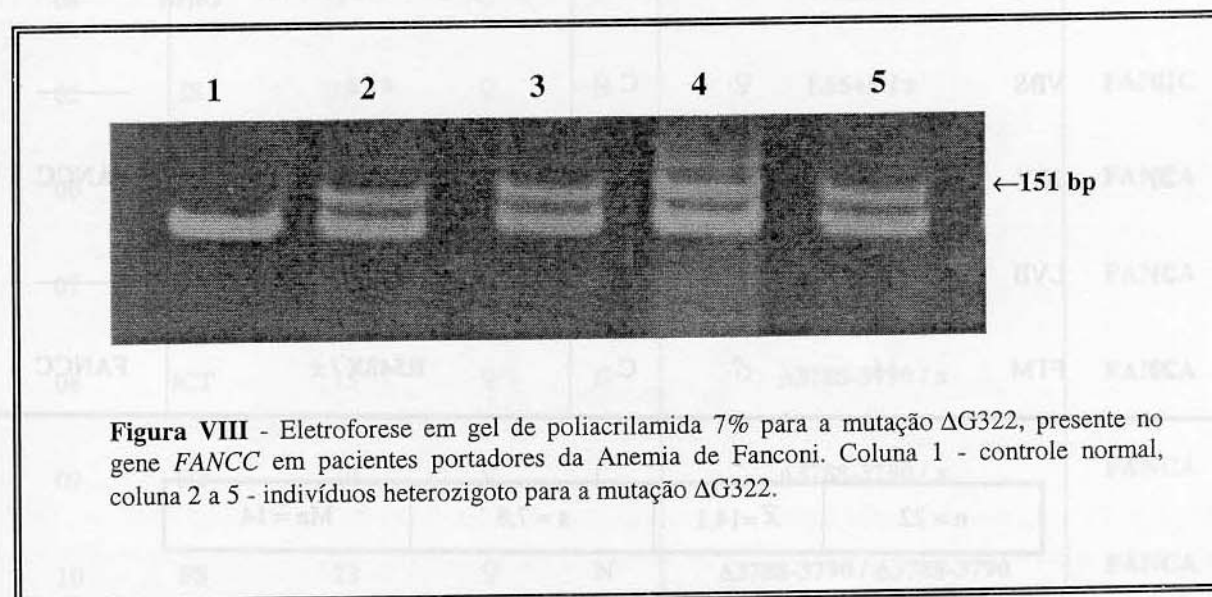
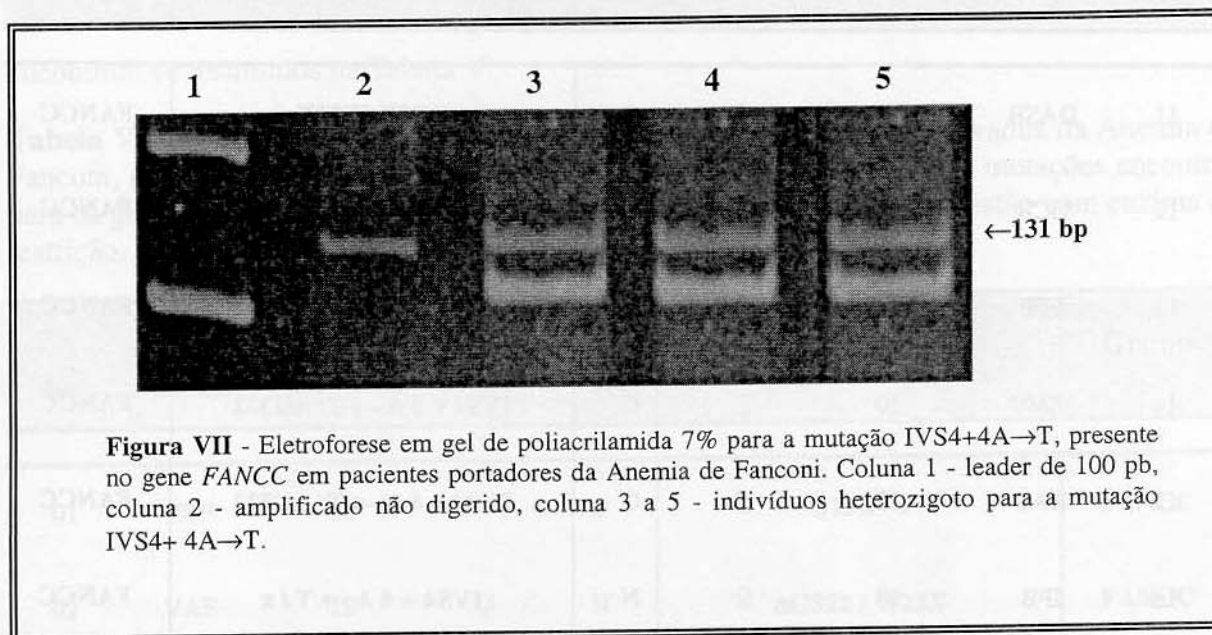
No.	Iniciais	Paciente Idade (anos)	Sexo	Raça	Genótipo	Grupo
01	SRF	33	♀	C	Q13X / x	FANCC
02	VAF	18	♀	N	Δ G322 / W22X	FANCC
03	DTG	28	♀	C	Δ 3788-3790 / Δ 3788-3790	FANCA
04	BHRJ	2	♂	C	W22X / x	FANCC
05	IS	19	♀	N	L554P / x	FANCC
06	AMA	8	♂	C	Δ 3788-3790 / H492G	FANCA
07	NSMA	6	♀	C	Δ 3788-3790 / H492G	FANCA
08	JCT	15	♀	C	Δ 3788-3790 / x	FANCA
09	CT	10	♀	C	Δ 3788-3790 / x	FANCA
10	FS	23	♀	N	Δ 3788-3790 / Δ 3788-3790	FANCA

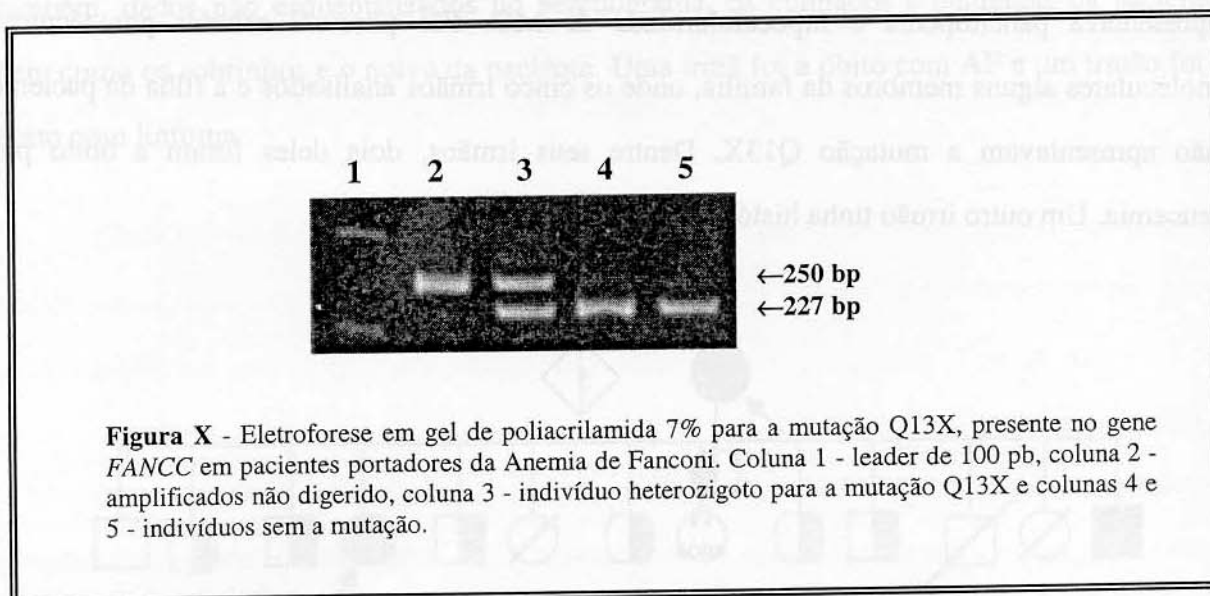
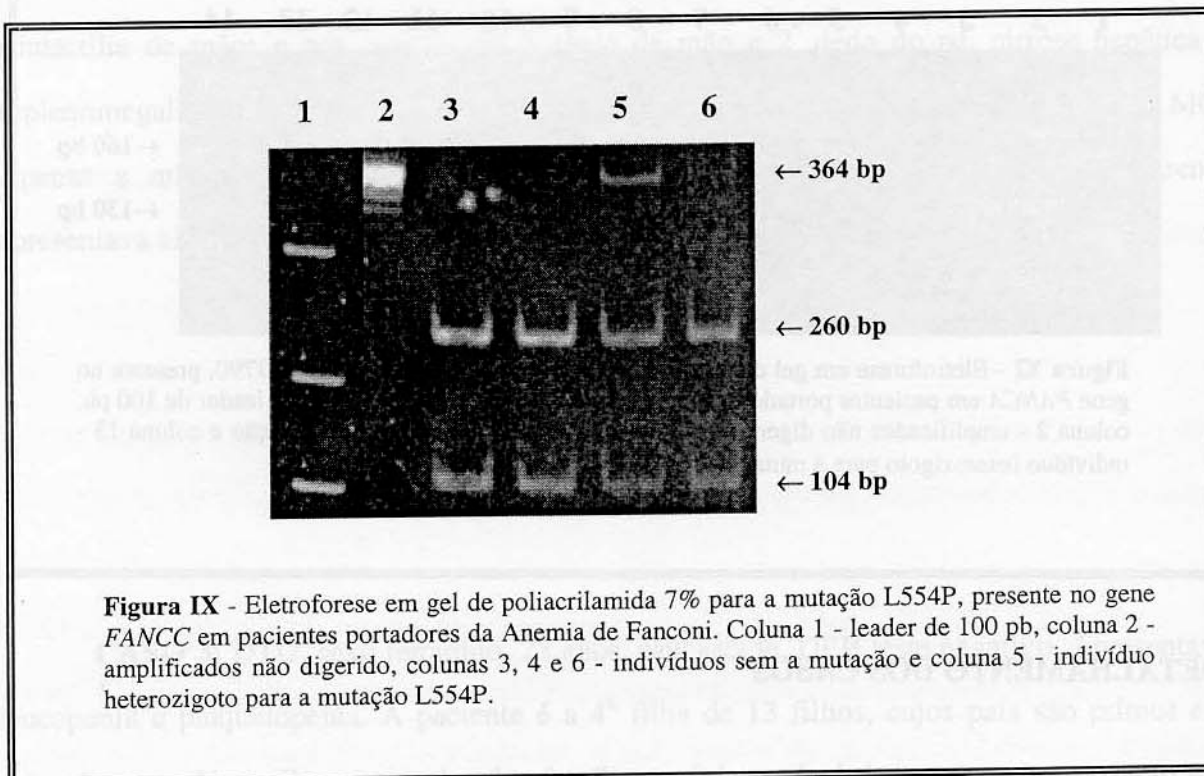
Cont.

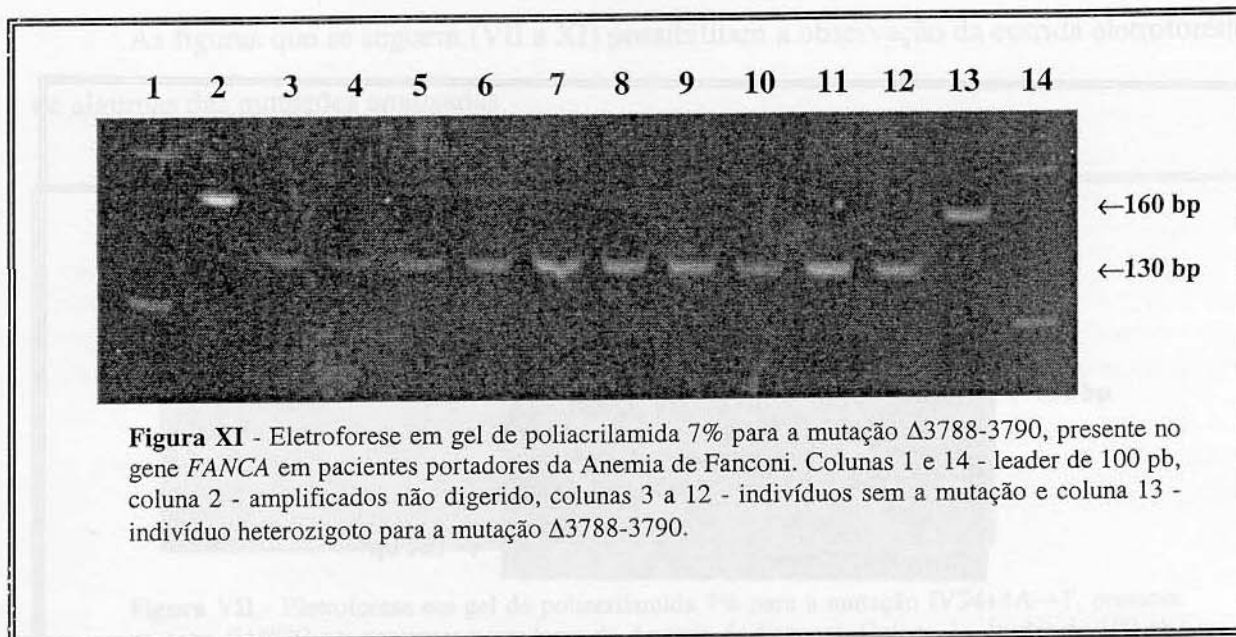
No.	Iniciais	Paciente Idade (anos)	Sexo	Raça	Genótipo	Grupo
11	DASB	14	♂	C	W22X/W22X	FANCC
12	GCR	8	♀	C	IVS4 + 4 A → T / x	FANCC
13	FFP	18	♂	C	IVS4 + 4 A → T / ΔG322	FANCC
14	MMC	10	♀	C	IVS4 + 4 A → T / ΔG322	FANCC
15	RAS	12	♂	C	IVS4 + 4 A → T / ΔG322	FANCC
16	IFB	18	♀	N	IVS4 + 4 A → T / x	FANCC
17	CFB	15	♀	N	IVS4 + 4 A → T / x	FANCC
18	VWOG	20	♀	N	IVS4 + 4 A → T / x	FANCC
19	VBS	10	♀	C	x / x	_____
20	JCV	5	♂	N	R548X / x	FANCC
21	LVB	3	♀	N	x / x	_____
22	FTM	14	♂	C	R548X / x	FANCC

n = 22	$\bar{x} = 14,1$	s = 7,8	Me = 14
--------	------------------	---------	---------

As figuras que se seguem (VII a XI) possibilitam a observação da corrida eletroforética de algumas das mutações analisadas.

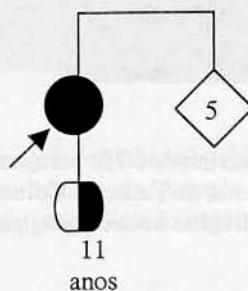




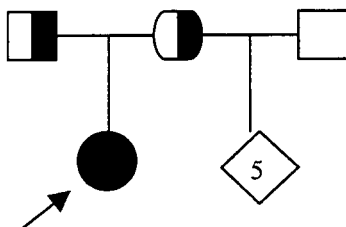


DETALHAMENTO DOS CASOS

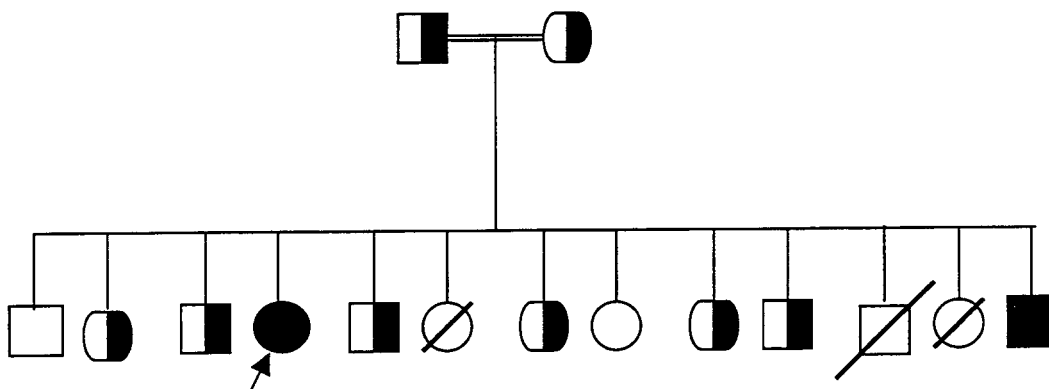
CASO 1: SRF, sexo feminino, 33 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava epistaxe (sangramento nasal), manchas café com leite e possuía mioma uterino. E também apresentava pancitopenia e hipocelularidade de MO. Foi possível estudar por técnicas moleculares alguns membros da família, onde os cinco irmãos analisados e a filha da paciente não apresentavam a mutação Q13X. Dentre seus irmãos, dois deles foram a óbito por leucemia. Um outro irmão tinha história de AF.



CASO 2: VAF, sexo feminino, 18 anos, negróide, DEB teste negativo. Apresentava, sindactilia de mãos e pés, aplasia do 3º dedo da mão e 2º dedo do pé, cirrose hepática e esplenomegalia. E também apresentava leucopenia acentuada e hiperplasia de MO. Apenas a mãe da paciente apresentou um alelo da mutação $\Delta G322$. Nenhum parente apresentava alterações clínicas.



CASO 3: DTG, sexo feminino, 28 anos, caucasóide, DEB teste negativo. Apresentava leucopenia e plaquetopenia. A paciente é a 4ª filha de 13 filhos, cujos pais são primos em segundo grau. Na análise molecular dos familiares, foi possível detectar um homozigoto e 8 indivíduos heterozigotos para a mutação $\Delta 3788-3790$ (incluindo os pais). Foram analisados também, dados não esquematizados no heredograma, os cunhados e cunhadas da paciente, bem como os sobrinhos e o noivo da paciente. Uma irmã foi a óbito com AF e um irmão foi a óbito com linfoma.

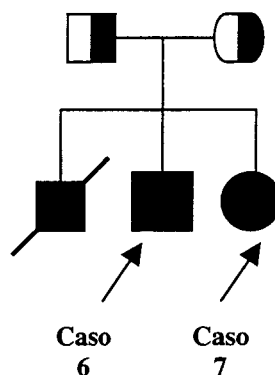


CASO 4: BHRJ, sexo masculino, 2 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava polegar hipoplásico com desvio radial, anemia e plaquetas agrupadas.

CASO 5: IS, sexo feminino, 19 anos, negróide, DEB teste positivo. Apresentava epistaxe, pancitopenia e hipoplasia de MO. Recebeu várias transfusões.

CASO 6: AMA, sexo masculino, 8 anos, caucasóide, DEB teste positivo. O paciente pertence ao grupo de complementação, sem malformações. Apresentava aplasia de MO. O irmão mais velho foi a óbito por AF.

CASO 7: NSMA, sexo feminino, 6 anos, caucasóide, DEB teste positivo. É irmã do caso 6, pertencente ao grupo de complementação A, sem malformações. Apresentava aplasia de MO.



Caso 8: JCT, sexo feminino, 15 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava estatura baixa e anemia.

Caso 9: CT, sexo feminino, 10 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava estatura baixa e pancitopenia.

Caso 10: FS, sexo feminino, 23 anos, negróide, DEB teste positivo. Apresentava estatura baixa e pancitopenia.

Caso 11: DASB, sexo masculino, 14 anos, caucasóide, DEB teste positivo. O paciente é o 3º filho de um casal jovem. Apresentava sangramentos, anemia, leucopenia e hipoplasia de MO.

Caso 12: GCR, sexo feminino, 8 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava formação de equimoses (sangramento cutâneo) esporadicamente, estrabismo, microftalmia e pancitopenia.

Caso 13: FFP, sexo masculino, 18 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava sangramento, equimoses, hiperpigmentação da pele, microftalmia, ausência do rim esquerdo e pancitopenia.

Caso 14: MMC, sexo feminino, 10 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava sangramento, palidez, equimoses, hiperpigmentação da pele, microftalmia e pancitopenia.

Caso 15: RAS, sexo masculino, 12 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava sangramento, equimoses, hiperpigmentação da pele, microftalmia, deformidade de polegar e pancitopenia.

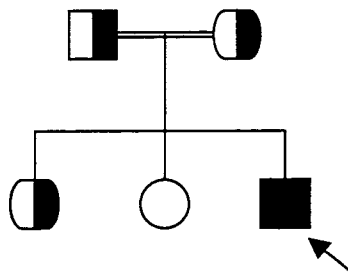
Caso 16: IFB, sexo feminino, 18 anos, negróide, DEB teste positivo. Apresentava sangramento, palidez, equimoses, hiperpigmentação da pele, manchas café com leite, microcefalia, microftalmia e pancitopenia.

Caso 17: CFB, sexo feminino, 15 anos, negróide, DEB teste positivo. Apresentava sangramento, palidez, equimose, hiperpigmentação da pele, microcefalia, microftalmia e pancitopenia.

Caso 18: VWOG, sexo feminino, 20 anos, negróide, DEB teste positivo. Apresentava manchas café com leite, palidez, equimose, microcefalia e microftalmia, e pancitopenia. Foi para transplante e evoluiu para óbito.

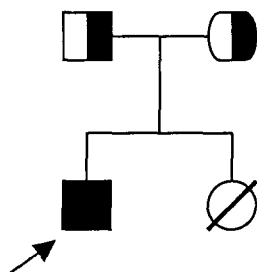
Caso 19: VBS, sexo feminino, 10 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava manchas café com leite, hiploplasia de polegar e pancitopenia.

Caso 20: JCV, sexo masculino, 5 anos, negróide, DEB teste positivo. Apresentava criptorquidia, malformações penianas e anemia grave. Os pais são primos em 1º grau. A análise molecular da família mostrou que a mutação R548X foi herdada do pai e também foi recebida pela irmã mais velha.



Caso 21: LVB, sexo feminino, 3 anos, negróide, DEB teste positivo. Apresentava polegar duplicado, hiperpigmentação, manchas café com leite, microcefalia e microftalmia. Os pais são primos em primeiro grau.

Caso 22: FTM, sexo masculino, 14 anos, caucasóide, DEB teste positivo. Apresentava pancitopenia. A mutação $\Delta G322$ foi herdada da mãe. A irmã mais nova foi a óbito por leucemia mielóide aguda.



SSCP (Single Strands Conformation Polymorphysm)

Com relação à triagem por meio do SSCP, a análise dos exons 1, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13 a 19, 22, 23 26 a 29, 32,34, 36 a 41 do gene *FANCA* dos pacientes 8 e 9 não mostrou nenhuma alteração de corrida, entretanto no exon 16 dos pacientes 6 e 7, uma alteração foi detectada (Figura XII) e foi realizado o seqüenciamento.

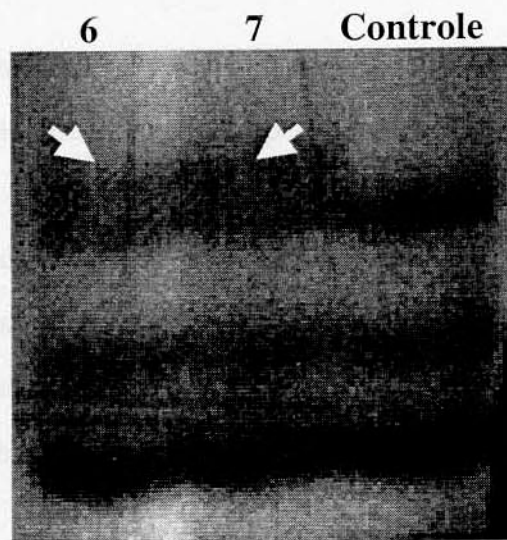


Figura XII - Autorradiografia do polimorfismo da conformação da fita simples (SSCP) radiativo do exon 16, dos pacientes 6, 7 e controle normal mostrando uma alteração de corrida.

SEQÜENCIAMENTO

Os exons analisados dos pacientes 6 e 7 demonstraram a presença da mutação 1475 A→G (H492G), conforme pode ser visto na figura XIII.

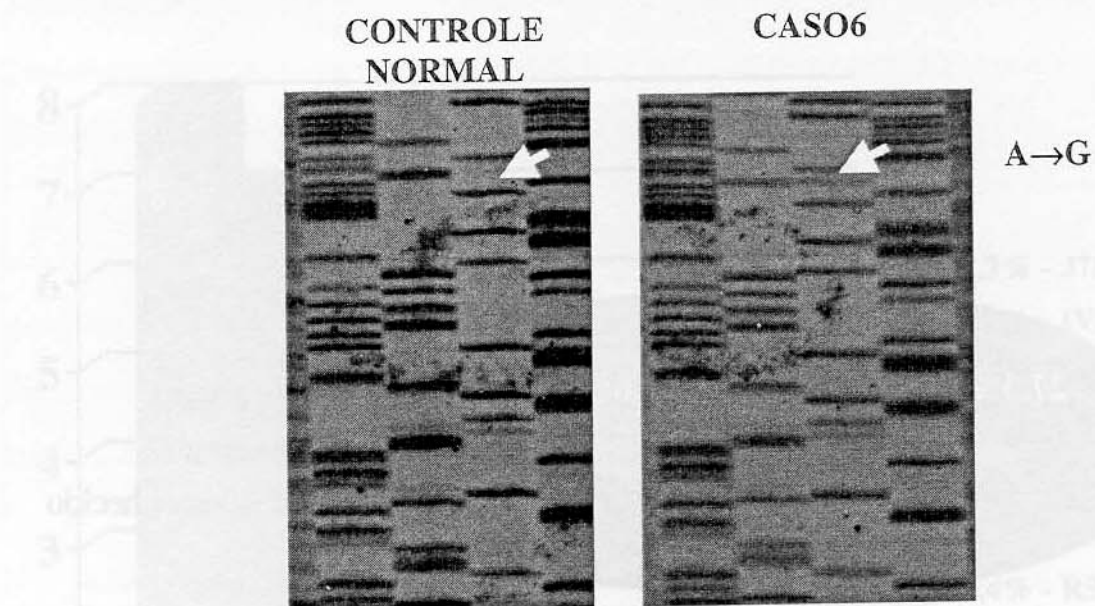


Figura XIII - Autorradiografia do seqüenciamento manual do controle normal e do caso 6. No caso 6 na posição 1475 verificamos a presença de uma troca nucleotídica de adenina (A) para guanina (G) em heterozigose.

RESULTADOS GERAIS

Dos 22 pacientes analisados, verificamos que 14 casos (63%) possuíam mutações pertencem ao grupo C, 6 casos (27,3%) ao grupo A e em 2 casos (9,1%) não detectamos mutações.

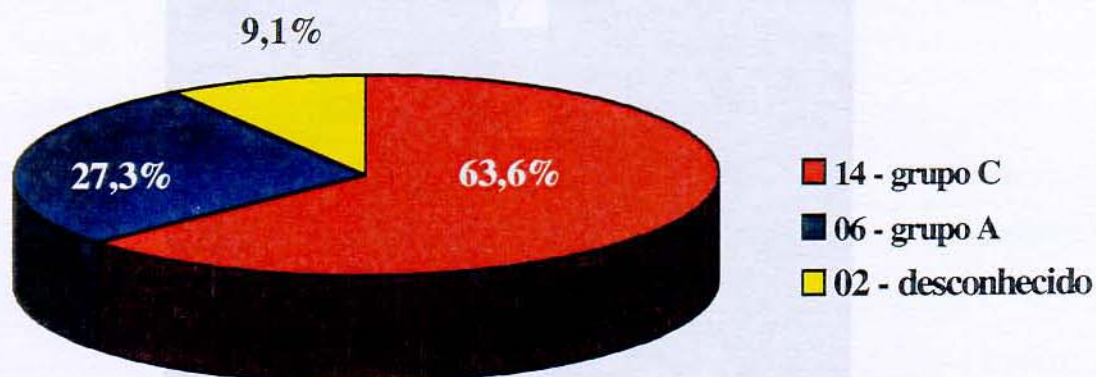


Figura XIV - Distribuição dos grupos de complementação na amostra de 22 pacientes portadores da Anemia de Fanconi

Com relação à prevalência das mutações identificadas, verificamos que 27,7% dos alelos correspondem à mutação $\Delta 3788-3790$; 24,1% à mutação IVS4+4A \rightarrow T; 17,2% à mutação $\Delta G322$; 13,8% à mutação W22X; 6,9% à mutação H492G; 3,4% à mutação L554P; 3,4% à mutação R548X e 3,4% à mutação Q13X

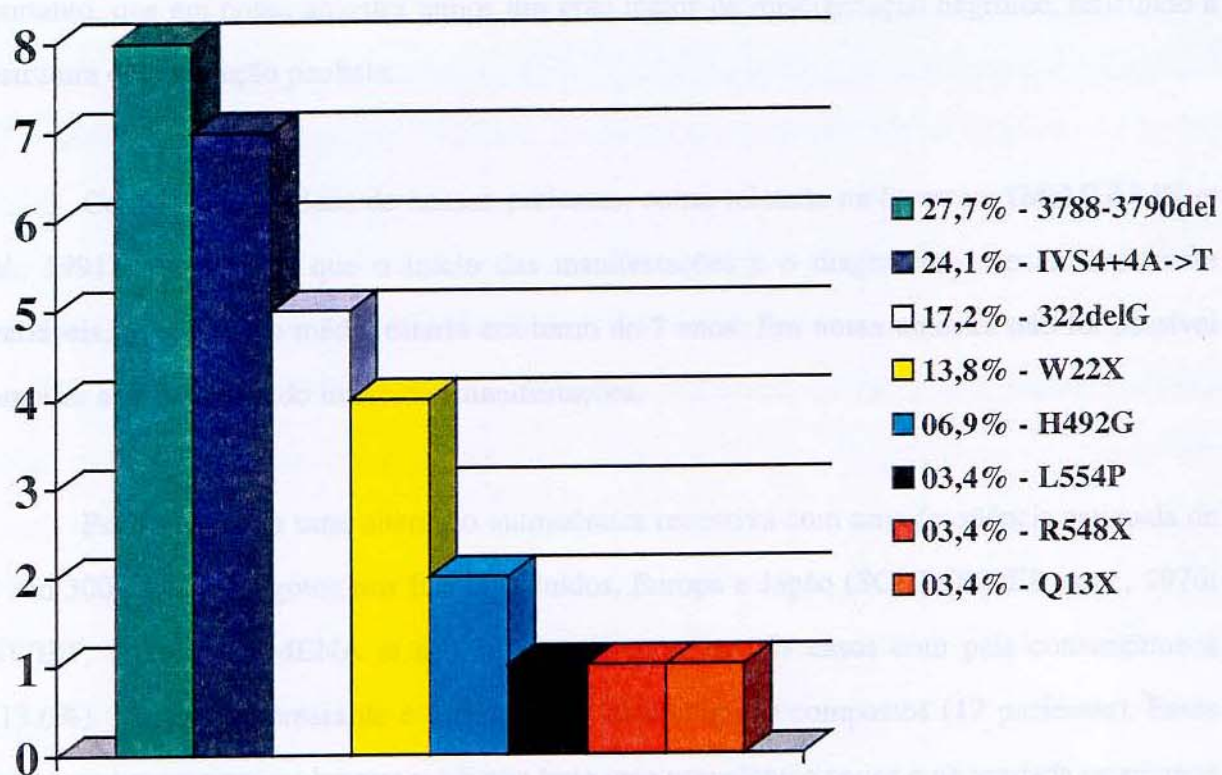


Figura XV - Distribuição das mutações identificadas na investigação molecular dos genes *FANCC* e *FANCA* em 22 pacientes com o diagnóstico de Anemia de Fanconi confirmado.

V - DISCUSSÃO

No presente trabalho, algumas diferenças em relação a estudos anteriores chamaram a nossa atenção. Em primeiro lugar nossa casuística foi composta por 14 indivíduos caucasóides (63,6%) e 8 negróides (36,4%). Vários autores se referem a AF com rara incidência em negróides (MACDOUGALL *et al.*, 1990 e ROSENDORFF *et al.*, 1987). No estudo realizado em 30 pacientes brasileiros (MAGDALENA, 1999), apenas (3,3%) eram negróides. Notamos, portanto, que em nossa amostra temos um grau maior de miscigenação negróide, refletindo a estrutura da população paulista.

Com relação à idade de nossos pacientes, como relatado na literatura (McMULLIN *et al.*, 1991), verificamos que o início das manifestações e o diagnóstico são extremamente variáveis, mas que em média estaria em torno de 7 anos. Em nossa amostra não foi possível precisar a época exata do início das manifestações.

Por se tratar de uma alteração autossômica recessiva com uma frequência estimada de 1 em 300 de heterozigotos nos Estados Unidos, Europa e Japão (SCHROEDER *et al.*, 1976; SWIFT, 1976 e ALIMENA *et al.*, 1983), encontramos três casos com pais consangüíneos (13,6%). Um fato interessante é o número de heterozigotos compostos (17 pacientes). Esses fatos nos levam a especular que a AF não teria uma prevalência maior e na verdade estaríamos tendo dificuldade em diagnosticá-la.

Com relação aos grupos de complementação, nossa amostra foi muito interessante. JOENJE *et al.*, em 1997 relataram que em muitas populações a distribuição dos grupos de complementação entre os pacientes com AF seriam: Grupo de complementação A (~65%), C (~5-15%) e G (10-15%). MAGDALENA (1999), em seus 30 pacientes encontrou 64% de indivíduos com mutação no gene *FANCA*, o que estaria de acordo com o que é referido na

literatura. Entretanto em nosso estudo, 63,6% dos pacientes pertencem ao grupo C e 27,3% ao grupo A. No estudo de MAGDALENA (1999) nenhuma das mutações freqüentes do grupo C foram encontradas. Essa variação é estatisticamente significativa ($\chi^2_{(1)}=8,98$; $P<0,01$). Uma possível explicação para o fato é a de que em nossa amostra, que é do estado de São Paulo, temos uma maior influência de Judeus Ashkenazim, nos quais aparece uma maior incidência de AF do grupo C, diferente do que MAGDALENA (1999) observou em seu trabalho de Curitiba.

Em nossa amostra, tivemos pacientes com diferentes manifestações clínicas e em graus variáveis ao passo que MADALENA, 1999 coletou sua amostra de pacientes em pré-transplante de MO, daí talvez a nossa maior heterogeneidade com relação aos grupos de complementação. De qualquer forma, podemos afirmar que temos no Brasil um número considerável de pacientes com AF do grupo C, o que não havia sido diagnosticado até o momento.

Com relação às mutações identificadas no gene *FANCC*, as mais freqüentes foram a mutação IVS4+4A→T que corresponde a 24,1% e a mutação $\Delta G322$ que se refere a 17,2%, as quais na literatura apresentam uma freqüência de 90% para o gene *FANCC* (Yamashita *et al.*, 1996). O que nos chamou a atenção foi a prevalência elevada em nossa amostra da mutação W22X (13,6%).

Com relação aos pacientes do grupo A, a grande maioria dos alelos são os mutantes $\Delta 3788-3790$ (66,7%). Até o momento foram descritas 121 mutações no gene *FANCA* (Fanconi Anemia Database, 2002), sendo que a maioria delas ocorrem em somente um ou poucos pacientes do grupo de complementação A, com exceção da $\Delta 3788-3790$.

LEVRAN *et al.* (1997) pesquisaram a mutação $\Delta 3788-3790$ em 350 pacientes que não pertenciam ao grupo C, registrados no IFAR “International Fanconi Anemia Registry”. Os pesquisadores encontraram-na em 10% destes pacientes, sendo que essa mutação era significativa entre os pacientes brasileiros, que faziam parte da amostra estudada; fato este que tem levado estes autores a chamá-la de a mutação comum brasileira “The common Brazilian mutation”. Os pacientes brasileiros incluídos no presente estudo de LEVRAN *et al.* (1997), foram os mesmos sujeitos utilizados por MAGDALENA, 1999, que encontrou em sua amostra uma prevalência dessa mutação de 26,6%, menor do que a encontrada no presente estudo. No estudo de Curitiba, 8 pacientes possuíam um alelo dessa mutação (26,6%) e 4 eram homozigotos (13,3%). Em nossa amostra, 2 eram homozigotos (9,1%) e 4 pacientes possuíam um alelo dessa mutação (18,2%). No entanto, para efeito de comparação, se excluirmos os pacientes *FANCC*, uma vez que na amostra de Curitiba não foi detectado nenhum paciente *FANCC*, teríamos homozigotos (25%) e heterozigotos (50%). De qualquer forma trata-se de uma amostra pequena para alcançarmos alguma conclusão em termos de prevalência.

Não podemos comparar a idade de nossos pacientes com os de Curitiba, uma vez que tanto na publicação de LEVRAN *et al.* (1997), quanto na tese de MAGDALENA, 1999, as idades dos pacientes não foram citadas. Esse dado seria útil para inferirmos numa possível diferença nas duas amostras em termos de gravidade clínica.

Um ponto muito importante que merece uma atenção maior é o diagnóstico da AF, que se baseia no tripé: clínica, DEB teste e análise molecular. Como podemos verificar na Tabela VI, ao analisarmos as três variáveis podemos tecer algumas considerações. Em primeiro lugar, observamos que em 2 casos o DEB teste foi negativo e a análise molecular detectou alterações gênicas, dando um índice de 9,1% de falha. Com relação aos casos 19 e 21, o DEB teste foi

positivo, mas a análise molecular realizada não foi capaz de detectar alterações. Com isso temos três pontos importantes para discussão no diagnóstico da AF. O primeiro seria a heterogeneidade clínica, que vai de quadros leves à graves, com idade de manifestações variáveis. A análise familiar do caso 3 demonstra essa característica. A propósita foi encaminhada para exame citogenético e molecular, pois tinha o quadro clínico típico da AF. Frente à confirmação molecular, foi colhido material dos familiares a fim de efetuar a procura de um possível doador de medula. Ao efetuarmos a análise molecular da família, detectamos que um dos irmãos possuía o mesmo genótipo da propósita e, no entanto, era praticamente assintomático. Esse fato demonstra a heterogeneidade clínica dessa doença na mesma família.

Alem disso, um recente estudo de correlação genótipo/fenótipo entre pacientes com AF de vários grupos de complementação (A, C e G), mostrou que não há influência do grupo de complementação no fenótipo clínico. Com relação à leucemia mieloide aguda, foi encontrada uma ocorrência prematura no grupo de complementação G, quando comparado aos grupos A e C. Entretanto, este efeito pode ser devido ao pequeno número de mutações descritas no *FANCG* quando comparadas ao *FANCA*, pois já foi comprovado que a variabilidade de clínica é dada pelo tipo de mutação, ou seja, aquelas mutações que levaram a uma produção nula da proteína teriam um quadro hematológico mais severo e o desenvolvimento da leucemia mais cedo (FAIVRE, *et al.*, 2002).

Em nossa amostra, ao separarmos nossos pacientes em pertencentes ao grupo A e ao grupo C, não verificamos diferença em função da idade. (\bar{x} FANCA=15 anos e \bar{x} FANCC=14,7).

O segundo ponto a ser discutido no diagnóstico da AF é o DEB teste. Infelizmente esse teste não tem 100% de sensibilidade e o fato do teste ter resultado negativo não exclui a possibilidade do paciente ser portador da AF.

O terceiro ponto é a heterogeneidade molecular, uma vez que 8 genes estão envolvidos nessa doença, sendo que alguns deles apresentam um grande número de exons, com elevado número de mutações ocorrendo em baixa frequência. Esses fatos dificultam a procura de mutações.

Com a análise desses três fatores, nós não podemos garantir um diagnóstico preciso dessa alteração. Seria essencial incluirmos um quarto fator que em muito auxiliaria a resolver esse problema, os grupos de complementação. Esse teste é mais sensível que o DEB teste e pode indicar qual o gene que deve ser pesquisado molecularmente. Com a inclusão desse exame, certamente poderíamos fazer um diagnóstico adequado nos outros 30 pacientes avaliados em nosso estudo, que possuíam clínica compatível com AF, mas que apresentaram DEB teste negativo, assim, com teste molecular negativo para as mutações do grupo C e a principal mutação do grupo A.

Tabela VI - Sumário dos resultados citogenéticos e moleculares obtidos nos 22 pacientes com manifestações clínicas de Anemia de Fanconi.

Caso	Iniciais	Quadro Clínico	DEB Teste	Análise Molecular
1	SRF	+	+	+
2	VAF	+	-	+
3	DTG	+	-	+
4	BHRJ	+	+	+
5	IS	+	+	+
6	AMA	+	+	+
7	NSMA	+	+	+
8	JCT	+	+	+
9	CT	+	+	+
10	FS	+	+	+
11	DASB	+	+	+
12	GCR	+	+	+
13	FFP	+	+	+
14	MMC	+	+	+
15	RAS	+	+	+
16	IFB	+	+	+
17	CFB	+	+	+
18	VWOG	+	+	+
19	VBS	+	+	-
20	JCV	+	+	+
21	LVB	+	+	-
22	FTM	+	+	+

VI – CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados, podemos concluir que:

- 1- Em nossa amostra, o grupo de complementação C da AF é mais freqüente que o grupo de complementação A.
- 2- Em nossa amostra, temos pacientes portadores de AF grupo C, com uma prevalência elevada das mutações freqüentes entre judeus Ashkenazim, que seriam a mutação IVS4+4A→T e a mutação ΔG322.
- 3- O DEB teste apresentou 90,9% de sensibilidade para comprovar a AF e que, portanto, não deverá ser utilizado como único método para concluir o diagnóstico.
- 4- Não só a análise molecular da AF é complexa e trabalhosa, como também a variabilidade na apresentação clínica da doença.
- 5- É essencial a introdução em nosso País do teste de complementaridade, para junto aos outros dois testes já existentes, auxiliarem na diminuição de casos em que não é possível afirmar ou descartar o diagnóstico de AF.

ANEXOS

ANEXO I - PROTOCOLO ANEMIA DE FANCONI**1 - IDENTIFICAÇÃO:**

Nome: _____ Idade: _____ Nasc.: ___/___/___
 Cor: _____ Sexo: _____ Natural de: _____ Estado: _____
 Endereço: _____ Fone: _____
 Pai: _____ Cor: _____ Idade: _____ anos
 Natural de: _____ Estado: _____ Profissão: _____
 Escolaridade: _____ .
 Mãe: _____ Cor: _____ Idade: _____ anos
 Natural de: _____ Estado: _____ Profissão: _____
 Escolaridade: _____ .
 Relacionado: _____ Tipo: _____
 Endereço: _____

2 - CONSENTIMENTO INFORMADO

Através deste documento, permito que o sangue de meu filho _____
 _____, seja retirado para que sejam realizadas pesquisas de DNA
 para Anemia de Fanconi e/ou pesquisas populacionais de frequências gênicas. Tenho
 conhecimento de que se for detectada alguma alteração de seu DNA, tal fato me será
 transmitido, como também sei que, se não detectarem mutações em seu DNA com esse
 material, isto pode apenas indicar que tal alteração não pode ser detectada com os métodos
 empregados. Permito ainda que esse sangue ou o seu DNA seja armazenado e utilizado para
 futuras pesquisas e/ou publicações científicas.

 Ass. : Sr. _____ RG: _____

Resp. pelo menor: _____

3- DADOS CLÍNICOS**3.1 CRESCIMENTO:**

- peso ao nascimento: _____

- estatura ao nascimento: _____

3.2 ESQUELETO:

- aplasia do radio sim não _____

- deformidade do polegar sim não _____

- aplasia do polegar sim não _____

- hipoplasia do polegar sim não _____

- polegar duplicado sim não _____

3.3 HEMATOLOGIA:

- anemia sim não _____

- neutropenia _____

- trombocitopenia _____

- reticulocitopenia _____

- pancitopenia _____

- sangramento _____

- leucenia _____

3.4 PELE:

- palidez anêmica _____

- formação de hematomas _____

- trocas pigmentares _____

- hiperpigmentação _____

- manchas café com leite quantas _____

3.5 CABEÇA – OLHOS – ORELHAS – PESCOÇO - TRONCO:

- microcefalia _____

- estrabismo _____

- microftalmia _____

- anomalias de orelha qual _____
- surdez _____
- coração descrever _____
- defeito cardíaco congênito _____

3.6 GENITOURINÁRIO:

- malformação renal _____
- ausência renal _____
- rim duplicado _____
- sistema coletor duplicado _____
- rim em fechadura _____
- ectopia renal _____
- hipogonadismo hipergonadotrópico _____
- criptorquidismo _____

3.7 NEUROLÓGICO:

- retardamento mental _____

3.8 LABORATÓRIO:

- múltiplas quebras cromossômicas _____
- quebras cromoss. induzidas por DEB e/ou Mtomicina C _____
- deficiência de excisão de dímeros de DNA induzidos por ultra-violeta _____
- fase de G2 prolongada no ciclo celular _____

3.9 HERANÇA (sempre fazer árvore genealógica)

- consangüinidade tipo _____
 - recorrência na irmandade
 - recorrência em outros membros da família

**ANEXO II - SEQUÊNCIA DO cDNA DO GENE *FANCA* E SEQUÊNCIA DA
PROTEÍNA QUE O GENE CODIFICA.
("Fanconi Anemia Mutation Database", 2002)**

ATG	TCC	GAC	TCG	TGG	GTC	CCG	AAC	TCC	GCC	30	
M	S	D	S	W	V	P	N	S	A		10
TCG	GGC	CAG	GAC	CCA	GGG	GGC	CGC	CGG	AGG	60	
S	G	Q	D	P	G	G	R	R	R		20
GCC	TGG	GCC	GAG	CTG	CTG	GCG	GGA	AGG	GTC	90	
A	W	A	E	L	L	A	G	R	V		30
AAG	AGG	GAA	AAA	TAT	AAT	CCT	GAA	AGG	GCA	120	
K	R	E	K	Y	N	P	E	R	A		40
CAG	AAA	TTA	AAG	GAA	TCA	GCT	GTG	CGC	CTC	150	
Q	K	L	K	E	S	A	V	R	L		50
CTG	CGA	AGC	CAT	CAG	GAC	CTG	AAT	GCC	CTT	180	
L	R	S	H	Q	D	L	N	A	L		60
TTG	CTT	GAG	GTA	GAA	GGT	CCA	CTG	TGT	AAA	210	
L	L	E	V	E	G	P	L	C	K		70
AAA	TTG	TCT	CTC	AGC	AAA	GTG	ATT	GAC	TGT	240	
K	L	S	L	S	K	V	I	D	C		80
GAC	AGT	TCT	GAG	GCC	TAT	GCT	AAT	CAT	TCT	270	
D	S	S	E	A	Y	A	N	H	S		90
AGT	TCA	TTT	ATA	GGC	TCT	GCT	TTG	CAG	GAT	300	
S	S	F	I	G	S	A	L	Q	D		100
CAA	GCC	TCA	AGG	CTG	GGG	GTT	CCC	GTG	GGT	330	
Q	A	S	R	L	G	V	P	V	G		110
ATT	CTC	TCA	GCC	GGG	ATG	GTT	GCC	TCT	AGC	360	
I	L	S	A	G	M	V	A	S	S		120
GTG	GGA	CAG	ATC	TGC	ACG	GCT	CCA	GCG	GAG	390	
V	G	Q	I	C	T	A	P	A	E		130
ACC	AGT	CAC	CCT	GTG	CTG	CTG	ACT	GTG	GAG	420	
T	S	H	P	V	L	L	T	V	E		140
CAG	AGA	AAG	AAG	CTG	TCT	TCC	CTG	TTA	GAG	450	
Q	R	K	K	L	S	S	L	L	E		150

TTT	GCT	CAG	TAT	TTA	TTG	GCA	CAC	AGT	ATG	480	
F	A	Q	Y	L	L	A	H	S	M		160
TTC	TCC	CGT	CTT	TCC	TTC	TGT	CAA	GAA	TTA	510	
F	S	R	L	S	F	C	Q	E	L		170
TGG	AAA	ATA	CAG	AGT	TCT	TTG	TTG	CTT	GAA	540	
W	K	I	Q	S	S	L	L	L	E		180
GCG	GTG	TGG	CAT	CTT	CAC	GTA	CAA	GGC	ATT	570	
A	V	W	H	L	H	V	Q	G	I		190
GTG	AGC	CTG	CAA	GAG	CTG	CTG	GAA	AGC	CAT	600	
V	S	L	Q	E	L	L	E	S	H		200
CCC	GAC	ATG	CAT	GCT	GTG	GGA	TCG	TGG	CTC	630	
P	D	M	H	A	V	G	S	W	L		210
TTC	AGG	AAT	CTG	TGC	TGC	CTT	TGT	GAA	CAG	660	
F	R	N	L	C	C	L	C	E	Q		220
ATG	GAA	GCA	TCC	TGC	CAG	CAT	GCT	GAC	GTC	690	
M	E	A	S	C	Q	H	A	D	V		230
GCC	AGG	GCC	ATG	CTT	TCT	GAT	TTT	GTT	CAA	720	
A	R	A	M	L	S	D	F	V	Q		240
ATG	TTT	GTT	TTG	AGG	GGA	TTT	CAG	AAA	AAC	750	
M	F	V	L	R	G	F	Q	K	N		250
TCA	GAT	CTG	AGA	AGA	ACT	GTG	GAG	CCT	GAA	780	
S	D	L	R	R	T	V	E	P	E		260
AAA	ATG	CCG	CAG	GTC	ACG	GTT	GAT	GTA	CTG	810	
K	M	P	Q	V	T	V	D	V	L		270
CAG	AGA	ATG	CTG	ATT	TTT	GCA	CTT	GAC	GCT	840	
Q	R	M	L	I	F	A	L	D	A		280
TTG	GCT	GCT	GGA	GTA	CAG	GAG	GAG	TCC	TCC	870	
L	A	A	G	V	Q	E	E	S	S		290
ACT	CAC	AAG	ATC	GTG	AGG	TGC	TGG	TTC	GGA	900	
T	H	K	I	V	R	C	W	F	G		300
GTG	TTC	AGT	GGA	CAC	ACG	CTT	GGC	AGT	GTA	930	
V	F	S	G	H	T	L	G	S	V		310
ATT	TCC	ACA	GAT	CCT	CTG	AAG	AGG	TTC	TTC	960	
I	S	T	D	P	L	K	R	F	F		320

AGT	CAT	ACC	CTG	ACT	CAG	ATA	CTC	ACT	CAC	990	
S	H	T	L	T	Q	I	L	T	H		330
AGC	CCT	GTG	CTG	AAA	GCA	TCT	GAT	GCT	GTT	1020	
S	P	V	L	K	A	S	D	A	V		340
CAG	ATG	CAG	AGA	GAG	TGG	AGC	TTT	GCG	CGG	1050	
Q	M	Q	R	E	W	S	F	A	R		350
ACA	CAC	CCT	CTG	CTC	ACC	TCA	CTG	TAC	CGC	1080	
T	H	P	L	L	T	S	L	Y	R		360
AGG	CTC	TTT	GTG	ATG	CTG	AGT	GCA	GAG	GAG	1110	
R	L	F	V	M	L	S	A	E	E		370
TTG	GTT	GGC	CAT	TTG	CAA	GAA	GTT	CTG	GAA	1140	
L	V	G	H	L	Q	E	V	L	E		380
ACG	CAG	GAG	GTT	CAC	TGG	CAG	AGA	GTG	CTC	1170	
T	Q	E	V	H	W	Q	R	V	L		390
TCC	TTT	GTG	TCT	GCC	CTG	GTT	GTC	TGC	TTT	1200	
S	F	V	S	A	L	V	V	C	F		400
CCA	GAA	GCG	CAG	CAG	CTG	CTT	GAA	GAC	TGG	1230	
P	E	A	Q	Q	L	L	E	D	W		410
GTG	GCG	CGT	TTG	ATG	GCC	CAG	GCA	TTC	GAG	1260	
V	A	R	L	M	A	Q	A	F	E		420
AGC	TGC	CAG	CTG	GAC	AGC	ATG	GTC	ACT	GCG	1290	
S	C	Q	L	D	S	M	V	T	A		430
TTC	CTG	GTT	GTG	CGC	CAG	GCA	GCA	CTG	GAG	1320	
F	L	V	V	R	Q	A	A	L	E		440
GGC	CCC	TCT	GCG	TTC	CTG	TCA	TAT	GCA	GAC	1350	
G	P	S	A	F	L	S	Y	A	D		450
TGG	TTC	AAG	GCC	TCC	TTT	GGG	AGC	ACA	CGA	1380	
W	F	K	A	S	F	G	S	T	R		460
GGC	TAC	CAT	GGC	TGC	AGC	AAG	AAG	GCC	CTG	1410	
G	Y	H	G	C	S	K	K	A	L		470
GTC	TTC	CTG	TTT	ACG	TTC	TTG	TCA	GAA	CTC	1440	
V	F	L	F	T	F	L	S	E	L		480
GTG	CCT	TTT	GAG	TCT	CCC	CGG	TAC	CTG	CAG	1470	
V	P	F	E	S	P	R	Y	L	Q		490

GTG	CAC	ATT	CTC	CAC	CCA	CCC	CTG	GTT	CCC	1500	
V	H	I	L	H	P	P	L	V	P		500
GGC	AAG	TAC	CGC	TCC	CTC	CTC	ACA	GAC	TAC	1530	
G	K	Y	R	S	L	L	T	D	Y		510
ATC	TCA	TTG	GCC	AAG	ACA	CGG	CTG	GCC	GAC	1560	
I	S	L	A	K	T	R	L	A	D		520
CTC	AAG	GTT	TCT	ATA	GAA	AAC	ATG	GGA	CTC	1590	
L	K	V	S	I	E	N	M	G	L		530
TAC	GAG	GAT	TTG	TCA	TCA	GCT	GGG	GAC	ATT	1620	
Y	E	D	L	S	S	A	G	D	I		540
ACT	GAG	CCC	CAC	AGC	CAA	GCT	CTT	CAG	GAT	1650	
T	E	P	H	S	Q	A	L	Q	D		550
GTT	GAA	AAG	GCC	ATC	ATG	GTG	TTT	GAG	CAT	1680	
V	E	K	A	I	M	V	F	E	H		560
ACG	GGG	AAC	ATC	CCA	GTC	ACC	GTC	ATG	GAG	1710	
T	G	N	I	P	V	T	V	M	E		570
GCC	AGC	ATA	TTC	AGG	AGG	CCT	TAC	TAC	GTG	1740	
A	S	I	F	R	R	P	Y	Y	V		580
TCC	CAC	TTC	CTC	CCC	GCC	CTG	CTC	ACA	CCT	1770	
S	H	F	L	P	A	L	L	T	P		590
CGA	GTG	CTC	CCC	AAA	GTC	CCT	GAC	TCC	CGT	1800	
R	V	L	P	K	V	P	D	S	R		600
GTG	GCG	TTT	ATA	GAG	TCT	CTG	AAG	AGA	GCA	1830	
V	A	F	I	E	S	L	K	R	A		610
GAT	AAA	ATC	CCC	CCA	TCT	CTG	TAC	TCC	ACC	1860	
D	K	I	P	P	S	L	Y	S	T		620
TAC	TGC	CAG	GCC	TGC	TCT	GCT	GCT	GAA	GAG	1890	
Y	C	Q	A	C	S	A	A	E	E		630
AAG	CCA	GAA	GAT	GCA	GCC	CTG	GGA	GTG	AGG	1920	
K	P	E	D	A	A	L	G	V	R		640
GCA	GAA	CCC	AAC	TCT	GCT	GAG	GAG	CCC	CTG	1950	
A	E	P	N	S	A	E	E	P	L		650
GGA	CAG	CTC	ACA	GCT	GCA	CTG	GGA	GAG	CTG	1980	
G	Q	L	T	A	A	L	G	E	L		660

AGA	GCC	TCC	ATG	ACA	GAC	CCC	AGC	CAG	CGT	2010	
R	A	S	M	T	D	P	S	Q	R		670
GAT	GTT	ATA	TCG	GCA	CAG	GTG	GCA	GTG	ATT	2040	
D	V	I	S	A	Q	V	A	V	I		680
TCT	GAA	AGA	CTG	AGG	GCT	GTC	CTG	GGC	CAC	2070	
S	E	R	L	R	A	V	L	G	H		690
AAT	GAG	GAT	GAC	AGC	AGC	GTT	GAG	ATA	TCA	2100	
N	E	D	D	S	S	V	E	I	S		700
AAG	ATT	CAG	CTC	AGC	ATC	AAC	ACG	CCG	AGA	2130	
K	I	Q	L	S	I	N	T	P	R		710
CTG	GAG	CCA	CGG	GAA	CAC	ATG	GCT	GTG	GAC	2160	
L	E	P	R	E	H	M	A	V	D		720
CTC	CTG	CTG	ACG	TCT	TTC	TGT	CAG	AAC	CTG	2190	
L	L	L	T	S	F	C	Q	N	L		730
ATG	GCT	GCC	TCC	AGT	GTC	GCT	CCC	CCG	GAG	2220	
M	A	A	S	S	V	A	P	P	E		740
AGG	CCG	GGT	CCC	TGG	GCT	GCC	CTC	TTC	GTG	2250	
R	P	G	P	W	A	A	L	F	V		750
AGG	ACC	ATG	TGT	GGA	CGT	GTG	CTC	CCT	GCA	2280	
R	T	M	C	G	R	V	L	P	A		760
GTG	CTC	ACC	CGG	CTC	TGC	CAG	CTG	CTC	CGT	2310	
V	L	T	R	L	C	Q	L	L	R		770
CAC	CAG	GGC	CCG	AGC	CTG	AGT	GCC	CCA	CAT	2340	
H	Q	G	P	S	L	S	A	P	H		780
GTG	CTG	GGG	TTG	GCT	GCC	CTG	GCC	GTG	CAC	2370	
V	L	G	L	A	A	L	A	V	H		790
CTG	GGT	GAG	TCC	AGG	TCT	GCG	CTC	CCA	GAG	2400	
L	G	E	S	R	S	A	L	P	E		800
GTG	GAT	GTG	GGT	CCT	CCT	GCA	CCT	GGT	GCT	2430	
V	D	V	G	P	P	A	P	G	A		810
GGC	CTT	CCT	GTC	CCT	GCG	CTC	TTT	GAC	AGC	2460	
G	L	P	V	P	A	L	F	D	S		820
CTC	CTG	ACC	TGT	AGG	ACG	AGG	GAT	TCC	TTG	2490	
L	L	T	C	R	T	R	D	S	L		830

TTC	TTC	TGC	CTG	AAA	TTT	TGT	ACA	GCA	GCA	2520	
F	F	C	L	K	F	C	T	A	A		840
ATT	TCT	TAC	TCT	CTC	TGC	AAG	TTT	TCT	TCC	2550	
I	S	Y	S	L	C	K	F	S	S		850
CAG	TCA	CGA	GAT	ACT	TTG	TGC	AGC	TGC	TTA	2580	
Q	S	R	D	T	L	C	S	C	L		860
TCT	CCA	GGC	CTT	ATT	AAA	AAG	TTT	CAG	TTC	2610	
S	P	G	L	I	K	K	F	Q	F		870
CTC	ATG	TTC	AGA	TTG	TTC	TCA	GAG	GCC	CGA	2640	
L	M	F	R	L	F	S	E	A	R		880
CAG	GCT	CTT	TCT	GAG	GAG	GAC	GTA	GCC	AGC	2670	
Q	A	L	S	E	E	D	V	A	S		890
CTT	TCC	TGG	AGA	CCC	TTG	CAC	CTT	CCT	TCT	2700	
L	S	W	R	P	L	H	L	P	S		900
GCA	GAC	TGG	CAG	AGA	GCT	GCC	CTC	TCT	CTC	2730	
A	D	W	Q	R	A	A	L	S	L		910
TGG	ACA	CAC	AGA	ACC	TTC	CGA	GAG	GTG	TTG	2760	
W	T	H	R	T	F	R	E	V	L		920
AAA	GAG	GAA	GAT	GTT	CAC	TTA	ACT	TAC	CAA	2790	
K	E	E	D	V	H	L	T	Y	Q		930
GAC	TGG	TTA	CAC	CTG	GAG	CTG	GAA	ATT	CAA	2820	
D	W	L	H	L	E	L	E	I	Q		940
CCT	GAA	GCT	GAT	GCT	CTT	TCA	GAT	ACT	GAA	2850	
P	E	A	D	A	L	S	D	T	E		950
CGG	CAG	GAC	TTC	CAC	CAG	TGG	GCG	ATC	CAT	2880	
R	Q	D	F	H	Q	W	A	I	H		960
GAG	CAC	TTT	CTC	CCT	GAG	TCC	TCG	GCT	TCA	2910	
E	H	F	L	P	E	S	S	A	S		970
GGG	GGC	TGT	GAC	GGA	GAC	CTG	CAG	GCT	GCG	2940	
G	G	C	D	G	D	L	Q	A	A		980
TGT	ACC	ATT	CTT	GTC	AAC	GCA	CTG	ATG	GAT	2970	
C	T	I	L	V	N	A	L	M	D		990
TTC	CAC	CAA	AGC	TCA	AGG	AGT	TAT	GAC	CAC	3000	
F	H	Q	S	S	R	S	Y	D	H		1000

TCA	GAA	AAT	TCT	GAT	TTG	GTC	TTT	GGT	GGC	3030	
S	E	N	S	D	L	V	F	G	G		1010
CGC	ACA	GGA	AAT	GAG	GAT	ATT	ATT	TCC	AGA	3060	
R	T	G	N	E	D	I	I	S	R		1020
TTG	CAG	GAG	ATG	GTA	GCT	GAC	CTG	GAG	CTG	3090	
L	Q	E	M	V	A	D	L	E	L		1030
CAG	CAA	GAC	CTC	ATA	GTG	CCT	CTC	GGC	CAC	3120	
Q	Q	D	L	I	V	P	L	G	H		1040
ACC	CCT	TCC	CAG	GAG	CAC	TTC	CTC	TTT	GAG	3150	
T	P	S	Q	E	H	F	L	F	E		1050
ATT	TTC	CGC	AGA	CGG	CTC	CAG	GCT	CTG	ACA	3180	
I	F	R	R	R	L	Q	A	L	T		1060
AGC	GGG	TGG	AGC	GTG	GCT	GCC	AGC	CTT	CAG	3210	
S	G	W	S	V	A	A	S	L	Q		1070
AGA	CAG	AGG	GAG	CTG	CTA	ATG	TAC	AAA	CGG	3240	
R	Q	R	E	L	L	M	Y	K	R		1080
ATC	CTC	CTC	CGC	CTG	CCT	TCG	TCT	GTC	CTC	3270	
I	L	L	R	L	P	S	S	V	L		1090
TGC	GGC	AGC	AGC	TTC	CAG	GCA	GAA	CAG	CCC	3300	
C	G	S	S	F	Q	A	E	Q	P		1100
ATC	ACT	GCC	AGA	TGC	GAG	CAG	TTC	TTC	CAC	3330	
I	T	A	R	C	E	Q	F	F	H		1110
TTG	GTC	AAC	TCT	GAG	ATG	AGA	AAC	TTC	TGC	3360	
L	V	N	S	E	M	R	N	F	C		1120
TCC	CAC	GGA	GGT	GCC	CTG	ACA	CAG	GAC	ATC	3390	
S	H	G	G	A	L	T	Q	D	I		1130
ACT	GCC	CAC	TTC	TTC	AGG	GGC	CTC	CTG	AAC	3420	
T	A	H	F	F	R	G	L	L	N		1140
GCC	TGT	CTG	CGG	AGC	AGA	GAC	CCC	TCC	CTG	3450	
A	C	L	R	S	R	D	P	S	L		1150
ATG	GTC	GAC	TTC	ATA	CTG	GCC	AAG	TGC	CAG	3480	
M	V	D	F	I	L	A	K	C	Q		1160
ACG	AAA	TGC	CCC	TTA	ATT	TTG	ACC	TCT	GCT	3510	
T	K	C	P	L	I	L	T	S	A		1170

CTG	GTG	TGG	TGG	CCG	AGC	CTG	GAG	CCT	GTG	3540	
L	V	W	W	P	S	L	E	P	V		1180
CTG	CTC	TGC	CGG	TGG	AGG	AGA	CAC	TGC	CAG	3570	
L	L	C	R	W	R	R	H	C	Q		1190
AGC	CCG	CTG	CCC	CGG	GAA	CTG	CAG	AAG	CTA	3600	
S	P	L	P	R	E	L	Q	K	L		1200
CAA	GAA	GGC	CGG	CAG	TTT	GCC	AGC	GAT	TTC	3630	
Q	E	G	R	Q	F	A	S	D	F		1210
CTC	TCC	CCT	GAG	GCT	GCC	TCC	CCA	GCA	CCC	3660	
L	S	P	E	A	A	S	P	A	P		1220
AAC	CCG	GAC	TGG	CTC	TCA	GCT	GCT	GCA	CTG	3690	
N	P	D	W	L	S	A	A	A	L		1230
CAC	TTT	GCG	ATT	CAA	CAA	GTC	AGG	GAA	GAA	3720	
H	F	A	I	Q	Q	V	R	E	E		1240
AAC	ATC	AGG	AAG	CAG	CTA	AAG	AAG	CTG	GAC	3750	
N	I	R	K	Q	L	K	K	L	D		1250
TGC	GAG	AGA	GAG	GAG	CTA	TTG	GTT	TTC	CTT	3780	
C	E	R	E	E	L	L	V	F	L		1260
TTC	TTC	TTC	TCC	TTG	ATG	GGC	CTG	CTG	TCG	3810	
F	F	F	S	L	M	G	L	L	S		1270
TCA	CAT	CTG	ACC	TCA	AAT	AGC	ACC	ACA	GAC	3840	
S	H	L	T	S	N	S	T	T	D		1280
CTG	CCA	AAG	GCT	TTC	CAC	GTT	TGT	GCA	GCA	3870	
L	P	K	A	F	H	V	C	A	A		1290
ATC	CTC	GAG	TGT	TTA	GAG	AAG	AGG	AAG	ATA	3900	
I	L	E	C	L	E	K	R	K	I		1300
TCC	TGG	CTG	GCA	CTC	TTT	CAG	TTG	ACA	GAG	3930	
S	W	L	A	L	F	Q	L	T	E		1310
AGT	GAC	CTC	AGG	CTG	GGG	CGG	CTC	CTC	CTC	3960	
S	D	L	R	L	G	R	L	L	L		1320
CGT	GTG	GCC	CCG	GAT	CAG	CAC	ACC	AGG	CTG	3990	
R	V	A	P	D	Q	H	T	R	L		1330
CTG	CCT	TTC	GCT	TTT	TAC	AGT	CTT	CTC	TCC	4020	
L	P	F	A	F	Y	S	L	L	S		1340

TAC	TTC	CAT	GAA	GAC	GCG	GCC	ATC	AGG	GAA	4050	
Y	F	H	E	D	A	A	I	R	E		1350
GAG	GCC	TTC	CTG	CAT	GTT	GCT	GTG	GAC	ATG	4080	
E	A	F	L	H	V	A	V	D	M		1360
TAC	TTG	AAG	CTG	GTC	CAG	CTC	TTC	GTG	GCT	4110	
Y	L	K	L	V	Q	L	F	V	A		1370
GGG	GAT	ACA	AGC	ACA	GTT	TCA	CCT	CCA	GCT	4140	
G	D	T	S	T	V	S	P	P	A		1380
GGC	AGG	AGC	CTG	GAG	CTC	AAG	GGT	CAG	GGC	4170	
G	R	S	L	E	L	K	G	Q	G		1390
AAC	CCC	GTG	GAA	CTG	ATA	ACA	AAA	GCT	CGT	4200	
N	P	V	E	L	I	T	K	A	R		1400
CTT	TTT	CTG	CTG	CAG	TTA	ATA	CCT	CGG	TGC	4230	
L	F	L	L	Q	L	I	P	R	C		1410
CCG	AAA	AAG	AGC	TTC	TCA	CAC	GTG	GCA	GAG	4260	
P	K	K	S	F	S	H	V	A	E		1420
CTG	CTG	GCT	GAT	CGT	GGG	GAC	TGC	GAC	CCA	4290	
L	L	A	D	R	G	D	C	D	P		1430
GAG	GTG	AGC	GCC	GCC	CTC	CAG	AGC	AGA	CAG	4320	
E	V	S	A	A	L	Q	S	R	Q		1440
CAG	GCT	GCC	CCT	GAC	GCT	GAC	CTG	TCC	CAG	4350	
Q	A	A	P	D	A	D	L	S	Q		1450
GAG	CCT	CAT	CTC	TTC	TGA					4368	
E	P	H	L	F	stop						1456

**ANEXO III - MUTAÇÕES DO GENE *FANCA* DA ANEMIA DE FANCONI
("Fanconi Anemia Mutation Database", 2002)**

Nome da mutação	Localização (exon ou intron)	Troca do aminoácido	Tipo da mutação
1-4368del	exon		deletion
exon 24-28del	exon 24 - 28		unknown
24C>G	exon 1	N8K	AA substitution
65G>A	exon 1	W22X	stop codon
1-596del	exon 1		
1A>G	exon 1		AA substitution
154C>T	exon 2	R52X	stop codon
401insC	exon 4		frameshift
542C>T	exon 6	A181V	AA substitution
IVS6-2A>G	intron 6		Deletion of 13 aa
IVS7+1G>A	intron 7		RNA splicing
597-3066del	exon 7		Deletion
732G>C	exon 8	L244F	AA substitution
755A>G	exon 8	D252G	AA substitution
790C>T	exon 8	Q264X	stop codon
795-808del	exon 9		frameshift
IVS10+1G>T	intron 10		RNA splicing
827-1225del	exon 10		deletion
856C>T	exon 10	Q286X	stop codon
890-893del	exon 10		frameshift
IVS11-1delG	intron 11		RNA splicing
987-990del	exon 11		frameshift
894-1359del	exon 11		frameshift
1164-1165del	exon 13		frameshift
1303C>T	exon 14	R435C	AA substitution

Cont.

Nome da mutação	Localização (exon ou intron)	Troca do aminoácido	Tipo da mutação
IVS14+1G>C	intron 14		RNA splicing
1459insC	exon 15		frameshift
1475A>G	exon 16	H492G	AA substitution
1771C>T	exon 19	R591X	stop codon
2005C>T	exon 22	Q669X	stop codon
1944delG	exon 22		frameshift
2066delG	exon 23		frameshift
2172-2173insG	exon 24		frameshift
2314C>T	exon 25	Q772X	stop codon
2450T>C	exon 26	L817P	AA substitution
IVS26 +134A>G	exon 26		frameshift
2535-2536del	exon 27		frameshift
2534T>C	exon 27	L845P	AA substitution
2524delT	exon 27		frameshift
2546delC	exon 27		frameshift
IVS27 -1G>A	intron 27		deletion
IVS27 -2A>T	intron 27		deletion
IVS28+83C>G	intron 28	928ins28aa+Stop	RNA splicing
IVS29 -19 del19	intron 29		RNA splicing
2840C>G	exon 29	S947X	stop codon
2982-3066del	exon 31		frameshift
3164G>T	exon 32	R1055L	AA substitution
3188G>A	exon 32	W1063X	stop codon
3091C>T	exon 32	Q1031X	stop codon
3163C>T	exon 32	R1055W	AA substitution
3382C>G	exon 34	Q1128E	AA substitution

Cont.

Nome da mutação	Localização (exon ou intron)	Troca do aminoácido	Tipo da mutação
3349A>G	exon 34	R1117G	AA substitution
3391A>G	exon 34	T1131A	AA substitution
3396-3399del	exon 34		frameshift
3520-3522del	exon 36		deletion
3559insG	exon 36		frameshift
3760G>T	exon 37	E1254X	AA substitution
3788-3790del	exon 38		deletion
3904T>C	exon 39	W1032R	AA substitution
3982A>G	exon 40	T1328A	AA substitution
IVS40+1-18del	intron 40		exon skip
4069-4082del	exon 40		frameshift
IVS41 -2A>G	intron 41		deletion
4275delT	exon 43		frameshift
1-2981del	exon 1		
1007-3066del	intron 1131		deletion
1115-1118del	exon 13		frameshift
1191-1194del	exon 13		frameshift
1360-1626del	exon 15		deletion
1360-1826del	exon 15		frameshift
1471-1826del	exon 16		deletion
1471-1626del	exon 16		deletion
1615delG	exon 17		frameshift
163C>T	exon 2	Q55X	stop codon
1627-1900del	exon 18		frameshift
1792G>A	exon 20	D598N	AA substitution
1827-2778del	exon 21		deletion

Cont.

Nome da mutação	Localização (exon ou intron)	Troca do aminoácido	Tipo da mutação
1901-2778del	exon 23		deletion
2107C>T	exon 23	Q703X	stop codon
2167-2169del	exon 24		Deletion
2495-2497del	exon 26		Deletion
2574C>G	exon 27	S858R	AA substitution
2779-3066del	exon 29		deletion
2779-3348del	exon 29		deletion
2830ins19	exon 29		frameshif
*2982-4365del	exon 31		deletion
3061-3154del	exon 31		frameshif
3263C>T	exon 33	S1088F	AA substitution
3329A>C	exon 33	H1110P	AA substitution
3398delA	exon 34		frameshif
3403-3405del	exon 34	1135delF	deletion
3629-3630insT	exon 37		frameshif
3715-3729del	exon 37		frameshif
3760-3761del	exon 37		deletion
3786C>G	exon 38	F1262L	AA substitution
3884T>A	exon 39	L1295X	stop codon
3920delA	exon 39		frameshif
3971C>T	exon 40	P1324L	AA substitution
4010delG+18	exon 40		exon skip
4015delC	exon 41		frameshif
4080G>C	exon 41	M1360I	AA substitution
4267-4404del	exon 42		unknown
*427-522*del	exon 5		deletion

Cont.

Nome da mutação	Localização (exon ou intron)	Troca do aminoácido	Tipo da mutação
4249C>G	exon 42	H1417D	AA substitution
*5'UTR-1900*del			deletion
*5'UTR-3066del			deletion
*5'UTR-522*del			deletion
523-1359del	exon 6		deletion
597-1826del	exon 7		deletion
IVS7+5G>A	intron 7		RNA splicing
IVS7+5G>T	intron 7		RNA splicing
862G>T	exon 10	E288X	AA substitution
894-1006del	exon 11		frameshif
Ex10-12del*	exon 10		deletion
Ex10-17del*	exon 10		deletion
4075G>T	exon 41	D1359Y	AA substitution
IVS10-1G>A	intron 10		RNA splicing
IVS15-1G>T	intron 15		RNA splicing
IVS16+3A>C	intron 16		exon skip
IVS38-1G>C	intron 38		RNA splicing
IVS9+3del	intron 9	793del34	frameshift

**ANEXO IV - SEQUÊNCIA DO cDNA DO GENE *FANCC* E SEQUÊNCIA DA
PROTEÍNA QUE O GENE CODIFICA.
("Fanconi Anemia Mutation Database", 2002)**

ATG	GCT	CAA	GAT	TCA	GTA	GAT	CTT	TCT	TGT	30	
M	A	Q	D	S	V	D	L	S	C		10
GAT	TAT	CAG	TTT	TGG	ATG	CAG	AAG	CTT	TCT	60	
D	Y	Q	F	W	M	Q	K	L	S		20
GTA	TGG	GAT	CAG	GCT	TCC	ACT	TTG	GAA	ACC	90	
V	W	D	Q	A	S	T	L	E	T		30
CAG	CAA	GAC	ACC	TGT	CTT	CAC	GTG	GCT	CAG	120	
Q	Q	D	T	C	L	H	V	A	Q		40
TTC	CAG	GAG	TTC	CTA	AGG	AAG	ATG	TAT	GAA	150	
F	Q	E	F	L	R	K	M	Y	E		50
GCC	TTG	AAA	GAG	ATG	GAT	TCT	AAT	ACA	GTC	180	
A	L	K	E	M	D	S	N	T	V		60
ATT	GAA	AGA	TTC	CCC	ACA	ATT	GGT	CAA	CTG	210	
I	E	R	F	P	T	I	G	Q	L		70
TTG	GCA	AAA	GCT	TGT	TGG	AAT	CCT	TTT	ATT	240	
L	A	K	A	C	W	N	P	F	I		80
TTA	GCA	TAT	GAT	GAA	AGC	CAA	AAA	ATT	CTA	270	
L	A	Y	D	E	S	Q	K	I	L		90
ATA	TGG	TGC	TTA	TGT	TGT	CTA	ATT	AAC	AAA	300	
I	W	C	L	C	C	L	I	N	K		100
GAA	CCA	CAG	AAT	TCT	GGA	CAA	TCA	AAA	CTT	330	
E	P	Q	N	S	G	Q	S	K	L		110
AAC	TCC	TGG	ATA	CAG	GGT	GTA	TTA	TCT	CAT	360	
N	S	W	I	Q	G	V	L	S	H		120
ATA	CTT	TCA	GCA	CTC	AGA	TTT	GAT	AAA	GAA	390	
I	L	S	A	L	R	F	D	K	E		130
GTT	GCT	CTT	TTC	ACT	CAA	GGT	CTT	GGG	TAT	420	
V	A	L	F	T	Q	G	L	G	Y		140
GCA	CCT	ATA	GAT	TAC	TAT	CCT	GGT	TTG	CTT	450	
A	P	I	D	Y	Y	P	G	L	L		150

AAA	AAT	ATG	GTT	TTA	TCA	TTA	GCG	TCT	GAA	480	
K	N	M	V	L	S	L	A	S	E		160
CTC	AGA	GAG	AAT	CAT	CTT	AAT	GGA	TTT	AAC	510	
L	R	E	N	H	L	N	G	F	N		170
ACT	CAA	AGG	CGA	ATG	GCT	CCC	GAG	CGA	GTG	540	
T	Q	R	R	M	A	P	E	R	V		180
GCG	TCC	CTG	TCA	CGA	GTT	TGT	GTC	CCA	CTT	570	
A	S	L	S	R	V	C	V	P	L		190
ATT	ACC	CTG	ACA	GAT	GTT	GAC	CCC	CTG	GTG	600	
I	T	L	T	D	V	D	P	L	V		200
GAG	GCT	CTC	CTC	ATC	TGT	CAT	GGA	CGT	GAA	630	
E	A	L	L	I	C	H	G	R	E		210
CCT	CAG	GAA	ATC	CTC	CAG	CCA	GAG	TTC	TTT	660	
P	Q	E	I	L	Q	P	E	F	F		220
GAG	GCT	GTA	AAC	GAG	GCC	ATT	TTG	CTG	AAG	690	
E	A	V	N	E	A	I	L	L	K		230
AAG	ATT	TCT	CTC	CCC	ATG	TCA	GCT	GTA	GTC	720	
K	I	S	L	P	M	S	A	V	V		240
TGC	CTC	TGG	CTT	CGG	CAC	CTT	CCC	AGC	CTT	750	
C	L	W	L	R	H	L	P	S	L		250
GAA	AAA	GCA	ATG	CTG	CAT	CTT	TTT	GAA	AAG	780	
E	K	A	M	L	H	L	F	E	K		260
CTA	ATC	TCC	AGT	GAG	AGA	AAT	TGT	CTG	AGA	810	
L	I	S	S	E	R	N	C	L	R		270
AGG	ATC	GAA	TGC	TTT	ATA	AAA	GAT	TCA	TCG	840	
R	I	E	C	F	I	K	D	S	S		280
CTG	CTT	CAA	GCA	GCC	TGC	CAC	CCT	GCC	ATA	870	
L	P	Q	A	A	C	H	P	A	I		290
TTC	CGG	GTT	GTT	GAT	GAG	ATG	TTC	AGG	TGT	900	
F	R	V	V	D	E	M	F	R	C		300
GCA	CTC	CTG	GAA	ACC	GAT	GGG	GCC	CTG	GAA	930	
A	L	L	E	T	D	G	A	L	E		310
ATC	ATA	GCC	ACT	ATT	CAG	GTG	TTT	ACG	CAG	960	
I	I	A	T	I	Q	V	F	T	Q		320

TGC	TTT	GTA	GAA	GCT	CTG	GAG	AAA	GCA	AGC	990	
C	F	V	E	A	L	E	K	A	S		330
AAG	CAG	CTG	CGG	TTT	GCA	CTC	AAG	ACC	TAC	1020	
K	Q	L	R	F	A	L	K	T	Y		340
TTT	CCT	TAC	ACT	TCT	CCA	TCT	CTT	GCC	ATG	1050	
F	P	Y	T	S	P	S	L	A	M		350
GTG	CTG	CTG	CAA	GAC	CCT	CAA	GAT	ATC	CCT	1080	
V	L	L	Q	D	P	Q	D	I	P		360
CGG	GGA	CAC	TGG	CTC	CAG	ACA	CTG	AAG	CAT	1110	
R	G	H	W	L	Q	T	L	K	H		370
ATT	TCT	GAA	CTG	CTC	AGA	GAA	GCA	GTT	GAA	1140	
I	S	E	L	L	R	E	A	V	E		380
GAC	CAG	ACT	CAT	GGG	TCC	TGC	GGA	GGT	CCC	1170	
D	Q	T	H	G	S	C	G	G	P		390
TTT	GAG	AGC	TGG	TTC	CTG	TTC	ATT	CAC	TTC	1200	
F	E	S	W	F	L	F	I	H	F		400
GGA	GGA	TGG	GCT	GAG	ATG	GTG	GCA	GAG	CAA	1230	
G	G	W	A	E	M	V	A	E	Q		410
TTA	CTG	ATG	TCG	GCA	GCC	GAA	CCC	CCC	ACG	1260	
L	L	M	S	A	A	E	P	P	T		420
GCC	CTG	CTG	TGG	CTC	TTG	GCC	TTC	TAC	TAC	1290	
A	L	L	W	L	L	A	F	Y	Y		430
GGC	CCC	CGT	GAT	GGG	AGG	CAG	CAG	AGA	GCA	1320	
G	P	R	D	G	R	Q	Q	R	A		440
CAG	ACT	ATG	GTC	CAG	GTG	AAG	GCC	GTG	CTG	1350	
Q	T	M	V	Q	V	K	A	V	L		450
GGC	CAC	CTC	CTG	GCA	ATG	TCC	AGA	AGC	AGC	1380	
G	H	L	L	A	M	S	R	S	S		460
AGC	CTC	TCA	GCC	CAG	GAC	CTG	CAG	ACG	GTA	1410	
S	L	S	A	Q	D	L	Q	T	V		470
GCA	GGA	CAG	GGC	ACA	GAC	ACA	GAC	CTC	AGA	1440	
A	G	Q	G	T	D	T	D	L	R		480
GCT	CCT	GCA	CAA	CAG	CTG	ATC	AGG	CAC	CTT	1470	
A	P	A	Q	Q	L	I	R	H	L		490

CTC	CTC	AAC	TTC	CTG	CTC	TGG	GCT	CCT	GGA	1500	
L	L	N	F	L	L	W	A	P	G		500
GGC	CAC	ACG	ATC	GCC	TGG	GAT	GTC	ATC	ACC	1530	
G	H	T	I	A	W	D	V	I	T		510
CTG	ATG	GCT	CAC	ACT	GCT	GAG	ATA	ACT	CAC	1560	
L	M	A	H	T	A	E	I	T	H		520
GAG	ATC	ATT	GGC	TTT	CTT	GAC	CAG	ACC	TTG	1590	
E	I	I	G	F	L	D	Q	T	L		530
TAC	AGA	TGG	AAT	CGT	CTT	GGC	ATT	GAA	AGC	1620	
Y	R	W	N	R	L	G	I	E	S		540
CCT	AGA	TCA	GAA	AAA	CTG	GCC	CGA	GAG	CTC	1650	
P	R	S	E	K	L	A	R	E	L		550
CTT	AAA	GAG	CTG	CGA	ACT	CAA	GTC	TAG		1674	
L	K	E	L	R	T	Q	V	stop			558

**ANEXO V - MUTAÇÕES DO GENE *FANCC* DA ANEMIA DE FANCONI
("Fanconi Anemia Mutation Database", 2002)**

Nome da mutação	Localização (exon ou intron)	Troca do aminoácido	Tipo da mutação
1806insA	exon 14		Insertion
322delG	exon 1	23D>I+21aa	Frameshift
775C>T	exon 5	R174X	AA substitution
IVS4+4A>T	intron 4		RNA splicing
L496R (1742T>G)	exon 13	L496R	AA substitution
L554P (1916T>C)	exon 14	L554P	AA substitution
Q13X (292C>T)	exon 1	Q13X	Stop codon
R185X(808C>T)	exon 6	R185X	Stop codon
R548X (1897C>T)	exon 14	R548X	Stop codon
W22X (320G>A)	exon 1	W22X	Stop codon

ANEXOVI – AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo em 3 letras	Símbolo em 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Aspargina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBONDANZO, S.L.; MANZ, H.J.; KLAPPENBACH, R.S. *et al.* - Hepatocellular carcinoma in an 11-year-old girl with Fanconi's anemia. Report of a case and review of the literature. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **8(4)**: 334-337, 1986.

ALIMENA, G.; AVVISATI, G.; DE CUIA, M.R. *et al.* - Retrospective diagnosis of a Fanconi's anemia patient by diepoxibutane (DEB) test results in parents. *Haematol.*, **68**: 97, 1983.

ALTER, B.P. - Fanconi's anemia and its variability. *Br. J. Haematol.*, **85**: 9-14, 1993.

ALTER, B.P. - Fanconi's anemia and malignancies. *Am. J. Hematol.*, **53(2)**: 99-110, 1996.

ALTER, B.P.; POTTER, N.U. & LI, F.P. - Classification and a etiology of the aplastic anemia. *Clin. Haematol.*, **7**:431, 1978.

APOSTOLOUS, S.; WHITMORE, A.S.; CRAWFORD, J.; *et al.* - Positional cloning of the Fanconi anemia group C gene. *Nat. Genet.*, **14**: 324, 1996.

AUERBACH, A.D. - Fanconi anemia. *Dermatol. Clinic.*, **13(1)**: 41-49, 1995.

AUERBACH, A.D. - Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. *Leukemia*, **6(suppl. 1)**: 1-4, 1992.

AUERBACH, A.D. & ALLEN, R.G. - Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Canc. Genet. Cytogenet.*, **51(1)**: 1-12, 1991.

AUERBACH, A.D.; ADLER, B. & CHAGANTI, R.S. - Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. *Pediatrics*, **67(1)**: 128-135, 1981.

AUERBACH, A.D.; ROGATKO, A. & SCHROEDER-KURTH, T.M. - International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood*, **73**: 391-396, 1989.

BESSHO, F.; MIZUTANI, S.; HAYASHI, Y. *et al.* - Chronic myelomonocytic leukemia with chromosomal changes involving 1p36 and hepatocellular carcinoma in a case of Fanconi's anemia. *Eur. J. Haematol.*, **42(5)**: 492-495, 1989.

BLOOMFIELD, C.D. & BRUNNING, R.D. - Acute leukemia as a terminal event in nonleukemic hematopoietic disorders. *Semin. Oncol.*, **3**: 297, 1976

BUTTURINI, A.; GALE, R.P.; VERLANDER, P.C. *et al.* - Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: An International Fanconi Anemia Registry Study. *Blood*, **84(5)**: 1650-1655, 1994.

CERVENKA, J.; ARTHUR, D.; YASIS, C. - Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic Aplastic anemia and Fanconi anemia. *Pediatrics*, **67(1)**: 119-127, 1981.

- DAVIES, A.A.; MASSON, J.Y.; McILWRAITH, M.J.; STASIAAK, A.Z.; STASIAAK, A.; VENKITARAMAN, A.R. & WEST, S.C. - Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol cell*. **7**: 273-282, 2001.
- DE CHADARÉVIAN, J.P.; VEKEMANS, M. & BERNSTEIN, M. - Fanconi's anemia medulloblastoma, Wilms' tumor, horseshoe kidney and gonadal dysgenesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **109(4)**: 367-369, 1985.
- DEEG, H.J.; SOCIE, G.; SCHOCH, G. *et al.* - Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and Fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of result in 700 patients. *Blood* **87(1)**: 386-392, 1996.
- DUCKWORTH-RYSIECKI, G.; CORNISH, K.; CLARKE, C.A. *et al.* - Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **11**: 35-41, 1985.
- ESTREN, S. & DAMESHEK, W. - Familial hypoplastic anemia of childhood. Report of eight cases in two families with beneficial affect of splenectomy in one case. *Am. J. Dis. Child.*, **73**: 671, 1947.
- FANCONI, G. - Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild and Konstitution). *Jahrbuch der Kinderheil Kunde*, **117**: 257-280, 1927.
- FAIVRE, L.; GUADIOLA, P.; LEVIS, C. *et al.* - Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. *Blood* **96**: 4064-4070, 2000

GARCIA-HIGUERA, I.; TANIGUCHI, T.; GANESAN, S.; MEYN, M.S.; TIMMERS, C.; HEJNA, J.; GROMPE, M. & D'ANDREA, A.D - Interaction of the Fanconi anemia proteins and brca1 in a common pathway. *Mol. cell.* **7**: 249-262, 2001.

GIAMPIETRO, P. F.; DAVIS, J.G. & AUERBACH, A.D. - Fanconi's anemia. *N. Engl. J. Med.*, **330(10)**: 720-721, 1994.

GIAMPIETRO, P. F.; VERLANDER, P.C.; DAVIS, J.G. *et al.* - Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: An International Fanconi Anemia Registry Study. *Am. J. Med. Genet.*, **68**: 58-61, 1997.

GIBBONS, B.; SCOTT, D.; HUNGERFORD, J.L. *et al.*, - Retinoblastoma in association with the chromosome breakage syndromes Fanconi's anemia and Bloom's syndrome: clinical and cytogenetic findings. *Clin. Genet.*, **47(6)**: 311-317, 1995.

GIBSON, R.A.; BUCHWALD, M.; ROBERTS, R.G. & MATHEW, C.G. - Characterization of the exon structure of the Fanconi anemia group C gene by vectorette PCR. *Hum. Mol. Genet.*, **2(1)**: 35-38, 1993.

GIBSON, R.A.; MORGAN, N.V.; GOLDSTEIN, L.H.; PEARSON, I.C.; KESTERTON, I.P.; FOOT, N.J.; JANSEN, E.; *et al.* - Novel mutations and polymorphisms in the Fanconi anemia group C gene. *Hum. Mut.*, **8**: 140-148, 1996.

GLANZ, A. & FRASER, F.C. - Spectrum of anomalies in Fanconi anemia. *J. Med. Genet.* **19(6)**: 412-416, 1982.

- GROMPE, M. & D'ANDREA, A. - Fanconi anemia and DNA repair. *Hum. Mol. Genetic.*, **10(20)**: 2253-2259, 2001.
- HAGERMAN, D.A. & WILLIAMS, G.P. - Some features of Fanconi's anemia. *N. Engl. J. Med.*, **329**: 1168, 1993.
- HILL, L.S.; DENNIS, P.M. & FAIRHAM, S.A. - Adenocarcinoma of the stomach and Fanconi's anemia. *Postgrad. Med. J.*, **57(668)**: 404, 1981.
- HOATLIN, M.E.; CHRISTIANSON, T.A.; KEEBLE, W.W.; HAMMOND, A.T.; ZHI, Y.; HEINRICH, M.C.; TOWER, P.A. & BAGBY, G.C.Jr. - The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells. *Blood*, **91(4)**: 1418-1425, 1998.
- HOLDER, L.E.; GNARRA, D.J.; LAMPKING, B.C. *et al.* - Hepatoma associated with anabolic steroid therapy. *Am. J. Rroentgenol. Radium. Ther. Nucl. Méd.*, **124(4)**: 638-642, 1975.
- HOWLETT, N.G.; TANIGUCHI, T.; OSLSON, S.; COX, B.; WAISFISZ, Q.; de DIE-SMULDER, C.; PERSKY, N.; GROMPE, M.; JOENJE, H.; PALS, H.; FOX, E.A. & D'ANDREA, A.D. - Biallelic inactivation of *BRCA2* in Fanconi anemia. *Science* **297**: 606-609, 2002.
- JACOBS, P. & KARABUS, C. - Fanconi's anemia. A family study with 20-year follow-up including associated breast pathology. *Cancer*, **54(9)**: 1850-1853, 1984.

JOENJE, H.; LEVITUS, M.; WAISFISZ, Q.; D'ANDREA, A.; GARCIA-HIGUERA, I.; PEARSON, T.; VAN BERKEL, C.G.; ROOIMANS, M.A.; MORGAN, N. MATHEW, C.G. *et al.* - Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**: 759-762, 2000.

JOENJE, H.; LO TEN FOR, J.R.; OOSTRA, A.B. *et al.* - Classifications of Fanconi anemia patients by complementation analysis: Evidence for a Fifth genetic Subtype. *Blood*, **86(6)**: 2156-2160, 1995.

JOENJE, H.; OOSTRA, A.B.; WIJKER, M.; DiSUMMA, F.M.; VanBERKEL, C.G.; ROOIMANS, M.A.; EBELL, W.; VanWEEL, M.; PRONK, J.C.; BUCHWALD, M. & ARWERT, F. - Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. *Am. J. Hum. Genet.*, **61**: 940-944, 1997.

JOENJE, H. - Complementation study and Mosaicism: Update. *FA Science Letter*, **22**: 6, 1997.

JOENJE, H. & PATEL, K.J. - The emerging genetic and molecular basic of Fanconi anemia. *Nat. Rev. Genet.*, **2**: 446-457, 2001

JONES, K.L. - Fanconi pancytopenia syndrome. *In* Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. *W. B. Saunders Company*, 320-321, 1997.

KENNEDY, AW. & HART, W.R. - Multiple squamous-cell carcinomas in Fanconi's anemia. *Cancer*, **50(4)**: 811-814, 1982.

KUTLER, D.I.; SINGH, B.; SATAGOPAN, J.; BATISH, S.D.; BERWICK, M.; GIAMPIETRO, P.F.; HANENBERG, H. & AUERBACH, A.D. - A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia registry (IFAR). *Blood* **101(4)**: 1249 - 1256, 2003.

KWEE, M.L.; VAN DE KLEIJ, J.M.; VAN ESSEN, A.J. *et al.* - An atypical case of Fanconi anemia in elderly sibs. *Am. J. Med. Genet.*, **68(3)**: 362-366, 1997.

LEVINSON, S. & VICENT, K.A. - Multifocal osteosarcoma in a patient with Fanconi anemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **19(3)**: 251-253, 1977.

LEVRAN, O.; ERLICH, T.; MAGDALENA, N.; GREGORY, J.J.; BATISH, S.D.; VERLANDER, P.C. & AUERBACH, A.D. - Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 13051-13056, 1997.

LI, F.P. & POTTER, N.U. - Classical Fanconi anemia in a family with hypoplastic anemia. *J. Pediatr.*, **92**: 943, 1978.

LO TEM FOE, J.R.; ROOIMANS, M.A.; BOSNOYAN-COLLINS, L.; *et al.* - Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anemia gene, FAA. *Nat. Genet.*, **14(3)**: 320-323, 1996.

LUSTIG, J.P.; LUGASSY, G.; NEDER, A.; *et al.* - Head and neck carcinoma in Fanconi's anaemia: report of a case and review of the literature. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.*, **31B(1)**: 68-72, 1995.

MACDOUGALL, G.; GREEFF, M.C.; ROSENDORFF, J. *et al.* - Fanconi anemia in black African children. *Am. J. Med.Genet.*, **36**: 408-413, 1990.

MAGDALENA, N.I.R. - Estudo das variações da seqüência do gene FANCA da Anemia de Fanconi. Curitiba, 1999. [Tese - Doutorado - Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná]

McMULLIN, F.; MAHENDRA, P.; HAIN, R. *et al.* - Myelodysplasia as the initial presentation of Fanconi's anaemia in a phenotypically normal child. *Clin. Lab. Haemtol.*, **13**:387-389, 1991.

MOYNAHAN, M.E.; CUI, T.Y. & JASIN, M. - Homology-directed DNA repair, mitomycin-C resistance, and chromosome stability is restored with correction of a *BRCA1* mutation. *Cancer Res.* **61**: 4842-4850, 2001.

MURAYAMA, S.; MANZO, R.P.; KIRKPATRICK, D.V. *et al.* - Squamous cell carcinoma of the tongue association with Fanconi's anemia: MR characteristics. *Pediatr. Radiol.*, **20**(5): 347, 1990.

PINTO Jr, W. - Informação Pessoal.

PRONK, J.C.; GIBSON, R.A.; SAVOIA, A. *et al.* - Localization of the Fanconi anemia complementation group A gene to chromosome 16q24.3. *Nat. Genet.*, **11**(3): 338-340, 1995.

ROSENDORFF, J.; BERNTEIN, R.; MACDOUGALL, L. *et al.* - Fanconi anemia: Another disease of unusually high prevalence in the Afrikaans population of South Africa. *Am. J. Med. Genet.*, 27: 793-797, 1987.

RUFFNER, H.; JOAZEIRO, C.A.P.; HEMMATI, D.; HUNTER, T. & VERMA, I.M. - cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 5134-5139, 2001.

SAIKI, R.K.; GILFEND, D.H.; STOFFEL, S. & ERLICH, H. - Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988.

SARNA, G.; TOMASULO, P.; LOTZ, M.J. *et al.* - Multiple neoplasms in two siblings with a variant form of Fanconi's anemia. *Cancer*, 36(3): 1029-1033, 1975.

SCHAISSON, G.; LEVERGER, G.; YILDIZ, C. *et al.* - Fanconi's anemia. Incidence of its development into leukemia. *Presse. Med.*, 12(20): 1269-1274, 1983.

SCHROEDER, T.M.; ANSCHÜTZ, F.; KNOPP, A. - Spontane chromosomen aberrationen bei familiärer panmyelopathie. *Humangenetik*, 1: 194-196, 1964.

SCHROEDER, T.M.; TILGEN, D.; KRÜGER, J. *et al.* - formal genetics of Fanconi's anemia. *Hum. Genet.*, 32(3): 257-288, 1976.

- SHAPIRO, P.; IKEDA, R.M.; RUEBNER, B.H. *et al.* - Multiple hepatic tumors and peliosis hepatis in Fanconi's anemia treated with androgens. *Am. J. Dis. Child.*, **131(10)**: 1104-1106, 1977.
- SHIMAMURA, A.; DE OCA, R.M.; SVENSON, J.L.; HAINING, N.; MOREAU, L.A.; NATHAN, D.G. & D'ANDREA, A.D. - A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood* **100(13)**: 4649 - 4654, 2002.
- STRATHDEE, C.A.; GAVISH, H.; SHANNON, W.R. & BUCHWALD. - Cloning of cDNA for Fanconi anemia by functional complementation. *Nature.*, **356**: 763-767, 1992.
- SWIFT, M. - Fanconi anemia: Cellular abnormalities and clinical predisposition to malignant disease: *In* Congenital Disorders of Erythropoiesis. *Ciba Foundation Symposium 37*. Amsterdam. Elsevier: 115, 1976.
- SWIFT, M.; ZIMMERMAN, D. & McDONOUGH, E.R. - Squamous cell carcinoma in Fanconi's anemia. *JAMA*, **216**: 325-326, 1971.
- TANIGUCHI, T. & D'ANDREA, A.D. - Molecular pathogenesis of Fanconi anemia. *Int. J. Hematol.*, **75**: 123-128, 2002.
- VAN NIEKERK, C.H.; JORDAAN, C. & BADENHORST, P.N. - Pancytopenia secondary to primary malignant lymphoma of bone marrow as the first hematologic manifestation of Estren-Dameshek variant of Fanconi's anemia. *Eur. J. Pediatr.*, **152(8)**: 691-693, 1987.

- VERLANDER, P.C.; KAPORIS, A.; LUI, Q. *et al.* - Carrier frequency of the IVS4+4A→T mutation of the Fanconi anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. *Blood*, **86(11)**: 4034-4038, 1995.
- VERLANDER, P.C.; LIN, J.D.; UDONO, U.M.; ZHANG, Q.; GIBSON, R.A.; MATHEW, C.G. & AUERBACH, A.D. - Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *Am. J. Hum. Genet.*, **54(2)**: 595-601, 1994.
- WANG, Y.; CORTEZ, D.; YAZDI, P.; NEFF, N.; ELLEDGE, S.J. & QIN, J. - BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* **14**: 927-939, 2000.
- WEST, S.C. - Cross-link between Fanconi anaemia and BRCA2. *DNA Repair*, **94**:1-4, 2002.
- WINDASS, B.; VOLWELS, M.R.; O'GARMAN HUGHES, D. *et al.* - Aplastic anaemia in childhood: Prognosis and approach to therapy. *Med. J. Aust.*, **146**: 15, 1987.
- YAMASHITA, T.; WU, N.; KUPFER, G.; CORLESS, C.; JOENJE, H.; GROMPE, M. & D'ADREA, A.D. - Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood*, **87(10)**: 4424-4432, 1996.
- YOSHIDA, M.C. - Suppression of spontaneous and mitomycin C-induced chromosome aberrations in Fanconi's anemia by cell fusion with normal human fibroblasts. *Hum. Genet.*, **55(2)**: 223-226, 1980.

ZAKRZEWSKI, S. & SPERLING, K. - Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum. Genet.*, **56(1)**: 81-84, 1980.

ZATTERALE, A.; CALZONE, R.; RENDA, S. *et al.* - Identification and treatment of late onset Fanconi's anemia. *Hematol.*, **80(6)**: 535-538, 1995.

Endereço na World Wide Web: <http://www.rockefeller.edu/fanconi/mutate>