

**CLAUDIA ESTELA GONÇALVES**

**ESTUDO DAS MUTAÇÕES DO GENE *FANCC* EM  
PACIENTES COM QUADRO CLÍNICO DE ANEMIA  
DE FANCONI NA REGIÃO DE CAMPINAS**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**CLAUDIA ESTELA GONÇALVES**

**ESTUDO DAS MUTAÇÕES DO GENE *FANCC* EM  
PACIENTES COM QUADRO CLÍNICO DE ANEMIA  
DE FANCONI NA REGIÃO DE CAMPINAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do título de  
Mestre em Farmacologia.

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G586e                      Gonçalves, Claudia Estela  
                                    Estudo das mutações do gene Fancc em pacientes com quadro  
                                    clínico de anemia de Fanconi na região de Campinas / Claudia Estela  
                                    Gonçalves. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

                                    Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo  
                                    Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
                                    Faculdade de Ciências Médicas.

                                    1. Fanconi, Anemia de. 2. Instabilidade cromossômica. I.  
                                    Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas.  
                                    Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Mutation analysis of FANCC gene in patients with  
compatible clinical of Fanconi anaemia in the region of Campinas**

**Keywords:** • Fanconi, Anemia  
                                    • Chromosomal instability

**Titulação: Mestre em Farmacologia**

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
**Prof. Dr. José Andrés Yunes**  
**Prof. Dr. Mithitaka Soma**

**Data da defesa: 24 - 01 - 2008**



---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

**Orientador:**

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Handwritten signature of Carmen Sílvia Bertuzzo in black ink.

**Membros:**

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Prof. Dr. José Andrés Yunes

Prof. Dr. Mithitaka Soma

Three handwritten signatures in black ink, corresponding to the names listed above. The first signature is for Carmen Sílvia Bertuzzo, the second for José Andrés Yunes, and the third for Mithitaka Soma.

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

---

Data: 24/01/2008

---

***DEDICATÓRIA***

*Com amor à minha amada filha*

*Amanda Bárbara*

## AGRADECIMENTOS

---

Em primeiro lugar à Deus pela vida.

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo pela oportunidade, orientação, confiança e amizade.

À minha insubstituível e amada família: meu marido Armando, minha filha Amanda Bárbara, minha mãe Clélia, meus irmãos Leda, Cristiani e José Cláudio e minhas sobrinhas: Larissa, Carla Catarina, Julia Beatriz, Maria Sofia e Maria Luiza. Minha gratidão eterna.

As minhas amigas gêmeas que me incentivaram a estudar neste laboratório.

Aos amigos do grupo Fanconi, Renato e Lucila.

À minhas amigas, Daniela Tenório Furgeri, Lidiane Camila Rueda, Luciana Bonadia, Cyntia Corrêa, Lillian Queiroz, Marilza, Cíntia Marques, Carina, Dra. Cláudia, Romênia, Simoni, Milena, Érika e Giovana, enfim todos que de uma forma ou de outra colaboraram com o resultado deste trabalho.

À todos muito obrigada

*A Vida é uma peça de Teatro...*

*Que não permite ensaios.*

*Por isso...Cante, chore, ria, dance e  
viva intensamente,*

*Antes que a cortina se feche...*

*E a peça termine sem aplausos!*

**Charles Chaplin**

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xiv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvi</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1- Aspectos Gerais</b> .....	19
<b>1.2- Características Clínicas</b> .....	19
1.2.1- Manifestações Físicas.....	20
1.2.2- Manifestações não-Hematológicas.....	22
1.2.3- Manifestações Hematológicas.....	23
1.2.4- Desenvolvimento de Cânceres.....	24
<b>1.3- Fenótipo Celular</b> .....	25
<b>1.4- Testes Diagnósticos e Teste de Complementação</b> .....	28
<b>1.5- FANCC</b> .....	38
<b>1.6- Função das Proteínas</b> .....	41
<b>1.7- Terapêutica e Perspectivas para o Futuro</b> .....	45
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	47
<b>2.1- Objetivo Geral</b> .....	48
<b>2.2- Objetivos Específicos</b> .....	48
<b>3- CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	49
<b>3.1- Casuística</b> .....	50
<b>3.2- Critérios de Inclusão</b> .....	50
<b>3.3- Métodos</b> .....	50



3.3.1- Extração de DNA de leucocitos periféricos utilizando-se LiCl (Cloreto de Lítio) e Proteinase K.....	51
3.3.2- Amplificação Gênica (PCR) e Digestão Enzimática.....	51
3.3.3- Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).....	54
3.3.4- Coloração de Prata.....	56
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1- Mutação IVS4+4A&gt;T.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2- Mutação Q13X.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3- Mutação L554P.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4- Mutação W22X.....</b>	<b>61</b>
<b>4.5- Mutação R548.....</b>	<b>62</b>
<b>4.6- Mutação L496.....</b>	<b>62</b>
<b>4.7- Mutação G322.....</b>	<b>63</b>
<b>4.8- SSCP.....</b>	<b>64</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<i>AF</i>	Anemia de Fanconi
AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia Relacionado
BLM	gene da Síndrome de Bloom
BRCA1	Breast cancer gene 1
BRCA2	Breast cancer gene 2
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DEB	diepoxibutano
<i>DNA</i>	ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinocleotideo tri-fosfato
EFARP	European Fanconi Anaemia Research Programme
<i>FAAP</i>	<i>Fanconi Anemia-associated polypeptide</i>
HLA	Human Leucocytes Antigens
IFAR	International Fanconi Anemia Registry
Kda	Kilodáton
LiCl	cloreto de lítio
<i>LMA</i>	<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
<i>MDS</i>	<i>Síndrome Mielodisplásica</i>
<i>MMC</i>	<i>Mitomicina C</i>
<i>MO</i>	<i>Medula óssea</i>
NBS	Nijmegen Syndrome

OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
P53/TP53	Tumor protein p53
SMD	Síndrome Mieloplásica
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TCH	Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Os 13 genes envolvidos na AF e identificados até o momento.....	32
<b>Tabela 2-</b> Mutações descritas no gene <i>FANCC</i> .....	40
<b>Tabela 3-</b> Relação de mutações com respectivas enzimas utilizadas para a digestão enzimática e fragmento para análise.....	52
<b>Tabela 4-</b> Primers dos 14 éxons do gene <i>FANCC</i> utilizados na amplificação dos fragmentos para SSCP e tamanhos em pb.....	55
<b>Tabela 5-</b> Resultado das mutações estudadas no gene <i>FANCC</i> .....	66
<b>Tabela 6-</b> Resultados parciais da triagem de mutações, pelo método SSCP, dos 14 éxons do gene <i>FANCC</i> .....	67

	PÁG.
<b>Figura 1-</b> Paciente portador com alteração na implantação dos polegares, hipoplasia radial (A) e regiões hiper e hipopigmentadas no tronco (B).....	21
<b>Figura 2-</b> Indivíduo com AF apresentando dismorfismos faciais (A) e Indivíduo com alterações físicas clássicas de AF, como baixa estatura, microcefalia, microftalmia e hipoplasia de radio (B).....	21
<b>Figura 3-</b> Alterações cromossômicas estruturais em indivíduos portadores.....	26
<b>Figura 4-</b> Esquema representando as quebras cromatídicas entre cromossomos não homólogos.....	27
<b>Figura 5-</b> Teste de Complementação utilizando células de três indivíduos com AF (P1, P2 e P3).....	30
<b>Figura 6-</b> Prevalência relativa dos onze grupos de complementação da AF.....	31
<b>Figura 7-</b> Representação do gene <i>FANCA</i> .....	33
<b>Figura 8-</b> Representação do gene <i>FANCE</i> .....	34
<b>Figura 9-</b> Representação do gene <i>FANCF</i> .....	35
<b>Figura 10-</b> Representação do gene <i>FANCD2</i> .....	35
<b>Figura 11-</b> Representação do gene <i>FANCD1</i> .....	36
<b>Figura 12-</b> Representação do gene <i>FANCL</i> .....	37
<b>Figura 13-</b> Representação do gene <i>FANCB</i> .....	37
<b>Figura 14-</b> Representação da estrutura do gene <i>FANCG</i> .....	38
<b>Figura 15-</b> Representação do gene <i>FANCC</i> .....	39
<b>Figura 16-</b> Representação das três vias relacionadas às proteínas da AF.....	44

<b>Figura 17-</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da mutação IVS4+4A>T.....	58
<b>Figura 18-</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da mutação IVS4+4A>T.....	59
<b>Figura 19-</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da mutação Q13X.....	59
<b>Figura 20-</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da mutação Q13X.....	60
<b>Figura 21-</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da mutação L554P.....	61
<b>Figura 22-</b>	Digestão da mutação W22X.....	61
<b>Figura 23-</b>	Digestão da mutação R548X.....	62
<b>Figura 24-</b>	Gel de acrilamida 12% com digestão da Mutação L496R.....	63
<b>Figura 25-</b>	Digestão da PCR de indivíduo normal para mutação delG322.....	63
<b>Figura 26-</b>	Digestão da PCR de indivíduos normais e heterozigotos para a mutação delG322.....	64
<b>Figura 27-</b>	Foto de gel não-desnaturante SSCP do éxon 2.....	64
<b>Figura 28-</b>	Foto de gel SSCP do éxon 1.....	65
<b>Figura 29-</b>	Foto de gel SSCP do éxon 4.....	65
<b>Figura 30-</b>	Foto de gel SSCP do éxon 6.....	66

# RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença que apresenta herança autossômica recessiva. É caracterizada por múltiplas anomalias congênitas, progressiva falha da medula óssea e alto risco para desenvolvimento de câncer. A mais importante das características clínicas é a manifestação hematológica, responsável pelo grande número de morbidade e mortalidade em portadores de AF. Também é chamada de síndrome da instabilidade cromossômica por apresentar hipersensibilidade a agentes clastogênicos como a mitomicina C e diepoxibutano. A incidência da AF em todo o mundo é de aproximadamente, três por milhão e a frequência de heterozigotos é estimada em um para 300 na Europa e Estados Unidos. No Brasil não há dados sobre a prevalência da doença. Foram descobertos até o momento 13 grupos de complementação (FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M e N), e os 13 genes foram clonados e pelo menos 11 genes estão relacionados ao distúrbio. O presente estudo teve como objetivo a análise das principais mutações (IVS4+4A>T, Q13X, W22X, DG322, R185X, L496R, L554P, e R548X) do gene *FANCC* em pacientes com quadro clínico de AF. Foram analisados 121 indivíduos com clínica compatível à AF e com DEB teste positivo. Na amostra encontramos 14% de indivíduos heterozigotos e 4% de indivíduos homozigotos para as mutações mais frequentes do gene *FANCC*. As mutações mais prevalentes foram: IVS4+4A>T com 6,6% dos alelos analisados, com frequência similar à encontrada na literatura, W22X com 2,47% dos cromossomos analisados e Q13X com 1,23% dos cromossomos analisados. Na triagem de mutações pela técnica de SSCP, encontramos alterações nos éxons 1, 4 e 6.

**Palavras chave:** 1. Fanconi, Anemia de, 2. Fancc , 3. Instabilidade cromossômica



**ABSTRACT**

Fanconi anaemia (FA) is an autosomal recessive disease characterized by congenital abnormalities, progressive bone marrow failure and high risk of developing cancer. The most important of the clinic feature is hematologic, and too the most important cause of morbidity and mortality in FA. It's also called Chromosomal Instability Syndrome to the fact of cells presents hipersensibility to DNA cross-linking agents like mitomycin C and diepoxybutane. The incidence of FA is approximately three per million and the heterozygote frequency is estimated at 1 in 300 in Europe and United States. In Brazil there's no data about prevalence of FA. It was discovered at least 13 complementation groups (FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M e N), and 13 genes have been cloned and there are at least 11 that are related to the disease. The study had as general objective the analysis of the main mutations (IVS4+4A>T, Q13X, W22X, DG322, R185X, L496R, L554P, and R548X) of *FANCC* gene in patients with clinic compatible of FA. We analyzed 121 patients with compatible clinic and positive DEB test. In the sample we found 14% of individuals heterozygous and homozygous individuals of 4% for the most frequent mutations of the gene *FANCC*. Mutations were more prevalent: IVS4 4 A> T with 6.6% of alleles tested, often similar to that found in the literature, W22X with 2.47% of chromosomes analyzed and Q13X with 1.23% of chromosomes analyzed. In screening for mutations by the technique of SSCP, we found changes in exons 1, 4 and 6.

**Keywords:** 1. Fanconi, Anemia, 2. *FANCC*, 3. Chromosomal instability

# **1- INTRODUÇÃO**

## 1.1- Aspectos Gerais

A Anemia de Fanconi (AF) foi descrita primeiramente pelo pediatra suíço Guido Fanconi em 1927 como uma forma familiar de anemia aplástica observada em três irmãos, com idades entre cinco e sete anos, que apresentavam estatura baixa, malformações esqueléticas, hipogonadismo, hipopigmentação na pele e pancitopenia. Desde então, mais de 1300 casos foram relatados (Alter, 1996; Alter, 2003; Fanconi, 1927; Giampietro *et al.*, 1997).

A incidência mundial da AF em todo o mundo é de aproximadamente três por milhão e a frequência de heterozigotos é estimada em um para 300 na Europa e Estados Unidos. Essa doença tem sido relatada em vários grupos étnicos, e mutações têm sido descritas em judeus *Ashkenazi*, com frequência de 1 para 89, e em africanos da África do Sul em 1 para 83. No Brasil, não há dados sobre a prevalência da AF (Rosendorff *et al.*, 1987; Tischkowitz e Dokal, 2004; Verlander *et al.*, 1995).

A expectativa de vida dos pacientes deste distúrbio é em média 23 anos (0-38 anos) (Alter, 1996).

Entre as doenças associadas a aberrações cromossômicas estruturais e que possuem um espectro de características semelhantes à AF estão: ataxia-telangiectasia, o xeroderma pigmentoso, a síndrome de Cockayne, o câncer hereditário sem polipose, a síndrome de Bloom, a neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e a síndrome de Nijmegen (Jorde *et al.*, 2004 e Tischkowitz, 2004).

## 1.2- Características Clínicas

A AF é um distúrbio clinicamente heterogêneo, caracterizado por múltiplas anomalias congênitas, progressiva falha da medula óssea e alto risco de desenvolvimento de câncer (Wang e D'Andrea, 2004).

### 1.2.1- Manifestações Físicas

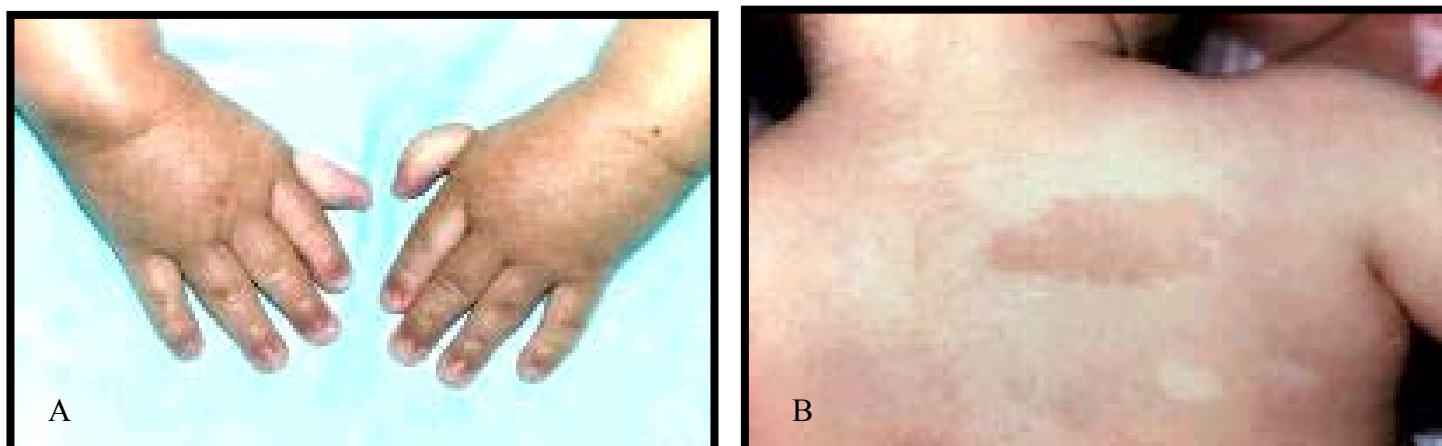
As anomalias congênitas mais comuns em pacientes com AF são as malformações do esqueleto como as observadas nos polegares que ocorrem em 39-55% dos casos. Entre elas temos: hipoplasia, ausência dos polegares ou ainda polegares supranumerários. Ausência ou hipoplasia radial estão envolvidas em 13-16% dos casos. Menos comumente afetados estão a espinha (espinha bífida), costelas (hipoplasia) e quadris (deslocamento e displasia) (Kerviler *et al.*, 2000; Giampietro *et al.*, 1993; Glanz e Fraser, 1982).

A AF é também associada ao retardo de crescimento pré e pós-natal, em 54-77% dos casos, e baixo peso ao nascimento. Isso pode estar relacionado à deficiência de hormônio de crescimento ou hipotireoidismo, pois em estudo prospectivo com 54 indivíduos, 44% destes tiveram uma resposta subnormal à estimulação com hormônio de crescimento e 36% apresentavam hipotireoidismo (Auerbach, 1999; de Kerviler *et al.*, 2000; Wajnrajch *et al.*, 2001).

Outra característica muito comum da AF é a presença de anomalias cutâneas que se devem à deposição de melanina em determinados locais da pele. Consistem principalmente de manchas *café-au-lait* encontradas em 63-79% dos pacientes. Esse aumento da pigmentação ocorre principalmente na região do tronco, ao redor do pescoço, na virilha e axilas como mosqueado ou manchas largas de bordas difusas. Além disso, outra anomalia cutânea freqüente é a hipopigmentação, encontrada em 31% dos indivíduos que consiste de manchas bem pequenas próximas umas das outras (Kerviler *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1989) (Figuras 1A e 1B).

A baixa estatura aparece como uma das principais características físicas observadas nessa doença, com mais de 60% dos indivíduos segundo Giampietro *et al.* (1993).

As malformações faciais observadas nos pacientes são principalmente: face dismórfica, micrognatia e microcefália, base nasal ampla, fendas palpebrais estreitas e pregas epicantais (Tischkowitz e Hodgson, 2003) (Figura 2).



**Figura 1-** Paciente portador com alteração na implantação dos polegares, hipoplasia radial (A) e regiões hiper e hipopigmentadas no tronco (B).

**Fonte:** <http://www.emedicine.com/ped/topic3022.htm> ou Alter, 1993.



**Figura 2-** Indivíduo com AF apresentando dismorfismos faciais (A) e Indivíduo com alterações físicas clássicas de AF, como baixa estatura, microcefalia, microftalmia e hipoplasia de radio (B). **Fonte:** Auerbach *et al.* (2002).

### 1.2.2- Manifestações não-Hematológicas

Na AF mais de um terço dos casos não apresentam anormalidades congênitas óbvias, somente sendo diagnosticados quando outro indivíduo da família é afetado ou quando desenvolvem alterações hematológicas. O diagnóstico estabelecido previamente ao desenvolvimento de aplasia medular, antes dos oito anos de idade, ocorre em menos de 50% dos casos. Em estudo realizado por Giampietro *et al.* (1997), 144 dos 419 pacientes analisados (34%) não apresentaram anomalias congênitas principais, sendo diagnosticados somente via análise citogenética e/ou molecular (Berger *et al.*, 1993).

Anomalias renais estão presentes em aproximadamente um terço dos pacientes e incluem aplasia renal unilateral, hipoplasia, rins em forma de ferradura ou ureteres duplos. Em homens há uma alta incidência de anomalias genitais como hipogenitália, que afeta mais de 51% dos casos, hipospádia, sendo a infertilidade muito frequente (Liu *et al.*, 1991).

Alterações nos níveis de glicose/insulina são comuns e os autores concluíram que somado à baixa estatura, uma característica observada na maioria dos indivíduos portadores, as endocrinopatias adquiridas devem prejudicar ainda mais o crescimento (Tischkowitz e Dokal, 2004).

Surdez condutiva é relativamente comum, em geral moderada, podendo ou não estar associada a malformações do ouvido externo (Kerviler *et al.*, 2000).

Anomalias menos comuns são as gastrintestinais, cardíacas e do sistema nervoso e central (Kaplan *et al.*, 1985).

Apesar dos pacientes apresentarem características em comum, existe um amplo grau de variabilidade fenotípica entre famílias, como exemplificado por Koc *et al.* (1999) que descreveram quatro indivíduos afetados, de duas famílias consangüíneas não relacionadas, que apresentavam uma grande variação no peso ao nascimento, pigmentação da pele e gravidade das anomalias esqueléticas, renais e genitais. De acordo com Lo Ten Foe *et al.* (1997), é provável que mosaïcismo somático seja a principal explicação para a variação fenotípica nas famílias na AF. O mosaïcismo é caracterizado pela presença, em

um mesmo indivíduo, de duas ou mais linhagens celulares, sendo a causa comum de mosaicismos, a não-disjunção dos cromossomos em uma mitose pós-zigótica inicial (Nussbaum *et al.*, 2002).

Como é de se esperar os mosaicos somáticos apresentam fenótipo hematológico leve (Lo Ten Foe *et al.*, 1997).

### 1.2.3- Manifestações Hematológicas

A mais importante das características clínicas na AF é a hematológica, responsável pelo grande número de morbidade e mortalidade. A incidência de anemia aplástica (falta de todos os tipos celulares do sangue), da síndrome mieloplásica (SMD) e da leucemia mielóide aguda (LMA) é alta em portadores de AF. Ao nascimento, a contagem de células do sangue é geralmente normal e macrocitose é geralmente a primeira anomalia detectada, seguida de trombocitopenia (diminuição no número de plaquetas) e neutropenia (diminuição do número de neutrófilos). Pancitopenia está presente tipicamente em crianças com idades entre cinco e 10 anos, em média inicia-se aos sete anos. A pancitopenia é um quadro anômalo caracterizado pela alteração de duas a três linhagens celulares sanguíneas. Progressiva, torna-se fatal devido a infecções e hemorragias (Auerbach e Allen, 1991; Rosenberg *et al.*, 2004).

A síndrome mielodisplásica (termo descrito por Bennet *et al.*, (1982) ou mielodisplasia são desordens hematológicas de cronicidade variável e pouco definidas que evoluem para leucemias agudas. Pré-leucemia, termo introduzido por Block *et al.* (1953) para também caracterizar mielodisplasia, foi descrito por Linman *et al.* (1970) que encontrou pacientes com anemia que não tinham evidência de deficiência nutricional e que se apresentavam refratários ao tratamento com ferro.

De acordo com Butturini *et al.* (1994), os indivíduos que apresentam mielodisplasia são caracterizados pela presença de 5% a 30% de blastos mielóides na medula óssea e de 5% a 10% de blastos no sangue, enquanto indivíduos com LMA apresentam mais de 30% dos blastos na medula e mais de 20% no sangue.



Em estudo realizado por Alter *et al.* (2000), em pacientes com AF, 32% dos indivíduos analisados apresentavam SMD com quadro clínico caracterizado por pancitopenia e aumento no número de células da medula óssea.

De acordo com Stites *et al.* (2000) o termo leucemia é descrito como sendo uma neoplasia hematológica caracterizada pela presença de células malignas na medula óssea e no sangue. As leucemias mielogênicas iniciam-se pela produção cancerosa de células mielogênicas jovens na medula óssea as quais são disseminadas por todo o corpo (Guyton e Hall, 1998). Em pacientes com AF, a incidência cumulativa de leucemia está em torno de 10% em indivíduos portadores com até 25 anos de idade, de acordo com dados de Alter (2003) e de mais dois estudos (Kutler *et al.*, 2003 e Rosenberg *et al.*, 2003).

Schaison *et al.* (1983) acompanharam a evolução de 44 pacientes com AF entre 1962 e 1980, na França. A idade média de diagnóstico para AF foi de oito anos (mas podendo ser diagnosticada dos sete meses aos 29 anos) e a incidência de leucemia foi de 30% durante o período de acompanhamento dos pacientes (Rodriguez, 2003).

Auerbach e Allen (1991) analisaram todos os pacientes com AF do Registro Internacional da Anemia de Fanconi (IFAR) e constataram uma incidência de leucemia 15.000 vezes maior que a observada em crianças da população em geral. Um outro estudo com 388 pacientes com AF realizado por Butturini *et al.* (1994), permitiu calcular o verdadeiro risco para o desenvolvimento de anormalidades hematopoiéticas e morte devido a causas hematológicas até a idade de 40, sendo de 98% e 81%, respectivamente. Dos 388 pacientes, 85% desenvolveram anomalias hematológicas, sendo que as mais comuns foram a trombocitopenia isolada e a pancitopenia, as quais estavam associadas à diminuição no número de células da medula óssea em 75% dos casos estudados. O risco para pancitopenia foi de 84% até os 20 anos, seguido de anomalias citogenéticas clonais (risco de 67% até os 30 anos) (Rodriguez, 2003).

#### 1.2.4- Desenvolvimento de cânceres

Para os pacientes que atingem a idade adulta, existe um alto risco para o desenvolvimento de tumores sólidos, principalmente tumores hepáticos e carcinomas de

células escamosas de esôfago, orofaríngeo e da vulva (Alter, 1993; Alter, 1996; Lustig *et al.*, 1995).

Outros tipos de tumores menos encontrados são os adenocarcinomas do estômago, os tumores de mama, os meduloblastomas, os tumores de Wilms, os linfomas, os retinoblastomas e os osteossarcomas (Chadarévian *et al.*, 1985; Gibbons *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1981; Jacobs e Karabus, 1984; Levinson e Vicente, 1977; Van Niekerk *et al.*, 1987).

Um estudo com indivíduos do IFAR sugere a ocorrência de anemia aplástica precocemente em indivíduos portadores de anemia de fanconi (risco de 84% até 20 anos), seguido de anomalias citogenéticas clonais (risco de 67% até 30 anos) e mais tarde leucemia (risco de 52% para SMD e LMA até 40 anos de idade). Desenvolvimento de tumores hepáticos ocorre em 5% dos pacientes descritos na literatura (Rosenberg *et al.*, 2003; Alter, 1996).

Alguns estudos tiveram como objetivo a análise do risco de desenvolvimento de cânceres em parentes de pacientes com AF. Um desses trabalhos foi realizado por Swift *et al.* (1971), que analisaram 102 óbitos de parentes de casos de AF de oito famílias e encontraram uma alta proporção de leucemia e cânceres de língua e estômago. Entretanto, isto não foi estatisticamente significativo quando o estudo, realizado pelo mesmo grupo, foi ampliado para 25 famílias. Não encontraram um aumento significativo de cânceres, como também, casos de leucemia como esperado (Swift *et al.*, 1980).

Da mesma forma, Potter *et al.* (1983) estudaram 125 indivíduos de nove famílias e também apresentaram dados que comprova ser estatisticamente insignificante o risco de câncer para os parentes de indivíduos com AF.

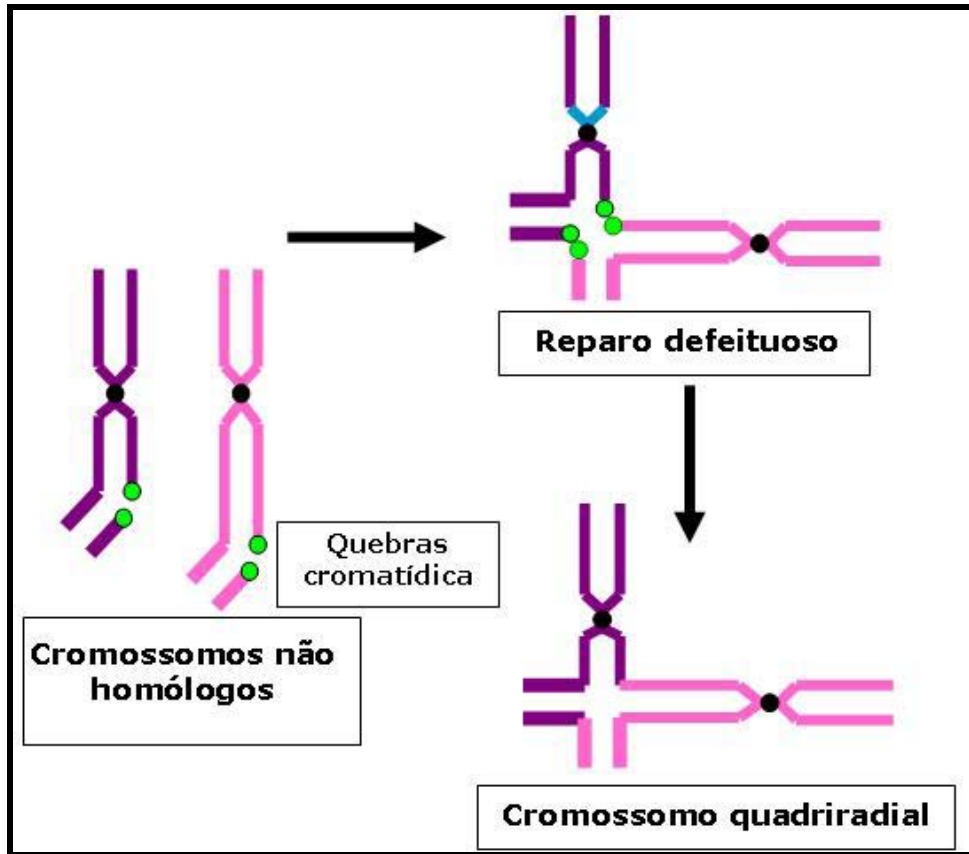
### **1.3- Fenótipo Celular**

A AF também é denominada de síndrome da instabilidade cromossômica. As células de pacientes com AF são caracterizadas por hipersensibilidade a agentes clastogênicos, como mitomicina C (MMC), diepoxibutano (DEB), ciclofosfamida e

cisplatina, dando origem a quebras cromossômicas. Essas quebras cromossômicas, descritas por Schroeder *et al.* (1964), são visíveis microscopicamente através da análise citogenética de metáfases, tornando, esta característica, base para um teste diagnóstico eficaz (Figura 3). Esse dano espontâneo do cromossomo está relacionado ao atraso no término da fase S ou G2 (pós-replicação) do ciclo celular. Quando as células desses pacientes são expostas, *in vitro*, a uma baixa dose de um agente clastogênico, como MMC, elas respondem notadamente por meio de quebras cromatídicas e intercâmbios cromatídicos, como quadrirradial, o que as diferenciam de células controles que respondem a este tratamento, mas em uma porcentagem muito menor (Magdalena, 1999) (Figura 4).



**Figura 3-** Alterações cromossômicas estruturais em indivíduos portadores. As setas indicam cromossomos quadrirradiais e trirradiais formados após as quebras cromossômicas. **Fonte:** Adaptado de *Lyakhovich A, and Surrallés J (2007)*.



**Figura 4-** Esquema representando as quebras cromatídicas entre cromossomos não homólogos.

No entanto, na AF, o intercâmbio cromatídico parece envolver pontos de ruptura entre cromossomos não homólogos. Já, na Síndrome de Bloom, o intercâmbio envolve preferencialmente cromossomos homólogos (Joenje e Patel, 2001; Tischkowitz, 2004). Até 50% das células de portadores de AF, quando estimuladas, apresentam de uma a três aberrações por célula. A instabilidade cromossômica espontânea, observada em células de indivíduos com AF, é diferente da observada em outras síndromes, embora se assemelhe àquelas presentes em células de portadores da Síndrome de Bloom (Joenje e Patel, 2001; Rodriguez, 2003).

#### 1.4- Testes Diagnósticos e Teste de Complementação

Não somente o teste molecular é realizado para diagnosticar AF. Auerbach *et al.*, (1981) desenvolveram um método citogenético para o diagnóstico dos pacientes com AF, o qual utiliza preparações de metáfases obtidas a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina e tratados com DEB. Esta técnica foi utilizada pela primeira vez em 1977.

Em 1984 foi fundado um laboratório de referência para a realização do teste citogenético com o DEB teste na Universidade Rockefeller, Nova York, EUA. De acordo com o IFAR, os homozigotos mutantes apresentam, em média, 8,96% de 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; Auerbach, 1995; Rodriguez, 2003).

Os portadores heterozigotos são assintomáticos e suas células não apresentam sensibilidade a fatores clastogênicos, dificultando assim o diagnóstico (Kutler *et al.*, 2003; Magdalena, 1999).

Apesar do DEB teste não detectar heterozigotos e de gerar resultados falso-negativos, ele ainda permanece como o principal método utilizado no diagnóstico da AF (Shimamura *et al.*, 2002).

Ainda em diagnóstico citogenético, para distinção entre portadores de AF e o grupo de doenças classificadas como anemia aplástica idiopática (características muito semelhantes à AF), Cervenka *et al.* (1981) utilizaram a MMC como substância clastogênica. 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 células de indivíduos saudáveis do grupo controle.

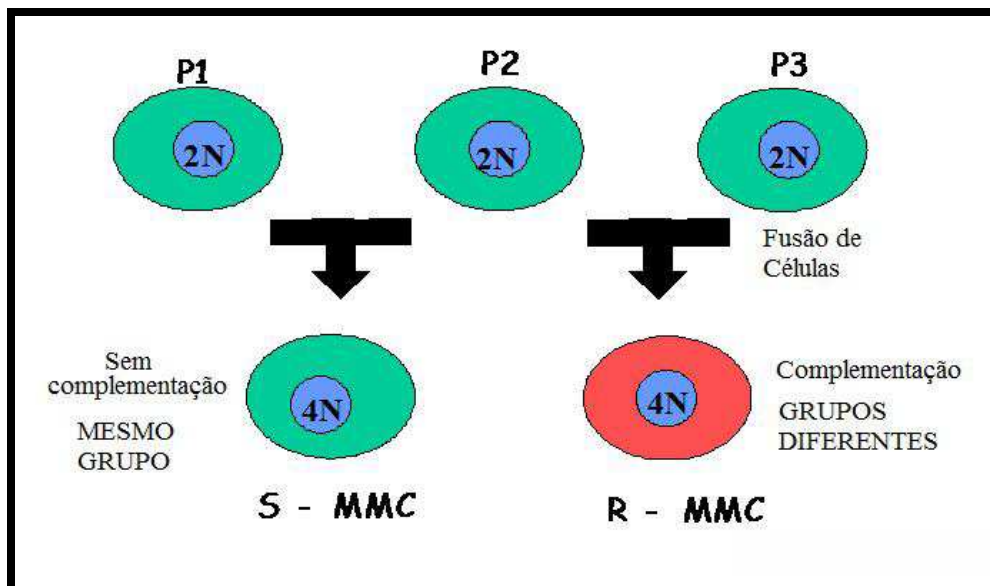
Um segundo teste relacionado à AF é o teste para análise do fenótipo celular denominado Teste de Complementação.

Complementação é definida como a habilidade das células de pacientes com fenótipos similares, devido a mutações em genes diferentes, de restabelecerem o fenótipo selvagem quando hibridizadas (Thompson *et al.*, 2002). No caso da avaliação da AF, o fenótipo celular avaliado e o da instabilidade à cultura com substâncias como DEB e MMC.

Yoshida (1980) fusionou fibroblastos de indivíduos normais e de pacientes afetados com AF e observou uma taxa elevada na correção das aberrações cromossômicas, tanto espontâneas quanto induzidas por MMC, ocorrendo, portanto, a correção do defeito celular.

Alguns pesquisadores utilizaram esta linha de raciocínio na realização da fusão de células de dois pacientes com AF e observaram que, quando linhagens celulares de linfoblastos de indivíduos não-consanguíneos são fundidas, são obtidas células híbridas que apresentam resistência ou não a substâncias clastogênicas, tais como MMC. Ocorrendo complementação do fenótipo, ou seja, surgimento de um híbrido 4n resistente a MMC, os indivíduos são pertencentes a grupos de complementação distintos. As células de indivíduos portadores que não se complementarem pertencem a um mesmo grupo de complementação. (Duckworth-rysiecki *et al.*, 1985; Joenje *et al.*, 1995; Joenje *et al.*, 1997; Zakrzewski e Sperling, 1980) (Figura 5).

Por meio do teste de complementação e conseqüente correção da hipersensibilidade aos agentes clastogênicos utilizados, foram descobertos 13 grupos de complementação distintos (**A**, MIM 607139; **B**, MIM 300515; **C**, MIM 227645; **D1**, MIM 605724; **D2**, MIM 227646; **E**, MIM 600901; **F**, MIM 603467; **G**, MIM 602956; **I**, MIM 609053; **J**, MIM 605882; **L**, MIM 608111; **M**, MIM 609644; e **N**, MIM 610355) (Levitus *et al.*, 2005; Meetei *et al.*, 2005).



**Figura 5-** Teste de Complementação utilizando células de três indivíduos com AF (P1, P2 e P3).

A fusão de P1 com P2 não corrigiu o fenótipo celular (sensibilidade à MMC), portanto são pertencentes ao mesmo grupo de complementação. Já no segundo caso (entre P2 e P3) ocorre correção, o produto protéico de uma célula substitui o ausente na outra após a formação do híbrido e vice-versa, indicando que os indivíduos são pertencentes ao mesmo grupo. S - sensível; R – resistente; MMC – Mitomicina C. **Fonte:** Adaptado de Joenje e Patel, 2001.

Em se tratando ainda de pesquisas relacionadas aos genes de AF., o IFAR, localizado na Universidade Rockefeller - Nova York - Estados Unidos, surgiu há vinte anos atrás com a finalidade de reunir informações genéticas e clínicas de pacientes com AF, permitindo o estudo amplo da história natural desta rara doença em um grande número de pacientes. Um total de 754 indivíduos apresentando DEB teste positivo foram registrados entre 1982 e 2004, não somente da América do Norte como também de países como Brasil, Índia e Turquia. Resultados de estudos a respeito das mutações no *FANCC* e *FANCA* foram anteriormente relatados em pacientes do IFAR. (Auerbach *et al.*, 2003; Gillio *et al.*, 1997; Kutler *et al.*, 2003; Verlander *et al.*, 1995).

De acordo com o IFAR, 65% dos pacientes no mundo pertencem ao grupo de complementação A, 15% ao grupo C e 8-10% ao grupo G (Meetei *et al.*, 2003a; Rutler *et al.*, 2003). A análise de 241 famílias classificadas pelo EFARP (European Fanconi Anaemia Research Programme), mostrou que a maioria de pacientes, cerca de 66%, pertenciam ao grupo de complementação A, seguidos por 9,5% e 8,7% dos grupos C e G, respectivamente (Figura 6).



**Figura 6-** Prevalência relativa dos onze grupos de complementação da AF.  
**Fonte:** Adaptado de Levitus *et al.*, 2004.

Mutações nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* acometem cerca de 85% dos casos diagnosticados, por isso a grande importância em estudá-los (Kutler *et al.*, 2003).

### 1.5- Genética e Anemia de Fanconi

Schroeder *et al.* (1976), analisando a segregação da AF em 90 famílias com membros portadores do distúrbio, estabeleceram o padrão de herança autossômico recessivo para esta doença e sugeriram a existência de uma heterogeneidade genética.



Com a descoberta de grupos de complementação distintos a próxima etapa seria a procura pelos genes envolvidos na doença.

Foram identificados, até o momento, 13 genes (*FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M e N*) nos grupos de complementação existentes, comprovando a grande heterogeneidade genética na AF (Savino *et al.*, 2003; Soulier *et al.*, 2005) (Tabela 1).

**Tabela 1-** Os 13 genes envolvidos na AF e identificados até o momento. (Adaptado de Wang e D'Andrea, 2004)

FA genes (synonyms)	Prevalence in FA patients (estimated percentage)	Chromosomal location	Protein size (kDa)	Protein features	Requirement for D2 ubiquitination	Conservation
FANCA	66%	16q24.3	163	Phosphorylated following DNA damage	+	Vertebrate
FANCB	~2%	Xp22.31	95	Contains nuclear localization sequence	+	Vertebrate
FANCC	10%	9q22.3	63	-	+	Vertebrate
FANCD1 (BRCA2)	~2%	13q12-13	380	Contains BRC repeats and an OB-fold DNA binding domain; regulates RAD51	-	Vertebrate, worm
FANCD2	~2%	3q25.3	155, 162	Monoubiquitylated and phosphorylated following DNA damage	+	Vertebrate, worm, insect, slime mould
FANCE	~2%	6p21-22	60	Binds FANCD2; phosphorylated by CHK1 following DNA damage	+	Vertebrate
FANCF	~2%	11p15	42	-	+	Vertebrate
FANCG (XRCC9)	9%	9p13	68	Contains TPR repeats; phosphorylated following DNA damage	+	Vertebrate
FANCI	~2%	15q25-26	140, 147	A partner for FANCD2; monoubiquitylated and phosphorylated following DNA damage	+	Vertebrate, worm, insect, slime mould
FANCI (BRIP1/ BACH1)	~2%	17q22-24	140	5'-to-3' DNA helicase; binds BRCA1; phosphorylated following DNA damage	-	Vertebrate, invertebrate, yeast
FANCL (PHF9)	<0.2%	2p16.1	43	PHD/ring-finger ubiquitin-ligase activity; contains WD40 repeats	+	Vertebrate, insect, slime mould
FANCM (Hef)	<0.2%	14q21.3	250	Contains helicase and endonuclease domains; phosphorylated following DNA damage	+	Vertebrate, invertebrate, yeast, archaea
FANCN (PALB2)	~2%	16p12.1	140	An essential partner for BRCA2 stability and nuclear localization	-	Vertebrate

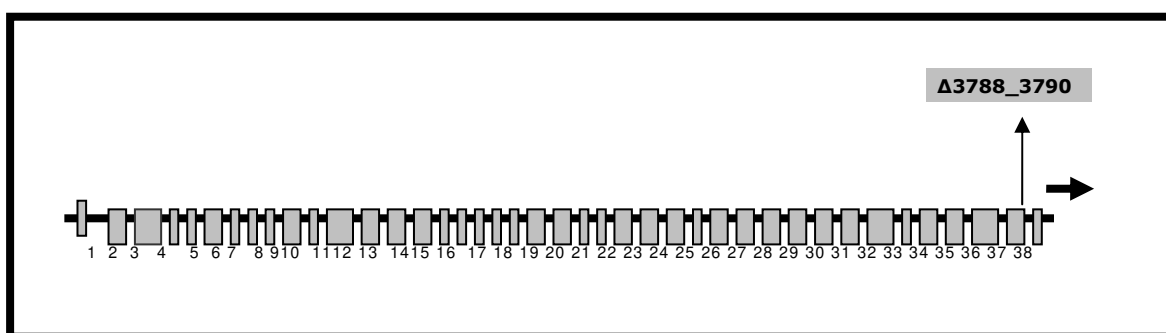
O gene *FANCA* apresenta mais de 100 mutações descritas e foi clonado por dois grupos de pesquisadores independentes (Apostolou *et al.*, 1996 e Lo Ten Foe *et al.*, 1996). Localiza-se no braço longo do cromossomo 19 região 24.3.

O transcrito *FANCA* tem 5.5 Kb e codifica uma proteína com 1455 aminoácidos, com uma massa molecular de 163 kD, que também não tem homologia significativa com outras proteínas. Consiste de 43 éxons que variam de 34 a 188 pb (Rodríguez, 2003) (Figura 7).

A mutação brasileira, “the common Brazilian mutation”, para *FANCA* é a  $\Delta 3788-3790$ . Em um estudo com 350 indivíduos, realizado por Levran *et al.* (1997), 10% deles apresentaram essa mutação.

No Brasil a mutação 3788-3790del foi encontrada em 30% dos pacientes analisados, ou seja, vinte de quatro em uma amostra de 80 pacientes não consanguíneos de todas as regiões do Brasil. O trabalho confirmou que dos 24 pacientes, treze (16,25%) eram homozigotos mutante e 11(13,75%) eram heterozigotos composto. Assim confirmando uma alta frequência da mutação 3788-3790del do gene *FANCA* em brasileiros (Magdalena *et al.*, 2005).

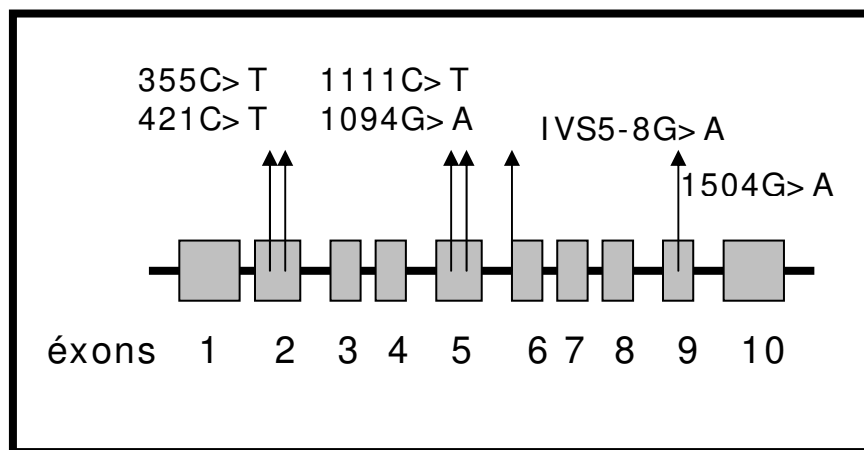
O estudo de correlação entre mutação e etnia foi feito com a população Africana, onde há uma alta incidência dessa doença. Quase todos os pacientes apresentavam a mesma mutação no gene *FANCA*, e esta alta frequência foi atribuída a um casal que imigrou para o sul da África no final do século XVII (efeito fundador) (Demuth *et al.*, 2000; Joenje e Patel, 2001; Tipping *et al.*, 2001).



**Figura 7-** Representação do gene *FANCA*.

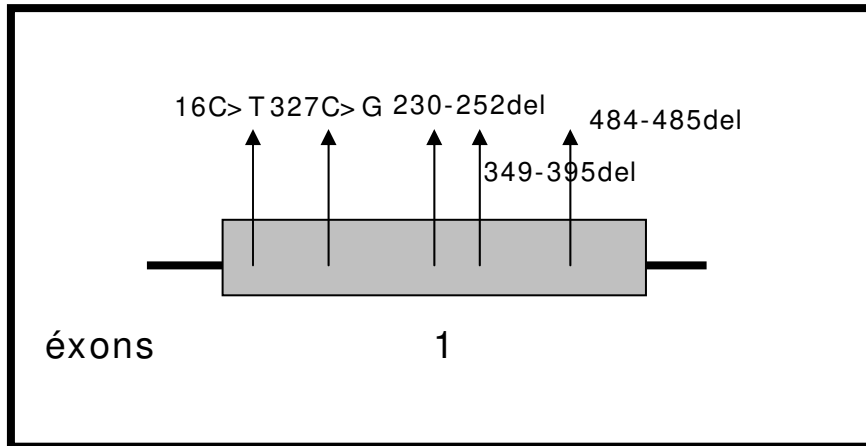
O gene *FANCE*, mapeado por Waisfisz *et al.* (1999), está localizado no braço curto do cromossomo 6, região 21.22. Esta região contém genes classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade, portanto é pouco provável que indivíduos pertencentes ao grupo E da AF tenha um parente não afetado compatível para um possível transplante medular. É constituído de 10 éxons e codifica uma proteína de 536 aminoácidos (de Winter *et al.*, 2000a) (Figura 8).

Foram relatadas sete mutações nesse gene.



**Figura 8-** Representação do gene *FANCE*.

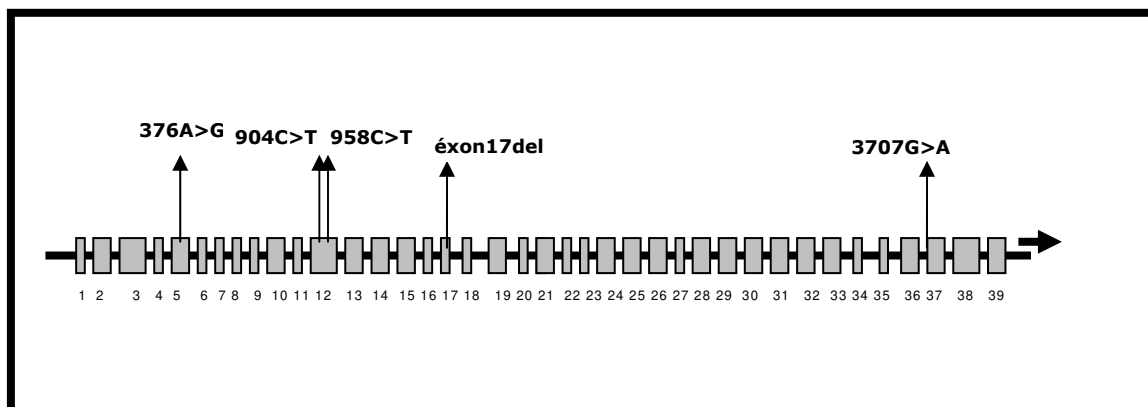
O gene *FANCF* foi descoberto por de Winter *et al.* (2000) e está localizado no braço curto do cromossomo 11, região 15. Codifica uma proteína de 374 aminoácidos a qual é homóloga a proteína procariótica de ligação a RNA denominada ROM (Figura 9).



**Figura 9-** Representação do gene *FANCF*.

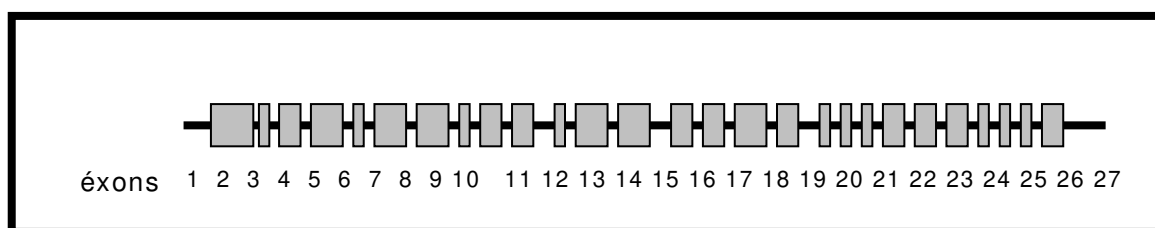
Mutações nos genes *FANCE* e *FANCF* acometem menos de 10% dos indivíduos portadores (Tischkowitz e Dokal, 2004).

O gene *FANCD2* foi mapeado por Whitney *et al.* (1995) e clonado por Timmers *et al.* (2001) e apresenta um papel chave na no reparo de DNA. O gene está localizado no braço curto do cromossomo 3 três na região 25.3. Apresenta 44 éxons (Figura 10).



**Figura 10-** Representação do gene *FANCD2*.

Estudo recente de Howlett *et al.* (2002) demonstrou ser o gene *FANCD1* idêntico ao *BRCA2*. A seqüência do *BRCA2* foi determinada em um paciente pertencente ao grupo D1 de complementação e mostrou a presença de duas mutações que levaram à formação de proteínas truncadas. O interessante é que homozigotos do gene *BRCA2* nunca foram descritos, com isso acredita-se que esta combinação seria letal. A confirmação de que o *FANCD1* é realmente o *BRCA2* foi realizada pela análise de complementação das células *FANCD1* com cDNA do gene *BRCA2*. O gene, de 27 éxons, está localizado em 13q12-13 e produz uma proteína de 384kD (Meetei *et al.*, 2003; Rodriguez, 2003; Stewart e Elledge, 2002; Van der Heijden *et al.*, 2003; Wang e D'Andrea, 2004) (Figura 11).



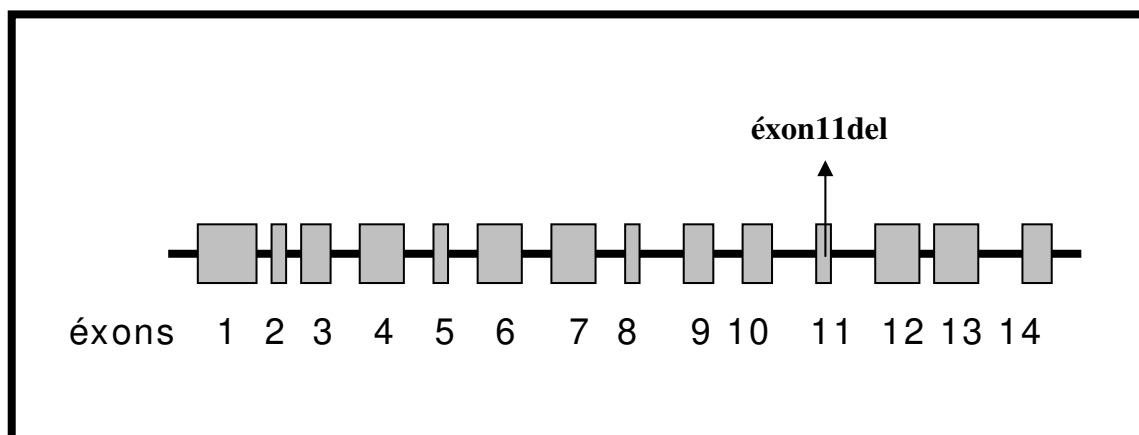
**Figura 11-** Representação do gene *FANCD1*.

*FANCI* foi o décimo terceiro gene a ser clonado e mapeado no cromossomo 15 na região 15q25-q26. O gene apresenta 38 éxons com a tradução se iniciando no segundo éxon. O transcrito do gene contém 1328 aminoácidos e massa molecular de 146kD.

Este gene apresenta similaridade de seqüência com o gene *FANCD2*, parecendo terem evoluído de um gene ancestral comum. Os transcritos de *FANCI* interagem com *FANCD2*, e juntos, como um complexo *FANCI-FANCD2*, se direcionam-se à cromatina em resposta a danos ao DNA. Do mesmo modo que *FANCD2*, o *FANCI* é monoubiquitinado, e a ubiquitinação de ambas as proteínas é essencial para a manutenção do complexo. Então uma mutação em *FANCI* é responsável pela perda de funcionalidade do ciclo da AF.

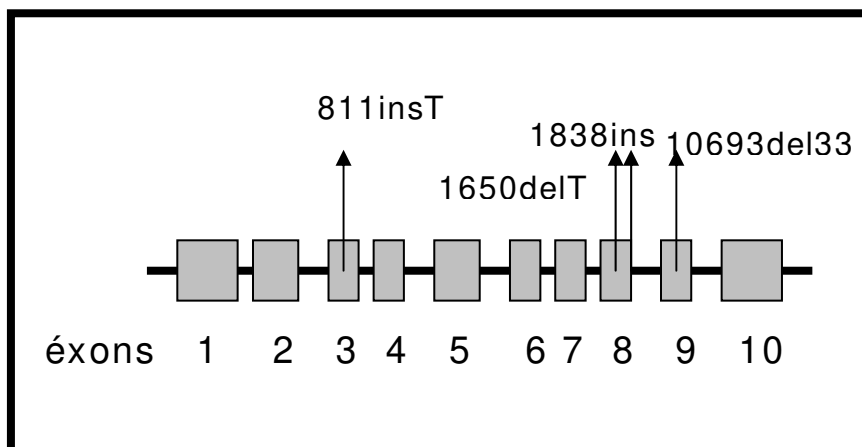
*FANCI*, denominado também de *BRIP1* e *BACH1*, foi descoberto por Levrin *et al.* (2005) e localiza-se em 17q22.24 e apresenta 20 éxons. A proteína *FANCI* liga-se diretamente à *BRCA1* que atua no reparo de DNA por recombinação homóloga (Levitus *et al.*, 2005).

O gene *FANCL* (ou *PHF9*), clonado por Meetei *et al.* (2003a), codifica a proteína FAAP43, que possui atividade E3 ubiquitina ligase *in vitro* e é essencial para a monoubiquinação de *FANCD2 in vivo*. Está localizado no braço curto do cromossomo 2, região 16.1 (Figura 12).



**Figura 12-** Representação do gene *FANCL*.

Descoberto em 2004 por Meetei *et al.*, o gene que codifica a proteína FAAP95, o gene *FANCB*, inesperadamente foi localizado no braço curto do cromossomo X, região 22.31 e está sujeito à inativação do cromossomo X. A herança ligada ao X tem importantes implicações no diagnóstico e aconselhamento genético para famílias nas quais somente homens são afetados com AF. Possui 10 éxons e apenas quatro mutações foram descritas (Figura 13).

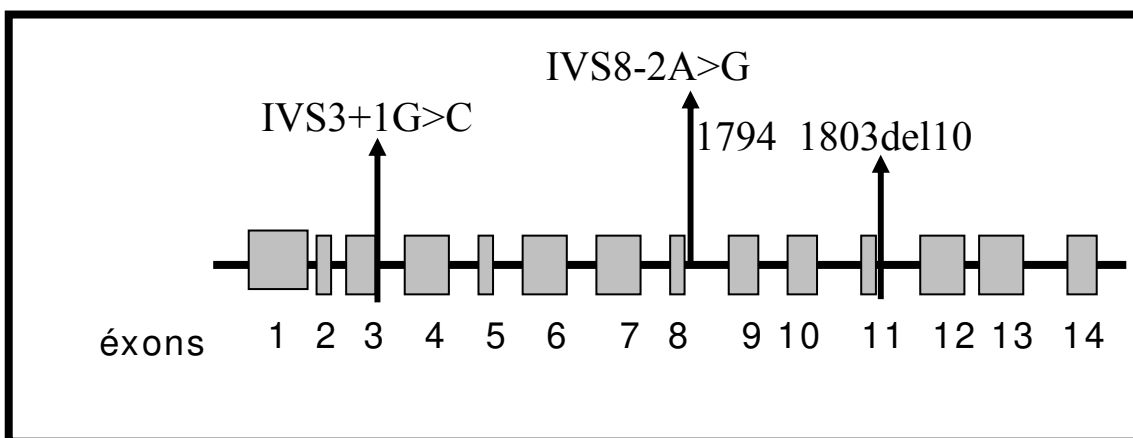


**Figura 13-** Representação do gene *FANCB*.

O gene *FANCM*, está localizado em 14q21.3 e é constituído de 11 éxons codificantes. Produz uma proteína, a FAAP250, de 142 KD e é raramente encontrado (Meetei *et al.*, 2005).

O gene responsável pelo grupo G, *FANCG* foi o terceiro a ser clonado por Saar *et al.* (1998) e foi descoberto, por de Winter *et al.* (1998), ser idêntico à seqüência cDNA no GenBank (AJ007669) para XRCC9 humano. O gene está localizado no braço curto do cromossomo nove, região 13 (9p13).

O gene tem 5,42Kb sendo 1869 bp codificantes que estão divididos em 14 éxons (Figura 14). A proteína codificada possui 622 aminoácidos, a qual não apresenta similaridade em sua seqüência com nenhuma outra proteína conhecida que pudesse revelar uma possível função molecular para FANCG/XRCC9 (Auerbach *et al.*, 2003; National Center For Biotechnology Information)



**Figura 14-** Representação da estrutura do gene *FANCG*. **Fonte:** Adaptado de Yagasaki *et al.*, 2003.

### 1.5- *FANCC*

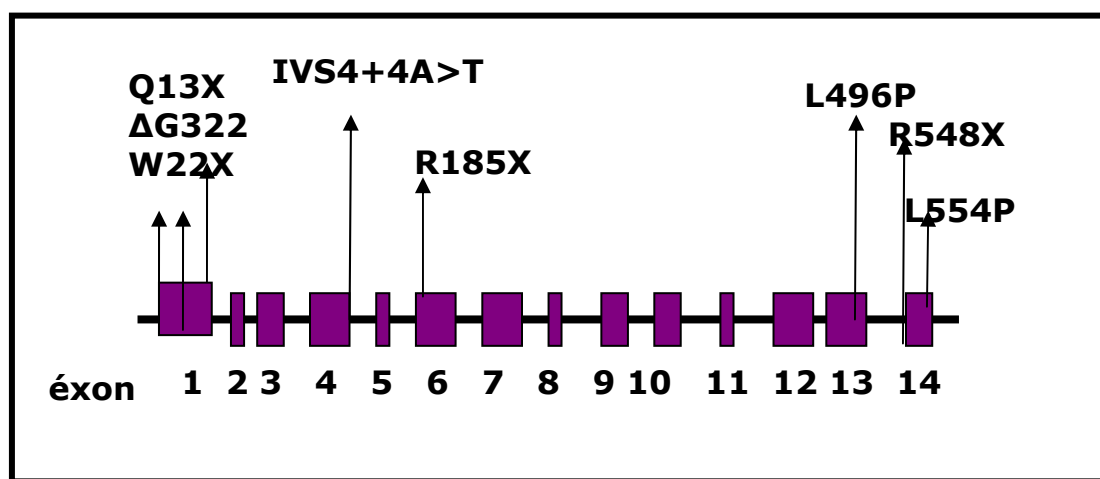
O gene *FANCC* foi o primeiro gene a ser clonado no ano de 1992 por Strathdee *et al.* e está localizado no braço curto do cromossomo 9, região 22.3. Apresenta 1.674 pb codificadores divididos em 14 éxons que apresentam de 53 a 201 pb de tamanho (Figura 15).

Esse gene codifica uma proteína de 63kD. Sua função não está totalmente estabelecida, mas acredita-se que esteja envolvida no reparo de DNA. Evidências demonstram que essa proteína localiza-se no citoplasma celular, mas que exerce importante função no núcleo, fato que está relacionado às teorias existentes de sua função em nível de reparo (Hoatlin, 1998; Rodriguez, 2003).

A mutação mais freqüente é a IVS4+4A>T a qual leva a uma alteração do sítio de splicing e conseqüente deleção do éxon 4. Essa mutação é particularmente prevalente em judeus *Ashkenazi* com uma freqüência de portadores de um em 89 e é caracterizada por um fenótipo grave com múltiplas anomalias congênitas e início precoce de distúrbios da medula óssea (Gillio *et al.*, 1997).

A segunda mutação mais prevalente é a  $\Delta G322$  que resulta em fenótipo leve. Essas duas mutações acometem cerca de 90% dos casos de AF do grupo C. Dentre as menos comuns estão W22X, e L554P (Verlander *et al.*, 1994; Yamashita *et al.*, 1996).

Yates *et al.* (2006), usando análise de complementação identificaram três novas mutações no gene *FANCC* em dois paciente brasileiros; uma inserção no éxon 4 (c.455\_456dupA), uma mutação de ponto no éxon 13 (c.1390C>T), e uma deleção no éxon 9. O estudo confirmou que os pacientes eram heterozigotos composto e que duas dessas mutações inativam a função da proteína *FANCC*.



**Figura 15-** Representação do gene *FANCC*.



A AF tem grande relevância médica em vista de suas graves conseqüências anátomo-funcionais. Por isso o reconhecimento de mutações no gene *FANCC*, é de grande utilidade para alcançar um diagnóstico detalhado e preciso ajudando no esclarecimento das possíveis e variadas etiologias da AF, colaborar com dados a respeito da incidência da doença no Brasil e auxiliar no aconselhamento a pacientes e familiares sobre prognóstico e possíveis intervenções terapêuticas. (As mutações identificadas estão na tabela 2).

**Tabela 2-** Mutações no gene *FANCC*.

Mutação	Local	Tipo de Mutação	Nomenclatura	Fonte
292 C>T	éxon 1	stop codon	Q13X	Verlander <i>et al.</i> Am J Hun Gen 54:595-601 (1994) Murer-Orlando <i>et al.</i> Lancet 342:686 (1993)
808C>T	éxon 6	stop codon	R185X	Gibson <i>et al.</i> Hum Mol Gen 2:797-799 (1993)
1742T>G	éxon 13	AA substitution	L496R	Gibson <i>et al.</i> Hum Mut 8:140-148
1897C>T	éxon 14	Stop codon	R548X	Murer-Orlando <i>et al.</i> Lancet 342:686 (1993)
322delG	éxon 1	Frameshift	322delG	Strathdee <i>et al.</i> Nature 356:763-767 (1992)
IVS4+4A>T	íntron 4	RNA splicing	IVS4+4A>T	Whitney <i>et al.</i> Nature Gen 4:202-205 (1993)
1916C>T	éxon 14	AA substitution	L554P	Strathdee <i>et al.</i> Nature Gen 1:196-198 (1992)
320G>A	Éxon 1	Stop Codon	W22X	Gibson et al. Hum Mut 8:140-148 (1996)

Análises de mutações em genes responsáveis pela AF têm sido realizadas por países ocidentais, de acordo com The Rockefeller University - Fanconi Anemia Database, sendo que a prevalência por um subgrupo, o tipo de mutação e até mesmo a gravidade do fenótipo dependem do grupo étnico a que os pacientes pertencem. Como citado anteriormente, a mutação *IVS4+4A>T* no gene *FANCC*, por exemplo, é altamente prevalente em judeus da população *Ashkenazi*. Interessantemente, essa mutação é a mais prevalente na população japonesa, mas o fenótipo é menos grave comparado aos

Ashkenazis, sugerindo que genes modificadores de uma raça específica ou fatores ambientais influem na gravidade do fenótipo (Tischkowitz e Hodgson, 2003).

No Brasil, em trabalho recente intitulado: “Estudo Molecular da Anemia de Fanconi” (RODRIGUEZ, 2003), pacientes foram triados através da análise clínica e posteriormente triados para a presença de mutações nos genes *FANCA* e *FANCC*. No entanto, a maioria dos pacientes (64%), apesar da clínica compatível, não apresentou mutações nestes genes. Considerando que mutações no gene *FANCC* acometem 15% dos portadores de AF no mundo e levando em consideração as conseqüências hematológicas prematuras, torna-se relevante a análise deste gene na população brasileira.

## **1.6- Função das Proteínas**

Em relação às proteínas codificadas pelos genes relatados, a ampla similaridade fenotípica entre os indivíduos dos diferentes grupos de complementação da AF leva a crer que, provavelmente, os seus produtos protéicos interajam em uma função comum (D’Andrea e Grompe, 2003).

Segundo Van de Vrugt (2002), a AF é classificada como um distúrbio de gene de housekeeping por causa de duas características da doença: as células em cultura de indivíduos com AF apresentam um aumento de aberrações cromossômicas espontâneas e são hipersensíveis a agentes clastogênicos como MMC. Os genes de manutenção estão envolvidos em reparar danos ao DNA e manter a integridade genômica.

De acordo com Reuter (2003), a hipótese funcional que surgiu por meio da análise do fenótipo clínico dos pacientes sugere que esses produtos protéicos estejam associados a cinco classes funcionais de proteínas: 1) responsáveis pela regulação da transcrição, 2) sinalização, 3) metabolismo oxidativo, 4) transporte intracelular e 5) apoptose. Por meio de um recente estudo realizado pelo mesmo grupo, cada uma das proteínas codificadas pelos respectivos genes interage com, no mínimo, uma classe.

Evidências recentes indicam que um complexo central e nuclear, composto por FANCA, B, C, E, F, G, I, M e, juntamente com FANCL, convertam FANCD2-S em FANCD2-L monoubiquitinizado. Isso é desencadeado pelo dano ao DNA. Recentes evidências sugerem que FANCL seja a principal E3 ubiquitina ligase que monoubiquitina FANCD2 antes de BRCA1/BARD1, como se acreditava anteriormente (Meetei, 2003a).

Embora as proteínas da AF formem um complexo, a sua função permanece desconhecida. Pesquisas são necessárias para determinar se o complexo atua diretamente detectando o dano do DNA, na reparação do mesmo ou na estabilização de estruturas cromossômicas (Tischkowitz e Dokal, 2004).

Nenhuma das proteínas do complexo apresenta um domínio catalítico óbvio, como também nenhuma atividade enzimática associada com o complexo está totalmente definida (D'Andrea e Grompe, 2003; van de Vrugt *et al.*, 2002).

A proteína FANCD2 é peça chave na ligação entre o complexo e as proteínas diretamente relacionadas ao reparo de DNA. Estudos iniciais indicam que FANCD2 existe em duas isoformas: FANCD2-S (produto primário de tradução) e FANCD2-L (isoforma monoubiquilada). Importante dizer que a isoforma FANCD2-L é observada somente em células de indivíduos normais ou células de indivíduos com AF que são resistentes a MMC. Este achado indica que o complexo nuclear e as outras subunidades protéicas são necessários para a conversão de FANCD2-S para FANCD2-L (D'Andrea e Grompe, 2003; Timmers *et al.*, 2001).

Análise de espectrometria de massa mostrou que a monoubiquinação de FANCD2 dá-se na lisina 561 (lis561) (K61). Esta lisina é conservada em muitas proteínas FANCD2 eucarióticas, por exemplo, em *A. thaliana*, *C. elegans* e *Drosophila*, o que indica que este aminoácido apresenta função crucial para o funcionamento apropriado da proteína (Timmers *et al.*, 2001).

Mutações de lisina para arginina neste resíduo abalam a monoubiquitinação, indicando que outros resíduos de lisina na proteína não podem servir como substitutos para ligação da ubiquitina (D'Andrea e Grompe, 2003; Timmers *et al.*, 2001).

A proteína FANCD2 está presente em três vias: na primeira delas, o complexo nuclear, juntamente com FANCL, provoca a conversão de FANCD2S em FANCD2L. Essa, por sua vez, ativa as proteínas que diretamente atuam no reparo de DNA por recombinação homóloga. São elas: BRCA1, com FANCI, BRCA2/FANCD1 e RAD51. Na segunda via, a proteína FANCD2 interage independentemente com ATM/ATR. Mutações na proteína ATM, codificada pelo gene Ataxia Telangiectasia Mutated, causa o distúrbio autossômico recessivo denominado Ataxia Telangiectasia que, como na AF resulta em quebras cromossômicas espontâneas e cânceres hematológicos. Diferentemente da AF, os pacientes AT apresentam imunodeficiência e degeneração neural cerebelar. A proteína ATM é responsável pela fosforilação de FANCD2S, a qual atua diretamente no ponto de checagem da fase S do ciclo celular. Na terceira e última via, a proteína ATM, ativada em resposta ao dano do DNA induzido por radiação ionizante, ativa a proteína NBS responsável pela fosforilação de FANCD2S, a qual atua sobre o complexo MRE11 e RAD50, proteínas responsáveis pelo ponto de checagem da fase S do ciclo celular (Couzin, 2003; D'Andrea e Grompe, 2003; Meetei *et al.*, 2004; Nakanish *et al.*, 2002; Taniguch *et al.*, 2002; Wang e D'Andrea, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

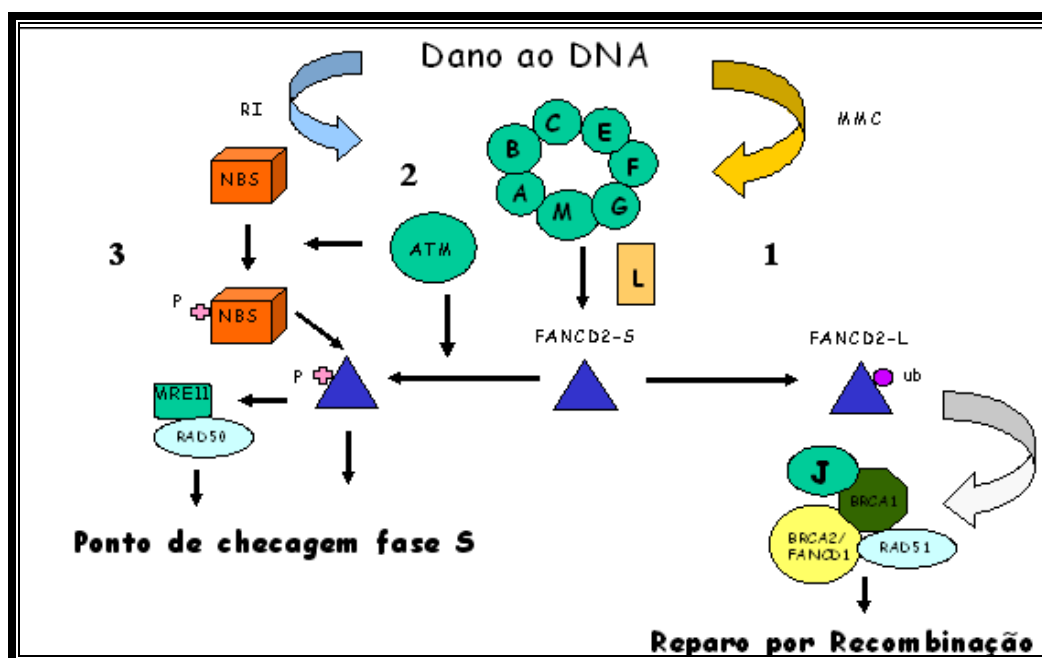
A síndrome de Nijmegen (NBS) é outro distúrbio autossômico recessivo. Similar a AT é caracterizada por imunodeficiência e predisposição a linfoma. Uma quantidade significativa de pacientes apresenta fenótipo semelhante à AF, como exemplo, progressiva falha da medula óssea (MO) e LMA (D'Andrea e Grompe, 2003).

Em resumo, FANCD2 está relacionada a três vias: 1) as proteínas da AF formadoras do complexo nuclear são responsáveis pela monoubiquitinação de FANCD2 que atuam sobre proteínas do reparo; 2) em resposta à radiação ionizante, ATM/ATR fosforila NBS1 levando a fosforilação de FANCD2 que por sua vez promove a ativação do ponto de checagem da fase S do ciclo celular, enquanto 3) em resposta a MMC, a NSB1 reúne-se em um mesmo *foci* nuclear com MRE11/RAD50 e FANCD2 (Venkitaraman, 2003).

A descoberta de que *FANCD1* é, de fato, *BRCA2* indica que os passos envolvidos na susceptibilidade ao câncer de mama e AF são interconectados em mais de um nível (D'Andrea e Grompe, 2003; Witt e Ashworth, 2002).

Estudos mostraram que o complexo AF interage também com o complexo BLM/BRAFT; o gene *BLM* é mutado na síndrome de Bloom, a qual apresenta similaridades com AF e é possível que estes complexos atuem em conjunto no processo de correção do dano do DNA (Meetei *et al.*, 2003b).

Embora existam várias hipóteses em relação aos passos bioquímicos nos quais atuam as proteínas envolvidas com AF, provavelmente estes modelos são muito simplificados. Novas hipóteses alternativas têm sido propostas, onde AF e as proteínas relacionadas trabalham em uma rede de processos e não como simplesmente uma seqüência linear de eventos na proteção contra aberrações cromossômicas estruturais (Venkitaraman, 2004).



**Figura 16-** Representação das três (1, 2 e 3) vias relacionadas às proteínas da AF. A proteína FANCD2 é fundamental no processo de reparo do DNA. Fonte: Nakanishi *et al.*, 2004; Tischkowitz, 2004

## 1.7- Terapêutica e Perspectivas para o Futuro

A conduta médica a ser tomada depende da idade de apresentação dos primeiros sintomas e presença ou ausência de anomalias hematológicas.

Inicialmente os indivíduos devem realizar ultrassom do trato renal, testes auditivos e avaliação hematológica que deve incluir avaliação da MO. É importante a tipagem de imunohistocompatibilidade (HLA) em antecipação a um possível transplante de medula.

Avaliação endocrinológica deve ser realizada, principalmente, se existir evidência de retardo de crescimento, como também, avaliação oftalmológica. Cirurgias corretivas realizadas para defeitos nos polegares e radiais com o intuito de aumentar a função e melhorar a estética.

Caso não existam distúrbios hematológicos no momento do diagnóstico, um monitoramento deve ser exigido uma vez por ano, pois à medida que indivíduos tornam-se mais velhos, complicações hematológicas surgem.

Muitos pacientes que desenvolvem inicialmente falhas na medula óssea respondem a medidas de suportes como transfusões sanguíneas, androgênios e citocinas. Os androgênios são usados terapeuticamente, pois eles aumentam a produção e secreção urinária de eritropoietina acarretando em aumento da produção celular pela medula óssea.

Eventualmente muitos pacientes recorrem a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCH) (Tischkowitz e Hodgson, 2003). Este é o único tratamento curativo para restaurar a hematopoiese e prevenir a ocorrência de leucemia. Gluckman *et al.* (1989) foram os pioneiros na realização do TCH em uma criança com AF.

Em trabalho recente, Bielorai *et al.* (2004) realizaram um diagnóstico pré-implantação para identificação da mutação e escolha do embrião saudável. Este seria histocompatível para realização de um transplante de células de cordão umbilical para um indivíduo portador. Por isso a importância do estudo das mutações no gene FANCC.

A AF é uma doença candidata à terapia gênica em vista das sérias complicações hematológicas. Existem tentativas com sucesso utilizando transferência gênica mediada por retrovírus em camundongo knockout *FANCC* levando a correção do fenótipo celular (Gush *et al.*, 2000; Tischkowitz e Hodgson, 2003, Liu *et al.*, 1999, Galimi *et al.*, 2002).

## **2- OBJETIVOS**



## 2.1- Objetivo Geral

- Estudar as mutações do gene *FANCC* em pacientes com quadro clínico de AF na região de Campinas.

## 2.2- Objetivos Específicos

- Investigar a ocorrência das mutações IVS4+4A>T,  $\Delta$ G322, Q13X, W22X, R185X, L496R, L554P, e R548X no gene *FANCC* em pacientes com suspeita clínica de AF.
- Triar mutações no gene *FANCC*, por meio da técnica SSCP, em pacientes que apresentarem mutações em apenas um alelo.

### **3- CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **3.1- Casuística**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Unicamp, parecer sob número 364/2005 (anexo 4 ).

Foram analisados 121 indivíduos com suspeita clínica de AF, escolhidos através de uma triagem realizada nos Ambulatórios de Genética Médica do Hospital das Clínicas/UNICAMP, nos ambulatórios de Hematologia e casos que foram enviados por diversos hematologistas da região de Campinas. A análise citogenética por meio da cultura de linfócitos com o agente clastogênico DEB, foi realizada pelo Laboratório de Citogenética do Hemocentro, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Sílvia Passos Lima.

### **3.2- Critérios de Inclusão**

Os indivíduos que compuseram a amostra apresentaram quadro clínico compatível com o distúrbio e DEB teste positivo, bem como concordaram em participar da pesquisa via assinatura de um termo de consentimento. Os sujeitos que apresentaram DEB teste negativo e/ou se recusaram a participar foram excluídos da pesquisa.

### **3.3- Métodos**

Os métodos utilizados para a realização do trabalho foram:

- 1- cultura de linfócitos com agente clastogênico (DEB), realizado pelo Laboratório de Citogenética do Hemocentro e;
- 2 - análise molecular por PCR (SAIKI *et al.*, 1989) associada à digestão enzimática.
- 3 - nos casos nos quais foi encontrado apenas um alelo mutante, realizamos uma triagem por meio das técnicas de SSCP.

### 3.3.1- Extração de DNA de Leucócitos Periféricos utilizando-se LICL (CLORETO DE LÍTIUM) e Proteinase K

Foram retirados assepticamente 5mL de sangue venoso de cada um dos pacientes, preparadas as alíquotas e a extração de DNA realizada de acordo com protocolo descrito por WOODHEAD *et al.*, 1986 (ANEXO 2).

### 3.3.2- Amplificação Gênica (PCR) e Digestão Enzimática

A técnica de reação em cadeia da polimerase (denominada de PCR, abreviatura do nome em inglês, “Polymerase Chain Reaction” descrita por SAIKI *et al.*, 1989), possibilita a amplificação de uma pequena seqüência de DNA através do uso de dois iniciadores (“primer”) que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada, onde se hibridizam devido à complementaridade de bases de suas seqüências. A amostra de DNA é misturada em uma solução com os iniciadores e, logo em seguida, são realizados, em um aparelho termociclador, repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA, anelamento dos iniciadores em temperaturas adequadas e a extensão dos iniciadores promovida pela enzima *Taq DNA polimerase*, levando ao acúmulo exponencial da seqüência de DNA alvo.

A reação da PCR para análise das mutações foi realizada em volume total de 50 µL, com a seguinte composição de reagentes: 36,5 µL água de injeção; 5,0 µL tampão 10x; 2,0 µL MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 2,5 µL dNTP 1,25 mM; 1,0 µL primer forward 5 pmol e 1,0 µL primer reverse 5 pmol, 3,0 µL de *Taq DNA polimerase* e 1,0 µL de DNA genômico. A reação de amplificação para as mutações foi realizada em aparelho termociclador e consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56-61°C por 1 minuto, dependendo do primer utilizado, 72°C durante 1 minuto e, no final, 72°C por 5 minutos de extensão.

As mutações e temperaturas de anelamento utilizadas para análise estão descritas na tabela 3:

**Tabela 3-** Relação de mutações com respectivas enzimas utilizadas para a digestão enzimática e fragmento para análise.

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

**Fonte:** Adaptado de GIBSON *et al.*, 1996.

Para detecção da mutação *IVS4+4A>T* utilizamos análise dos fragmentos de restrição, em gel, obtidos pela enzima ScaI (Tabela 3). Houve a amplificação de um fragmento de 131 pb. A enzima Sca I reconhece o sítio (AGTACT) no íntron quatro. A mutação cria um sítio de restrição. Depois da digestão, um indivíduo normal apresentará uma banda visível de 108 pb e outra de 23pb. Um homocigoto mutante terá uma única banda de 131 pb e, um heterocigoto, o qual apresenta um alelo normal e o outro mutante, as três bandas.

A reação de digestão consistiu em adicionar 1 µL de enzima Sca I, diretamente ao tubo de PCR. Após incubação a 37°C por 16 horas o resultado da digestão foi avaliado em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

Para análise da mutação ΔG322 utilizamos somente a enzima Bsp1286 I que reconhece um sítio de restrição na sequência normal. O amplificado após a PCR apresenta 151 pb. Após a digestão um indivíduo normal apresentará bandas de 128 e 22 pb visíveis no gel. Um indivíduo afetado apresenta uma banda única de 151pb e um heterocigoto as bandas de 22, 128 e 151 pb. Importante ressaltar que o fragmento de 22 pb, por ser muito pequeno, não aparece no gel após a eletroforese. A reação de digestão consistiu em adicionar 1 µL de enzima Bsp1286 I, diretamente ao tubo de PCR. Após incubação a 37°C por 16 horas o resultado da digestão foi avaliado em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

Para análise da mutação Q13X utilizamos a mesma técnica descrita anteriormente, porém utilizando a enzima Bcl I para clivagem do DNA (Tabela 3). A enzima reconhece um sítio de restrição na sequência normal. O amplificado após a PCR apresenta 250 pb. Após a digestão um indivíduo normal apresentará bandas de 227 e 23 pb visíveis no gel. Um indivíduo afetado apresenta uma banda única de 250 pb e um heterozigoto as bandas de 23, 227 e 250 pb. Importante ressaltar que o fragmento de 23 pb, por ser muito pequeno, não aparece no gel após a eletroforese.

Na reação de digestão foi adicionado 1µL da enzima Bcl I diretamente ao tubo de PCR. Após incubação por 16 horas a 37°C o resultado foi avaliado em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

Utilizamos a enzima Fok I para detecção da mutação W22X (Tabela3). A reação de digestão consistiu em adicionar 1 µL de enzima Fok I, diretamente ao tubo de PCR. Após incubação a 37°C por 16 horas o resultado da digestão foi avaliado em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. Houve a amplificação de um fragmento de 221 pb. O indivíduo que apresenta os dois alelos com a mutação apresentará duas bandas visíveis no gel, 187, 17 e 17 pb. O heterozigoto três bandas, 204, 187 e 17. O indivíduo normal uma banda de 204 e outra 17 p

Utilizamos a enzima Fok I para detecção da mutação R548X (Tabela3). A reação de digestão consistiu em adicionar 1 µL de enzima Ava I, diretamente ao tubo de PCR. Após incubação a 37°C por 16 horas o resultado da digestão foi avaliado em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. Houve a amplificação de um fragmento de 364 pb. O indivíduo que apresenta os dois alelos com a mutação apresentará uma banda visível no gel, 364pb. O heterozigoto três bandas, 364, 231 e 133. O indivíduo normal duas bandas de 231 e outra 133 pb.

Para análise da mutação L554P utilizamos a mesma técnica descrita anteriormente, porém utilizando a enzima Bbv I para clivagem do DNA (Tabela 3). A enzima reconhece um sítio de restrição na sequência normal. O amplificado após a PCR apresenta 364 pb. Após a digestão um indivíduo normal apresentará bandas de 260pb e 104pb visíveis no gel. Um indivíduo afetado apresenta uma banda única de 364 pb e um heterozigoto as bandas de 364, 260 e 104 pb.

Para análise da mutação L496R utilizamos somente a enzima Hha I que adiciona um sítio de restrição na sequência normal. O amplificado após a PCR apresenta 303 pb. Após a digestão um indivíduo normal apresentará uma banda de 303pb visível no gel. Um indivíduo afetado apresenta duas bandas uma de 218 e 85 pb e um heterozigoto as bandas de 303, 218 e 85 pb. A reação de digestão consistiu em adicionar 1 µL de enzima Bsp1286 I, diretamente ao tubo de PCR. Após incubação a 37°C por 16 horas o resultado da digestão foi avaliado em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

Para detecção da mutação R185X utilizamos análise dos fragmentos de restrição, em gel, obtidos pela enzima Nla III (Tabela 3). Houve a amplificação de um fragmento de 122 pb.. A mutação elimina o sítio de restrição. Depois da digestão, um indivíduo normal apresentará duas bandas uma de 105 e outra de 17pb mas apenas uma é visível de 105 pb. Um homozigoto para a mutação apresentará três bandas uma de 74, uma de 31 e outra de 17pb e, um heterozigoto, o qual apresenta um alelo normal e o outro mutante, quatro bandas.

A reação de digestão consistiu em adicionar 1 µL de enzima Nla I, diretamente ao tubo de PCR. Após incubação a 37°C por 16 horas o resultado da digestão foi avaliado em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio.

### 3.3.3- *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*

Após análise das principais mutações por digestão enzimática, os pacientes que apresentaram alteração em um alelo foram triados por *Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)* que permite a detecção de mutações por análise do polimorfismo de conformação da fita simples. Esta técnica baseia-se no fato de que moléculas de DNA de fita simples quando submetidas a eletroforese em gel não-desnaturante têm seu padrão de migração influenciado pela sua sequência de bases e por interações intramoleculares entre as mesmas. Desta forma, qualquer diferença na sequência de nucleotídeos resultará em uma alteração de mobilidade da banda no gel.

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR (Tabela 4) foram desnaturados por aquecimento a 95°C durante um período de 5 minutos, em seguida são imediatamente transferidos para o gelo e submetidos à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 6% acrescido de 5% de glicerol. A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente. O padrão das bandas foi detectado por coloração com prata.

**Tabela 4-** Primers dos 14 éxons do gene *FANCC* utilizados na amplificação dos fragmentos para SSCP e tamanhos em pb.

<i>ÉXON</i>	<i>Seqüência dos Primers (5' =&gt; 3')</i>	<i>Produto da PCR (pb)</i>
1	F: ACCATTCCTTCAGTGCTGG R: ACCACAAGTCCCGATTCTGGG	326
2	F: CCCTCAATCTATAATGTCAG R: GTAAGCCTCTGTGAAACAATG	232
3	F: TAGTAGTTTGAGATTTTCC R: GCAGCACTTTTAAATAATC	254
4	F: GTAGGCATGTACATAAAAG R: TGGCACATTCAGCATTAAAC	234
5	F: CTGATGTAATCCTGTTTGCAG R: CCTCTCATAACCAAACTGATAC	184
6	F: GTCCTTAATTATGCATGGCTC R: CAACACACCACAGCCTTCTAAG	289
7	F: TTTTCAGTGAGCCATTCTG R: AAATGAGTCCAAGCATGTCC	265
8	F: CTCCTTTGGCTGATAATAGC R: CCCATGATACAGCCAGAGAC	232
9	F: TTTCCCTTATACAGTGCCAGG R: GTGCTCTTGTCAAAATACTC	253
10	F: TTCCTGACCCCGTTTCAATC R: TTGACAATGCTCTTCCCAGG	193
11	F: GTGAACCAGAAGTAAAGGGC R: AGGATCTAGGGAAACCATG	255
12	F: CCCAAAGGAAGAAGAATTTAG R: CCTCTCCTTGCTCCTCTCAG	297
13	F: CCTAGAAGTATGTCTGTCTG R: CTCTCCTTGACTAGGATGCTG	303
14	F: GGATAGGGCTTCTTTCAGGG R: TCCCAAGATGTGTACAGCTC	392

**Fonte:** Adaptado de GIBSON, *et al.*, 1996 e MAGDALENA, 1999.



### 3.3.4- Coloração de Prata

A coloração com prata para detecção das bandas após eletroforese na técnica de SSCP apresenta quatro etapas. Na primeira são utilizados ácido acético e álcool etílico cuja função é impedir a difusão das amostras no gel. Na segunda utilizamos ácido nítrico para eliminação dos álcalis, tornando o meio ácido. Na terceira etapa nitrato de prata, tiosulfato de sódio e formaldeído são adicionados sobre a placa. Os íons prata interagem com os grupos fosfatos do DNA, promovendo deposição da prata metálica que confere à amostra uma coloração negra. Pelo fato da reação ocorrer em meio básico, na quarta etapa utilizamos carbonato de sódio que possui a função de eliminar os íons  $H^+$  do meio (anexo 3).

**4- RESULTADOS**

Na amostra de 121 pacientes analisados com quadro clínico de AF na região de Campinas no gene *FANCC*, encontramos 14% de indivíduos heterozigotos e 4% de indivíduos homozigotos para as mutações mais freqüentes do gene *FANCC*. As mutações mais prevalentes foram a mutação IVS4+4A>T com 6,6% dos alelos analisados, a mutação delG322 com 2.47% dos cromossomos analisados e a mutação Q13X com 1.23% dos cromossomos analisados. Na triagem de mutações pela técnica de SSCP, encontramos alterações nos éxons um, quatro, e seis.

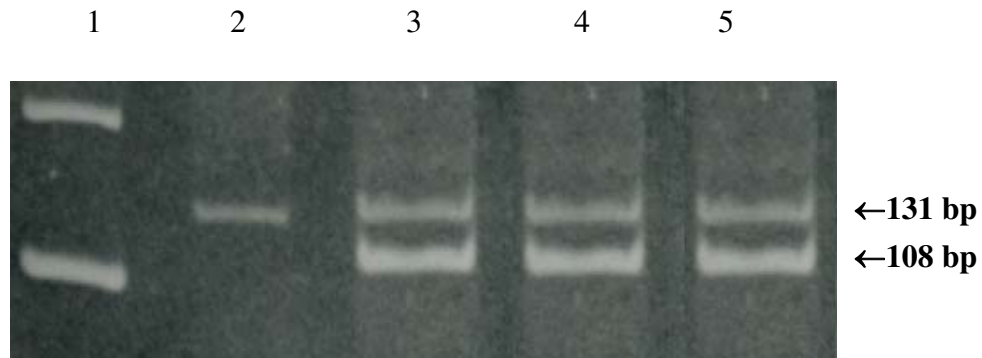
#### 4.1- Mutação IVS4+4A>T

Dos 121 indivíduos analisados três apresentaram homozigose e dez heterozigose para esta mutação (Figuras 17 e 18).



**Figura 17-** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da mutação IVS4+4A>T.

Coluna 1 Marcador de 50pb. Coluna 2 amplificado não digerido e de 3 a 6 indivíduos homozigotos normais para a mutação.

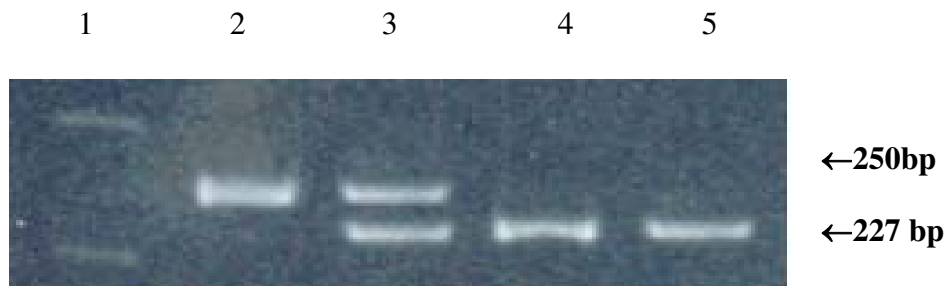


**Figura 18-** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da mutação IVS4+4A>T.

Coluna -1: Marcador de 100 pb. Coluna 2 amplificado não digerido, 3, 4 e 5 heterozigoto

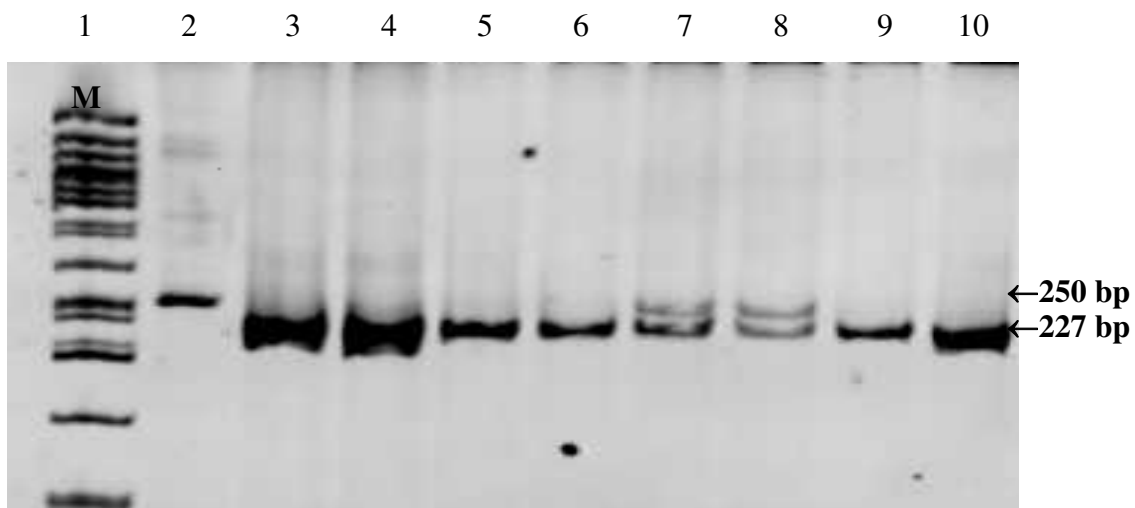
#### 4.2- Mutação Q13X

Na mutação Q13X, o fragmento amplificado por meio da PCR apresenta 250pb. Após digestão com a enzima Bcl I, o fragmento normal é clivado, formando dois fragmentos, um de 227 pb e outro de 23pb. Dos 121 indivíduos analisados, apenas três apresentaram a mutação em heterozigose. (figuras: 19 e 20).



**Figura 19-** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% para a mutação Q13X.

Coluna 1 Marcador de 50pb. Coluna 2 amplificado não digerido. Coluna-3 heterozigoto. Coluna 4 e 5 Indivíduos homozigotos normais para a mutação.

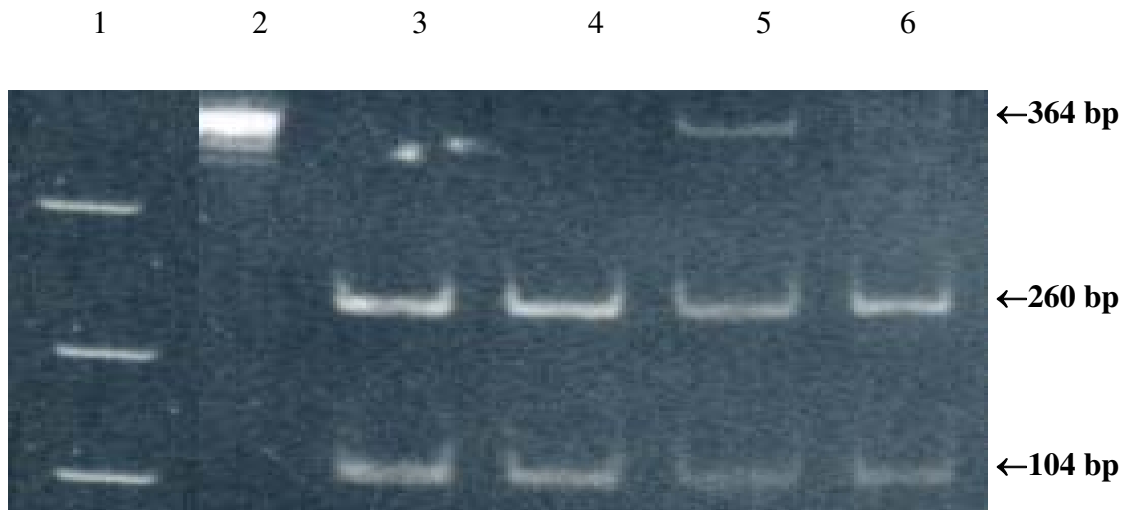


**Figura 20-** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% da mutação Q13X.

Coluna 1 Marcador de 50 pb. Coluna 2 amplificado não digerido e de 3 a 6 e 9 e 10 indivíduos homozigotos normais e na coluna 7 e 8 indivíduos heterozigotos.

#### **4.3- Mutação L554P**

Nessa mutação o fragmento amplificado apresenta 364 pb e após digestão com a enzima BbvI, o fragmento normal é clivado, formando dois fragmentos, um de 260 pb e outro de 104 pb. Dos 121 indivíduos analisados, apenas um paciente apresentou a mutação em heterozigose.

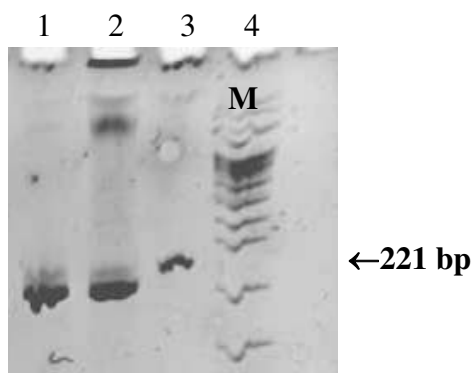


**Figura 21-** Eletroforese gel de Poliacrilamida 12% da mutação L554P.

Coluna 1 – Marcador de 100 pb. Coluna 2 - controle não digerido, coluna 3, 4 e 6 indivíduos sem a mutação Coluna 5 – heterozigoto para a L554P.

#### 4.4- Mutação W22X

Após a amplificação de um fragmento de 221 pb foi realizada a digestão enzimática para a mutação W22X utilizando a enzima FokI. Na digestão os indivíduos normais são caracterizados pela presença dos fragmentos 204 e 17pb enquanto os indivíduos mutados pelos fragmentos de 187, 17 e 17 pb. Dos 121 indivíduos analisados, nenhum apresentou a mutação W22X.

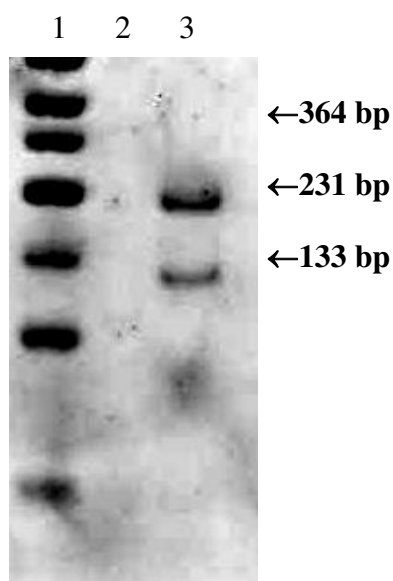


**Figura 22-** Digestão da mutação W22X.

Coluna 1 e 2 – indivíduos sem a mutação. Coluna 3 - controle não digerido. Coluna 4 – Marcador de 50pb

#### 4.5- Mutação R548X

Na mutação R548X o amplificado apresenta 364 pb, após a digestão enzimática com a enzima *Ava*I, ocorre a clivagem e resulta em dois fragmentos, um com 231 pb e outro de 133 pb. Para esta mutação também não encontramos nenhum indivíduo portador.

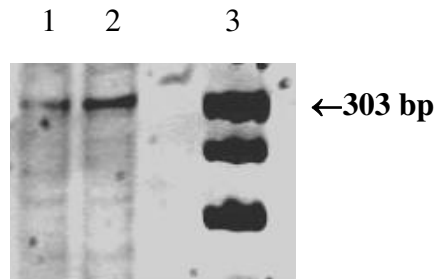


**Figura 23-** Digestão da mutação R548X.

Coluna 1 marcador de 50 pb. Coluna 3 – Indivíduo sem a mutação. Não foi colocado o controle não digerido.

#### 4.6- Mutação L496R

Outra alteração analisada foi a mutação L496R que adiciona um sítio de restrição na posição 218 de um fragmento de 303pb. Portanto após digestão enzimática os indivíduos negativos para a mutação apresentam um fragmento de 303 pb e indivíduos mutantes fragmentos de 218 e 85 pb. Nessa análise encontramos um paciente heterozigoto.

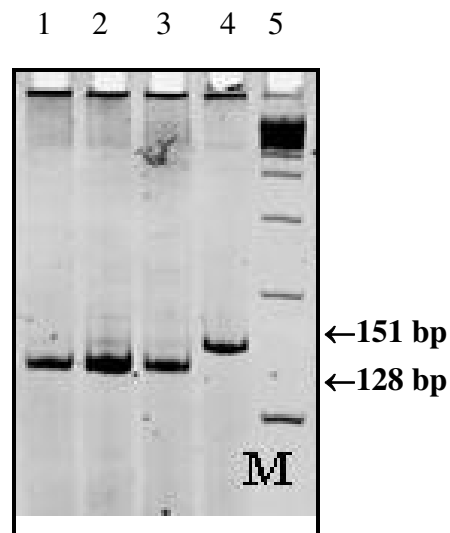


**Figura 24-** Gel de acrilamida 12% com digestão da Mutação L496R.

Coluna 1 e 2- Indivíduo sem a mutação. Coluna 3 - marcador de 50pb.

#### 4.7- Mutação delG322

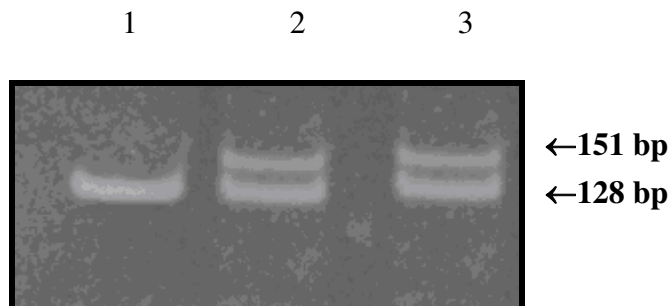
Em relação à mutação delG322, o tamanho do fragmento da PCR é de 151 pb, que é mostrado no controle não digerido do gel abaixo. A foto de um gel de Poliacrilamida 12% mostra fragmentos de PCR após sofrerem digestão enzimática com a enzima Bsp1286 I. Os fragmentos clivados apresentam tamanho de 128pb como mostrado. Encontramos dois pacientes homocigotos para essa mutação e dois pacientes com heterocigose.



**Figura 25-** Digestão da PCR de individuo normal para a mutação delG322.

Coluna 1 2 e 3 - Indivíduos normais, coluna 4 amplificado não digerido e coluna 5- marcador de 100pb.



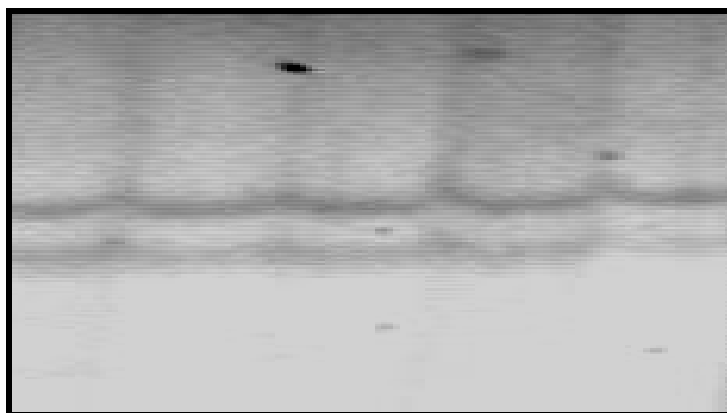


**Figura 26-** Digestão da PCR de indivíduos normais e heterozigotos para a mutação delG322.

Coluna 1 homozigoto normal para a mutação 2 e 3 indivíduos heterozigotos.

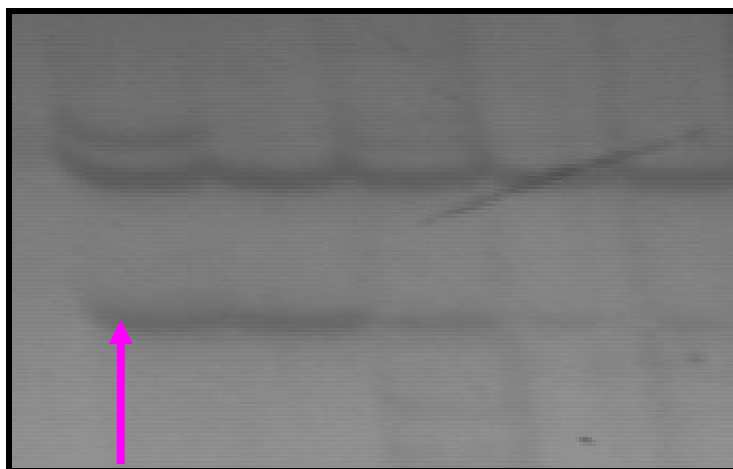
#### 4.8- SSCP

Foram analisados os 14 éxons do gene *FANCC* nos 17 indivíduos heterozigotos para uma das 8 mutações previamente encontradas na triagem mutacional. Somente seis alterações foram detectadas.

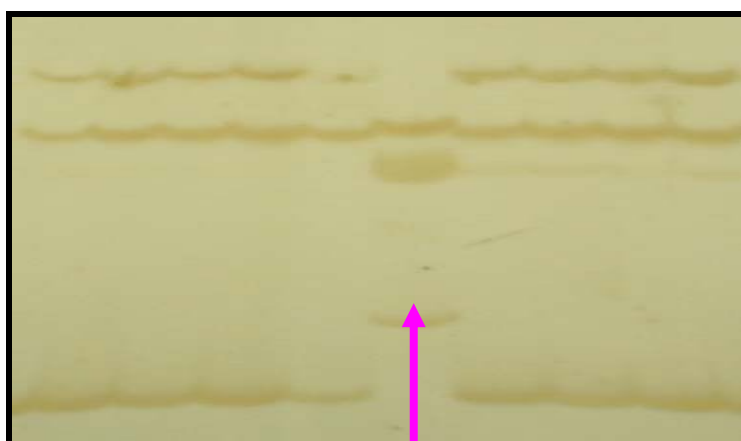


**Figura 27-** Foto de gel não-desnaturante SSCP do éxon 2.

Os indivíduos não apresentaram nenhuma alteração na migração.



**Figura 28-** Foto de gel SSCP do éxon 1. A flecha indica uma alteração de migração de um indivíduo na análise do éxon 1.



**Figura 29-** Foto de gel SSCP do éxon 4. A flecha indica uma alteração de migração de um indivíduo na análise do éxon 4.



**Figura 30-** Foto de gel SSCP do éxon 6. A flecha indica uma alteração de migração de um indivíduo na análise do éxon 6.

**Tabela 5-** Resultado das mutações estudadas no gene *FANCC*.

<i>Genes de AF</i>	<i>Mutações Estudadas</i>	<i>Heterozigotos (+/-)</i>	<i>Homozigoto normal (-/-)</i>	<i>Homozigoto mutante (+/+)</i>	<i>Total</i>
<i>FANCC</i>	Q13X	3	118	0	121
<i>FANCC</i>	W22X	0	121	0	121
<i>FANCC</i>	DG322	2	117	2	121
<i>FANCC</i>	IVS4+4 A > T	10	108	3	121
<i>FANCC</i>	R185X	0	121	0	121
<i>FANCC</i>	R548X	0	121	0	121
<i>FANCC</i>	L496R	1	120	0	121
<i>FANCC</i>	L554P	1	120	0	121
<i>FANCC</i>	Total	17	99	5	121

**Tabela 6-** Resultados parciais da triagem de mutações, pelo método SSCP, dos 14 éxons do gene *FANCC*.

<i>Genes de AF</i>	<i>Éxons</i>	<i>SSCP</i>		<i>Total Heterozigoto FANCC</i>
		<i>ALTERADO</i>	<i>NORMAL</i>	
<i>FANCC</i>	1	3	14	17
<i>FANCC</i>	2	0	17	17
<i>FANCC</i>	3	0	17	17
<i>FANCC</i>	4	2	15	17
<i>FANCC</i>	5	0	17	17
<i>FANCC</i>	6	1	16	17
<i>FANCC</i>	7	0	17	17
<i>FANCC</i>	8	0	17	17
<i>FANCC</i>	9	0	17	17
<i>FANCC</i>	10	0	10	10
<i>FANCC</i>	11	0	17	17
<i>FANCC</i>	12	0	17	17
<i>FANCC</i>	13	0	17	17
<i>FANCC</i>	14	0	17	17
<i>FANCC</i>	Total	6	11	17

## **5- DISCUSSÃO**

Foram realizadas as análises das oito mutações mais prevalentes do gene *FANCC*, IVS4+4A>T, Q13X, W22X, ΔG322, R185X, L496R, L554P, e R548X em uma amostra de 121 pacientes com quadro clínico de Anemia de Fanconi na região de Campinas.

A mutação mais freqüente é a IVS4+4A>T que leva a uma alteração do sítio de splicing e conseqüente deleção do éxon quatro. Essa mutação é particularmente prevalente em judeus *Ashkenazi* (conseqüência de um provável efeito fundador) com freqüência de portadores de um em 89 e é caracterizada por um fenótipo grave com múltiplas anomalias congênitas e início precoce de distúrbios da medula óssea (Gillio *et al.*,1997). Em nossa amostra essa alteração se mostrou a mais frequente, presente em 6,6% dos cromossomos analisados, ou seja, 14% de indivíduos heterozigotos e 4% homozigotos para a mutação IVS4+4A>T.

Na literatura e também na nossa amostra a segunda mutação mais prevalente foi a delG322 a qual resulta em fenótipo leve com 2,47% dos cromossomos analisados, sendo assim esta informação concorda com resultados encontrados por Strathdee *et al.* 1992. Essas duas mutações acometem cerca de 90% dos casos de AF do grupo C. Dentre as menos comuns estão W22X, Q13X e L554P (Verlander *et al.*, 1994; Yamashita *et al.*, 1996).

Mutações nos genes *FANCA* e *FANCC* acometem cerca de 85% dos casos de AF no mundo e mutações em *FANCG* de 8-10%, segundo dados de Tischkowitz e Hodgson (2003).

Em relação à etnia dos indivíduos analisados e às mutações relacionadas a grupos étnicos podemos afirmar que, em se tratando de um trabalho com portadores brasileiros, é importante ressaltar que a origem étnica da população brasileira é altamente heterogênea, consistindo de indígenas e imigrantes da Europa, Ásia e África (Alves-Silva, 2000; Carvalho-silva, 2001; Rodriguez, 2003). Além disso, em vários casos, determinadas mutações não aparecem unicamente em um dado grupo de uma determinada etnia. Um exemplo disso é a mutação IVS4+4A>T que é prevalente não somente em judeus *Ashkenazi* como também, interessantemente, é a mais prevalente na população japonesa

(acredita-se ser o resultado de efeito fundador) (Futaki *et al.*, 2000). Devido a isso não nos baseamos na etnia para a escolha das mutações a serem analisadas e sim nos dados sobre a prevalência de acordo com Auerbach *et al.* 2003.

Outro fator importante a ser levado em consideração é o início precoce dos distúrbios hematológicos e leucemia em indivíduos portadores de mutações no gene *FANCC*, com a necessidade de terapêutica urgente. São razões estimulantes para pesquisas e definição de diagnóstico de indivíduos com a doença (Levitus *et al.*, 2004).

A AF é um distúrbio raro, com uma incidência, no mundo, de três por milhão. Há a necessidade de um tempo maior para coleta de material de indivíduos afetados e posterior estudo. No Brasil existem dois grupos somente que trabalham com AF mas ainda não temos resultados suficientes para afirmar a prevalência da AF.

Atualmente o Instituto Rockefeller em Nova York é o principal centro de coleta e análise de indivíduos com AF (Tischkowitz e Hodgson, 2003). Apenas dois outros centros localizados na Europa realizam essa análise. Devido à complexidade fenotípica e genética na AF há a necessidade da realização de pesquisas minuciosas. São, no mínimo, 13 genes relacionados à AF e diversos graus de expressividade fenotípica.

Anteriormente ao teste molecular, o Teste de Complementação, nos mostra o grupo de complementação ao qual o indivíduo pertence (Joenje e Patel, 2001). Próximo passo seria a análise do(s) gene(s) pertencente(s) ao grupo de complementação encontrado. Isso seria essencial para se evitar perda de tempo e dinheiro em fazer a análise de todas as mutações conhecidas. Uma solução é fazer a análise de acordo com a ordem de prevalência das mutações: FA-A, FA-C, FA-G e assim por diante.

É necessário levar em consideração a possível perda de resultados importantes, pela técnica de SSCP. Apesar de considerada mais barata e mais salubre que a utilização de isótopos radioativos, apresenta 80% de sensibilidade e 85 a 90% quando em duplicata. Isso pode ter sido um dos principais motivos da presença de pacientes sem alteração no DNA.

## **6- CONCLUSÃO**



Concluimos que a mutação IVS4+4A >T é a mais frequente na amostra estudada estando presente em 6,6% dos cromossomos analisados.

Existe a necessidade da realização de teste de complementação, tendo em vista a grande complexidade genética e fenotípica da doença. Isso possibilitaria uma melhor classificação do grupo ao qual pertence o paciente, pois são, no mínimo, 13 genes relacionados à AF e diversos graus de expressividade da doença.

A classificação dos pacientes pelo DEB teste positivo é difícil pelo fato de existirem várias doenças que também apresentam instabilidade cromossômica e cujos aspectos clínicos se confundem com a AF.

É necessário levar em consideração a possível perda de resultados importantes, pela técnica de SSCP. Apesar de considerada mais barata e mais salubre que a utilização de isótopos radioativos, apresenta 80% de sensibilidade e 85 a 90% quando em duplicata. Isso pode ter sido um dos principais motivos da presença de pacientes sem alteração no DNA.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alter BP. Fanconi's anaemia and its variability. *Br J Haematol.* 1993; 85(1):9-14.
- Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. *Br. J. Hematol* 1994; 85:9-14
- Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. *Am. J. Hematol* 1996; 53: 99-110
- Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA, Uchida T, Velagaleti GV, Elghetany MT: Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 117(2):125-31.
- Alter BP. Cancer in Fanconi anaemia, 1927-2002. *Cancer* 2003; 97:425-440.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000; 67:444-461.
- Apostolous S, Whitmore AS, Crawford J. Positional cloning of the Fanconi anemia group C gene. *Nat Genet* 1996; 14:324.
- Auerbach AD. Fanconi anemia. *Dermatol Clinic* 1995; 13(1):41-9.
- Auerbach AD, Allen RG. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients: A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 51:1-12.
- Auerbach AD. Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. *Leukemia* 1992; v. 6 (suppl. 1):1-4.
- Auerbach AD, Adler B e Chaganti RS. Prenatal and postnatal diagnosis an carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. *Pediatrics* 1981; 67(1):128-135.
- Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H. Fanconi anemia. In: Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. (Ed.). *The genetic basis of human cancer*. 2.<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 1999. p. 289-306.
- Auerbach AD, Rogatko A, Achroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to dyepoxibutane sensitivity. *Blood* 1989; 73(2):391-396.

Auerbach AD, Greenbaum J, Pujara K, Batish SD, Bitencourt MA, Kokemohr I, *et al.* Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International of Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat* 2003; 21(2):158-168.

Amstalden LG. Estudo das mutações do gene FANCG em pacientes com quadro clínico de Anemia de Fanconi. 2006. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Campinas.

Bielorai B, Hughes MR, Auerbach AD, Nagler A, Loewenthal R, Rechavi G, *et al.* Successful umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia using transplantation genetics diagnosis for HLA-Matched donor. *Am J Hem* 2004; 77:397-99.

Block M, Jacobson Lo, Bethard Wf. Preleukemic acute human leukemia. *Am J Med* 1953; 152:1018-28.

Butturini A. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 1994; 84:1650-55.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 2001; 68:281-286.

Cervenka J, Arthur D, Yasis C. Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic Aplastic anemia and Fanconi anemia. *Pediatrics* 1982; 67(1):119-27.

Couzin J. The twists and turns in BRCA's path. *Science* 2003; 302:591-93.

D'Andrea AD e Grompe M. The Fanconi anemia/BRCA pathway. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3:23-34.

Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, *et al.* Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 2001; 7:273-82.

De Chadarévian JP, Vekemans M, e Bernstein M. Fanconi's anemia medulloblastoma, Wilms' tumor, horseshoe kidney and gonadal dysgenesis. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109(4):367-69.

De Kerviler E, Guerhazi A, Zagdanski AM, Gluckman E, Frija J. The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. *Clin Radiol* 2000; 55:340-45.

Demuth I, Wlodarski M, Tipping AJ, Morgan NV, de Winter JP, Thiel M, *et al.* Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:861-68.

De Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, Van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, *et al.* The Fanconi anemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet* 1998; 20:281-83.

De Winter JP, Van der Weel L, De Groot J, Stone S, Waisfisz Q, Arwert F, *et al.* The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC e FANCG. *Hum Mol Genet* 2000a; 9:2665-74.

De Winter JP, Léveillé F, Van Berkel CG, Rooimans MA, Van Der Weel L, Steltenpool J, *et al.* Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet* 200b; 1306-08.

Dokal I, Chase A, Morgan NV, Coulthard S, Hall G, Mathew CG, *et al.* Positive diepoxybutane test in only one of two brothers found to be compound heterozygotes for Fanconi's anaemia complementation group C mutations. *Br J Haem* 1996; 93: 813-18.

Duckworth-Rysiecki G, Cornish K, Clarke CA, Buchwald M. Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. *Somat Cell Mol Genet* 1985; 11:35-41.

Dorsman JC, Levitus M, Rockx D, Rooimans MA, Oostra AB, Haitjema A, *et al.* Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* 29: 211-218, 2007.

Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, *et al.* Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood* 2000; 96:4064-70.

Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, *et al.* The IVS4+4A>T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood* 2000; 95:1493-8.

Galimi F, Noll M, Kanazawa Y, Lax T, Chen C, Grompe M, *et al.* Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using lentiviral vectors. *Blood* 2002; 100:2732-36.

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, *et al.* Interaction of Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 2001; 7:249-262.

Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*. 1993; 91(6):1116-20.

Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG, Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an International Fanconi Anemia Registry study. *Am J Med Genet* 1997; 68:58-61

Gibbons B, Scott D, Hungerford JL, Cheung KL, Harrison C, Attard-Montalto S, *et al.* Retinoblastoma in association with the chromosome breakage syndromes Fanconi's anemia and Bloom's syndrome: clinical and cytogenetics findings. *Clin Genet* 1995; 47(6):311-17.

Gillio AP, Verlander PC, Batish SD, Giampietro PF, Auerbach AD. Phenotypic consequences of mutation in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 1997; 90:105-10.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *New England Journal of Medicine* 1989; 321:1174-78.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. In: Hemácias, Leucócitos e Resistência do Corpo à Infecções. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p247-58.

Gush KA, Fu KL, Grompe M, Walsh CE. Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice. *Blood*. 2000; 15;95(2):700-4.

Guyton Arthur C. Fisiologia Humana e Mecanismo das doenças. 5ª edição. Ed. Guanabara Koogan. 1992; 575p.

Hill LS, Dennis PM, Fairham SA. Adenocarcinoma of the stomach and Fanconi's anemia. *Postgrad. Med Jv* 1981; 57(668):404.

Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, *et al.* Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*. 2002; 26;297(5581):606-9.

Hoatlin ME, Christianson TA, Keeble WW, Hammond AT. The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells. *Blood* 1998; 91:1418-25.

Jacobs P, Karabus C. Fanconi's anemia. A family study with 20- year follow-up including associated breast pathology. *Cancer* 1984; 54(9): 1850-53.

Joenje H, Lo ten Foe JR, Oostra AB, Van Berkel CG, Rooimans MA, Schroeder-Kurth T, *et al.* Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for fifth genetic subtype. *Blood* 1995; 86:2156-60.

Joenje H, Oostra AB, Wijker M, Di Summa FM, Van Berkel CG, Rooimans MA, *et al.* Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. *Am J Hum Genet* 1997; 61:940-44.

Joenje H, Patel KJ .The emerging genetic and molecular basis of Fanconi Anemia. *Nat Rev Genet* 2001; 2:446-57.

Jorde Lynn B, Carey John C, Bamshad Michael J, White Raymond L. *Genética Médica*. 3ª edição. Ed. Elsevier. 2004; 415p.

Kaplan MJ, Sabio H, Wanebo HJ, Cantrell RW. Squamous cell carcinoma in the immunosuppressed patient: Fanconi's anemia. *Laryngoscope* 1985; 95:771-75.

Koc A, Pronk JC, Alikasifoglu M, Joenje H, Altay C. Variable pathogenicity of exon 43del (FAA) in four Fanconi anaemia patients within a consanguineous family. *Br J Haematol* 1999; 104:127-130.

Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, *et al.* A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003; 101(4):1249-56.

Lessard M, Smith JD. Fanconi syndrome with uveitis in an adult woman. *J Am. 1989;13(2):158-9.*

Levinson S, Vincent KA. Multifocal osteosarcoma in a patient with Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol 1977; 19(3):251-53.*

Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, *et al.* Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for two new genetic subtypes. *Blood 2004; 103:2498-2503.*

Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, De Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, *et al.* The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature Genetics 2005; 37:934 – 35.*

Levran O, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, *et al.* Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. *Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997; 94:13051-56.*

Linman JW. Myelomonocytic leukemia and its preleukemic phase. *J Chronic 1970; 22(11):713-6.*

Liu JM, Auerbach AD, Young NS. Fanconi anemia presenting unexpectedly in a adult kindred with no dysmorphic features. *Am J Med 1991; 91:555-57.*

Liu N, Lamerdin JE, Tucker JD, Zhou ZQ, Walter CA, Albala JS, *et al.* The human XRCC9 gene corrects chromosomal instability and mutagen sensitivities in CHO UV40cells. *Proc Nat Acad Sci 1997; 94:9232-37.*

Liu J, Kim S, Read EJ. Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther 1999; 10:2337-46.*

Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, *et al.* Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet 1997; 5:137-148.*

Lustig JP. Head and neck carcinoma in Fanconi's anaemia: report of a case and review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol 1995; 31B(1):68-72.*



Magdalena NIR. Estudo das variações da seqüência do gene FANCA da Anemia de Fanconi. 1999. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Magdalena N, Pilonetto DV, Bitencourt MA, Pereira NF, Ribeiro RC, Jeng M, *et al.* Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the FANCA 3788-3790del mutation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2005; 38: 669-673

Meetei AR, De Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, *et al.* A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 2003a; 35(2):165-170.

Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, *et al.* A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Molecular and Cellular Biology* 2003b; 23: 3417-26.

Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, *et al.* X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 2004; 36:1219-24.

Meetei AR. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nature Genetics* 2005; 37:958 – 63, 2005.

Nagase, T.; Nakayama, M. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 8: 85-95, 2001.

Nakanishi K, Moran A, Hays T, Kuang Y, Fox E, Garneau D, Functional analysis of patient-derived mutations in the Fanconi anemia gene, FANCG/XRCC9. *Exp Hematol* 2001; 29(7):842-49.

Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, *et al.* Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature Cell Biology* 2002; 4:913-20.

Nakanishi K, Yang YG, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, *et al.* Human Fanconi anaemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *PNAS* 2005; 102(4).

National Center for Biotechnology Information. Ensemble Human Contig View. Disponível em: <[http://www.ensemble.org/Homo\\_sapiens](http://www.ensemble.org/Homo_sapiens). Acesso em: 16 jun 2003.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genética Médica. In: Fundamentos de Citogenética Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.118-37.

Potter NU, Sarmousakis C, Li FP. Cancer in relatives of patients with aplastic anemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1983; 9:61-5.

Reuter TY, *et al.* Yeast two-hybrid screens imply involvement of Fanconi Anemia proteins in transcription regulation, cell signaling, oxidative metabolism and celular transport. Disponível em:

<<http://www.ohsu.edu/som-CellBio/Academics/cancer/week9/lensch.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2003.

Rodriguez DEA. Estudo molecular da Anemia de Fanconi. 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Campinas.

Rosenberg PS, Huang Y. Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. *Blood* 2004; Prepublished online 2004.

Rosendorff J, Bernstein R, Macdougall L, Jenkins T. Fanconi anemia: another disease of unusually high prevalence in the Afrikaans population of South Africa. *Am J Med Genet* 1987; 27:793-97.

Saar K, Schindler D, Wegner RD, Reis A, Wienker TF, Hoehn H, *et al.* Localisation of a Fanconi anaemia gene to chromosome 9p. *Euro J Hum Genet* 1998; 6:501-08.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1989; 239:487-91.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74(12):5463-67.

Savino M, Borriello A, D'Apolito M, Criscuolo M, Del Vecchio M, Bianco AM, *et al.* Spectrum of FANCA mutations in Italian Fanconi anemia patients: identification of six novel alleles and phenotypic characterization of the S858R variant. *Hum Mut* 2003; 6:1-8.

Schaison G. Fanconi's anemia. Incidence of its development into leukemia. *Presse Med* 1983; 12(20):1269-74.

Schroeder TM, Anschutz F, Knopp A. Spontane chromosomen aberrationen bei familiärer pancytopenie. *Humangenetik* 1964; 1:194-6.

Schroeder TM, Tilgen D, Krüger J, Vogel F. Formal genetics of Fanconi's anemia. *Hum Genet* 1976; 32(3):257-88.

Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, *et al.* Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi Anemia patients by analysis of FA/BRCA pathway. *Blood* 2005; 105:1329-36.

Stewart G. e Elledge SJ. The two faces of BRCA2, a FANCTastic discovery. *Mol Cell* 2002; 10:2-4.

Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. In: Atwater SK. *Neoplasias do Sistema Imune*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.502-23.

Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 1992; 356:763-67.

Swift M. Fanconi's anemia in the genetics of the neoplasia. *Nature* 1971; 230:370-73.

Shimamura A. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2002; 100(13):4649-54.

Swift M, Caldwell RJ, Chase C. Reassessment of cancer predisposition of Fanconi anemia heterozygotes. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:863-67.

Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, *et al.* Convergence of the Fanconi anaemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 2002; 109:459-72.

Taniguchi T e D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia. *Int J Hematol* 2002; 75:123-28.

The Rockefeller University. Fanconi Anemia Mutation Database. Disponível em: < <http://www.rockefeller.edu/fanconi/mutate/jumpg.html> >. Acesso em: 16 jun. 2003.

Timmers C, *et al.* Positional cloning of a novel Fanconi Anemia Gene, FANCD2. *Molecular Cell* 2001; 7:241-48.

Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, Gibson RA, Kuyt LP, Havenga C, *et al.* Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi Anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:5734-39.

Tischkowitz MD, Dokal I. Fanconi anaemia and leukaemia-clinical and molecular aspects 2004; 126:176-191.

Tischkowitz MD, Morgan NV, Grimwade D, Eddy C, Ball S, Vorechovsky I, *et al.* Deletion and reduced expression of the Fanconi anemia FANCA gene in sporadic acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004; 18:420-25.

Van der Heijden MS, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003; 63(5):1585-2588.

Van de Vrugt HJ, Koomen M, Berns MA, De Vries Y, Rooimans MA, Van der Weel L, *et al.* Characterization, expression and complex formation of the murine Fanconi anaemia gene product Fancg. *Genes to Cells* 2002; 7(3):333-42.

Van Niekerk CH, Jordaan C, Badenhorst PN. 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* 1987; 152(8):691-93.

Venkitaraman AR. A growing network of cancer-susceptibility genes. *New England Journal of Medicine* 2003; 348:1917-19.

Venkitaraman AR. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4:266-76.

Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, *et al.* Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *Am J Hum Genet.* 1994; 54(4):595-601.

Verlander PC. Carrier frequency of the IVS4 + 4A→T mutation of the Fanconi Anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. *Blood* 1995; 86:4034-38.

Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z, Popovic J, Lin K, Verlander PC, *et al.* Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Pediatrics* 2001; 107:744-54.

Wang X, D'Andrea A.D. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair* 2004; 3:1063-69.

Waisfisz Q, Saar K, Morgan NV, Altay C, Leegwater PA, de Winter JP, *et al.* The Fanconi anemia group E gene, FANCE, maps to chromosome 6p. *J Am Hum Genet.* 1999; 64(5):1400-5.

Whitney M, Thayer M, Reifsteck C, Olson S, Smith L, Jakobs PM, *et al.* Microcell mediated chromosome transfer maps the Fanconi anaemia group D gene to chromosome 3p. *Nat Genet.* 1995; 11(3):341-3.

Witt E, Ashworth A. *Biomedicine.* D-Day for BRCA2. *Science.* 2002; 26;297.

Woodhead JL. Alternative methodology of genes diagnosis. In: DAVIES, K. E. *Humangenetics disease – a practical approach.* Oxford: IRL Press Limited, 1986, p. 51-54.

Yagasaki H, Oda T, Adachi D, Nakajima T, Nakahata T, Asano S, *et al.* Two common founder mutation of the Fanconi Anemia group G gene FANCG/XRCC9 in the Japanese population. *Hum Mutat* 2003; 21(5):555-62, May.

Yamada T, Tachibana A, Shimizu T, Mugishima H, Okubo M, Sasaki MS. Novel mutations of the FANCG gene causing alternative splicing in Japanese Fanconi anemia. *J Hum Genet* 2000; 45(3):159-66.

Yamashita T, Wu N, Kupfer G, Corless C, Joenje H, Grompe M, *et al.* 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.* 1996; 87(10):4424-32.

Yates J, Keeble W, Pals G, Ameziane N, van Spaendonk R, Olson S, *et al.* Novel inactivating mutations of FANCC in Brazilian patients with Fanconi anemia. *Human Mutation* 2006; 27 214-221.

Yoshida MC. Suppression of spontaneous and mitomycin C-induced chromosome aberrations in Fanconi's anemia by cell fusion with normal human fibroblasts. Hum Genet. 1980; 55(2):223-6.

Zakrzewski S, Sperling K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. Hum Genet 1980; 56(1)81-84.

Zhang X, Li J, Sejas DP, Rathbun KR, Bagby GC, Pang Q. The Fanconi anemia proteins functionally interact with the protein kinase regulated by RNA (PKR). The journal of Biological Chemistry 2004; 279:43910-19.

## **8- ANEXOS**

## ANEXO 1

### Termo de Consentimento



## Universidade Estadual de Campinas Departamento de Genética Médica

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISAS COM SERES HUMANOS

Título do projeto: *Estudo das mutações do gene FANCC em pacientes com quadro clínico de Anemia de Fanconi na região de Campinas.*

#### **OBJETIVO DA PESQUISA:**

Eu entendo que fui convidado a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com Anemia de Fanconi. O objetivo geral do estudo é o de identificar alterações no gene *FANCC* para um diagnóstico preciso de pacientes que apresentaram quadro clínico de Anemia de Fanconi. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

#### **PROCEDIMENTO:**

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Será coletada uma amostra de sangue venoso (5 ml, o equivalente a 1 colher de sopa) sendo necessário a coleta de sangue também dos pais. Hospitalização não será necessária.



**RISCO E DESCONFORTO:**

Uma coleta de 5 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

**VANTAGENS:**

Eu entendo que não há expectativa de que os resultados deste trabalho tragam benefício imediato a mim e a meus familiares e que a única vantagem que poderei obter é saber quais alterações no gene *FANCC* que eu possuo. Além de que, esse método pode não detectá-las. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as conseqüências serão devidamente explicadas a meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (19) 3521 8902 (Claudia Estela Gonçalves).

**SIGILO:**

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado. Fui informado que esse material genético será guardado e que qualquer outro projeto que pretenda utilizá-lo, deverá ser aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da FCM e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

**FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:**

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3521-8936.

### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos ou desconforto advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

---

Nome e RG participante (ou responsável)

---

Assinatura do participante (ou responsável)

---

Data

### **RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:**

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

---

## ANEXO 2

### PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA CLORETO DE LÍTIO E PROTEINASE K

1. Mexa a amostra de sangue para ressuspender as células.
2. Cada eppendorf deve conter 500 $\mu$ L de sangue (sem plasma).
3. Adicione 800 $\mu$ L de tampão lise<sup>a</sup>.
4. Vortex 10 a 15 segundos.
5. Centrifugar (6000rpm) 5 minutos para formação de um pellet de células.
6. Entornar (uma vez) o sobrenadante.
7. Repetir (2 vezes) de 3 a 6 (aumentar para 1000 $\mu$ L de tampão de lise).
8. Colocar 395 $\mu$ L de tampão de digestão por amostra e 20 $\mu$ L de Proteinase K por amostra, homogeneizar com pipeta para quebrar o pellet e vortex por 15 segundos.
9. Levar a amostra à 55°C por 2 horas vortex cada tubo depois de 1 hora por 15 segundos.
10. Adicionar 200 $\mu$ L de LiCl\*7,5N em cada amostra. Deixar no freezer por 15 minutos ou na geladeira over night.
11. Microcentrifugar por 10 minutos a 13000rpm. Formará pellet de proteínas e outros contaminantes.
12. Coloque cuidadosamente o sobrenadante em novos eppendorfs evitando transferir qualquer precipitado.
13. Adicione 1mL de etanol 100% gelado e inverter o eppendorf aproximadamente 50 vezes ou até o DNA precipitar visivelmente.
14. Microcentrifugar a 13000rpm por 5 minutos.
15. Verter o álcool com cuidado para não mover o pellet.
16. Adicionar 1mL de etanol 70% e agitar com a ponta dos dedos.
17. Spin a 13000rpm por 5 minutos.
18. Entornar os tubos para secar o DNA naturalmente.
19. Adicionar 60 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O injeção.
20. Agitar e incubar a 55°C por 10 minutos.
21. Agitar (delicadamente).
22. Spin 1000rpm por 1 minuto
23. Quantificar o DNA em gel de agarose 0,8%.

## SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO

### Tampão de Lise (Extração LiCL e Proteinase K)<sup>a</sup>

Sacarose 320 mM 2,19 g  
Tris HCL pH7,5 10 mM 500,0 µL (2N)  
MgCL<sub>2</sub> 5 mM 500,0µL (1N)  
(V/V tritonX100) 1% 1000,0µL  
H<sub>2</sub>O deionizada qsp 100,0 mL  
Armazenar em geladeira.

### Tampão de Digestão<sup>o</sup> (Extração LiCL e Proteinase K)

Tris HCL pH7,5 10 mM 100,0 µL (2M)  
EDTA 10 mM 400,0 µL (0,5M)  
NaCL 10 mM 40,0 µL (5M)  
SDS 0,5 M 500,0 µL 20%  
H<sub>2</sub>O deionizada qsp 20,0 mL  
Armazenar a temperatura ambiente

### Cloreto de Lítio (LiCl) 7,5 N (20,0 mL)\*

PM = 42,39  
N = 7,5  
$$N = \frac{m}{PM \times V(L)}$$
$$m = 0,02 \times 42,39 \times 7,5$$
$$m = 6,36 \text{ g diluídos em } 20,0 \text{ mL de H}_2\text{O.}$$

LiCL 6,3585g  
H<sub>2</sub>O deionizada qsp 20,0 mL

### Gel de Poliacrilamida 12 %

H<sub>2</sub>O 12,45 mL  
TBE 10X 2,10 mL  
Acrilamida 40% 6,30 mL  
Persulfato de amônio 10% 147,0 µL  
Temed 24,5 µL

## SOLUÇÕES RELACIONADAS AO GEL DE POLIACRILAMIDA 12%

### TBE 10X (1000,0mL)

Trizima 108,0 g  
Ácido bórico 54,8 g  
EDTA 0,2 M(0,5M) 100,0 mL (40mL)  
H<sub>2</sub>O deionizada qsp 1000,0 mL  
Agitar para dissolver e autoclavar

### Acrilamida (100,0 mL) 40%

Acrilamida 38,6 g  
Bisacrilamida 1,34 g  
H<sub>2</sub>O p/ completar 100,0 mL

### Persulfato de Amônio 10% (5,0 mL)

persulfato de amônio 0,5 g  
H<sub>2</sub>O p/ completar 5,0 mL

### Gel de Agarose 1,5 % (100,0 mL)

agarose 1,5 g  
TBE 1X 100,0 mL

### Gel não desnaturante para SSCP com glicerol 30%

*Com Glicerol 30 %:*

Acrilamida 30 % 9,96 mL  
H<sub>2</sub>O 43,64 mL  
Glicerol 2,979 mL  
TBE 20X 3,0 mL  
PSA 25 % 110 µL  
Temed 40 µL

## ANEXO 3

### *PROTOCOLO COLORAÇÃO POR PRATA*

#### **1ª parte:**

150mL de álcool etílico

150mL de ácido acético

Completar para 1,5 litros com água miliq

Colocar a placa dentro de uma bandeja com essas soluções e deixar por 20 minutos

#### **2ª parte:**

21mL de ácido nítrico

Completar para 1,5 litros com água miliq

Colocar a placa dentro de uma bandeja e deixar 3 minutos

#### **3ª parte:**

1,5g de nitrato de prata

Completar para 1,5 litros com água miliq

Adicionar 2,0 ml de formaldeído no momento da colocação da solução sobre a placa

Deixar por 30 minutos

#### **4ª parte:**

11,13 g de carbonato de sódio

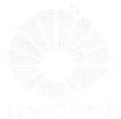
7,5mL de tiosulfato de sódio

Completar para 1,5 litros com água miliq

Adicionar 2,0 mL de formaldeído no momento da colocação da solução sobre a placa

Deixar por alguns segundos até aparecimento das bandas

## ANEXO 4



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP  
☎ (0\_19) 3788-8936  
FAX (0\_19) 3788-8925

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)  
✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP, 23/08/05.  
(Grupo I)

**PARECER PROJETO:** Nº 364/2005  
**CAAE:** 0164.0.146.000-05

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “ESTUDO DAS MUTAÇÕES DO GENE FANCC EM PACIENTES COM QUADRO CLÍNICO DE ANEMIA DA FANCONI NA REGIÃO DE CAMPINAS”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Claudia Estela Gonçalves

**INSTITUIÇÃO:** Departamento de Genética Humana/FCM/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 08/07/2005

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 23/02/06 e 23/08/06

### II - OBJETIVOS

Estudar as mutações do gene FANCC em pacientes com quadro clínico de Anemia de Fanconi na região de Campinas.

### III - SUMÁRIO

Serão estudadas mutações em 50 pacientes com clínica de Anemia de Fanconi que foram triadas nos ambulatórios de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica, nos ambulatórios de Hematologia do Hemocentro e outros casos enviados por hematologistas da região de Campinas. Os pacientes deverão ter teste com diepoxibutano positivo. Será realizada extração do DNA em sangue periférico, amplificação gênica, single strand conformation polymorphism e sequenciamento.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Cronograma, aspectos éticos e Termo de Consentimento Livre Esclarecido adequados. Há um orçamento de R\$50.000,00.

### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

- 1 -

