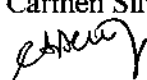


LUCILA GOBBY AMSTALDEN

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Genética do(a) aluno(a) **Lucila Gobby Amstalden**.

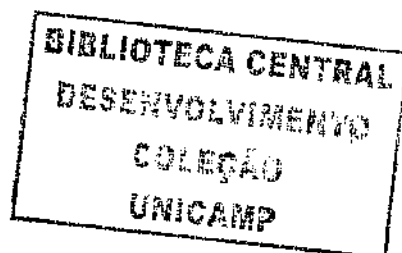
Campinas, 3 de julho de 2006.

Prof(a). Dr(a). Carmen Sílvia Bertuzzo,
Orientador(a) 

**ESTUDO DAS MUTAÇÕES DO GENE FANCG EM
PACIENTES COM QUADRO CLÍNICO SUGESTIVO DE
ANEMIA DE FANCONI**

CAMPINAS

2006



LUCILA GOBBY AMSTALDEN

**ESTUDO DAS MUTAÇÕES DO GENE FANCG EM
PACIENTES COM QUADRO CLÍNICO SUGESTIVO DE
ANEMIA DE FANCONI**

*Dissertação apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, área de concentração
Ciências Biomédicas*

ORIENTADOR: PROFA. DRA. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

CAMPINAS

2006

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

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

Am 87e Amstalden, Lucila Gobby
Estudo das mutações do gene FANCG em pacientes com quadro clínico sugestivo de Anemia de Fanconi / Lucila Gobby Amstalden. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

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

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

Título em inglês : Mutation analysis of FANCG gene in patients with compatible clinical to Fanconi anaemia

Keywords: • Chromosomal instability
• Fanconi, Anaemia

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

**Banca examinadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes
Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves**

Data da defesa: 03-07-2006

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carmen Sílvia Bertuzzo

Membros:

1. Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

2. Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

3. Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

03/07/2006

DEDICATÓRIA

“Depois de tantos dias, não há abraços ou lágrimas que exprimam tanta saudade. Lembro-me de tantos momentos bons! Sinto muito sua falta! Se você pensa que nada deixou para trás, lembre-se pelo menos de mim. Posso até não estar ao seu lado, mas sempre estarei em suas lembranças, assim como através de minhas lembranças você sempre estará. Tenho certeza de que nos veremos em breve, “o mundo dá muitas voltas, mas sempre volta ao mesmo lugar”. Por enquanto ficam essas palavras, por minha saudade, já que infelizmente minha presença é impossível no momento” (Momentos de Saudade - Autor desconhecido) À minha eterna tia Maria Beatriz Gobby Bandini (in memorian)

À minha família: meu pai Walter, minha mãe Fátima, irmãs Livia e Lilian, cunhado-irmão Ricardo e, agora, minha querida sobrinha Melissa, pela vida, pelas alegrias, pelos abraços, sorrisos, beijos, confiança, amor, carinho. Minha eterna gratidão.

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

À Cláudia Estela (ESTELINHA) Gonçalves, Renato (ZÉ BOLA) Oliveira dos Santos, meus companheiros de Fanconi, Fábio (FEIJÃO) Rossi Torres, Elisangela (LIZ) Jacinto de Faria, Isabel (ISA) Jacinto de Faria, Ana Carolina (CAROL) Zimiani Paiva, Daniela (DANI SC) Tenório Furgeri, Daniel (DANI) Elder de Oliveira Costa, Daniel (PANGA) Zanetti Scherrer, Lidiane (PIMENTINHA) Camila Rueda, pela valiosa amizade, pela ajuda profissional, pelos momentos felizes que passamos juntos e, principalmente, pelo apoio nos momentos difíceis.

À Tânia (CORNETA) Maria Vulcani de Freitas e Tarsis (DUDU) Paiva Vieira pela grande amizade, companheirismo, confiança, paciência, e pelo grande apoio profissional.

A meus colegas e amigos que adquiri nestes três anos de trabalho, muito obrigada pelos tantos ensinamentos diários.

À FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro e científico a este projeto.

“A melhor maneira de prever o futuro é criá-lo”

PETER DRUCKER

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xiv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvi</i>
INTRODUÇÃO.....	18
OBJETIVOS.....	49
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS.....	61
DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	86

AF	Anemia de Fanconi
AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	Ataxia Telangiectasis Mutated
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DEB	diepoxibutano
DNA	ácido desoxirribonucleico
EFARP	European Fanconi Anaemia Research Programme
FAAP	Fanconi Anemia-associated polypeptide
HLA	Human Leucocytes Antigens
IFAR	International Fanconi Anemia Registry
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MDS	Síndrome Mielodisplásica
MO	Medula óssea
NBS	Nijmegen Syndrome
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase Chain Reaction
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism

	Pág.
Tabela 01- Genes envolvidos na Anemia de Fanconi e identificados até o momento. Ressaltados, em vermelho, os três genes nos quais mutações prevalecem.....	38
Tabela 02- Mutações descritas no gene FANCG.....	41
Tabela 03- Produtos da reação de amplificação das diferentes mutações, sequência de primers e temperaturas de anelamento.....	54
Tabela 04- Temperaturas de incubação e tamanhos dos fragmentos observados nas diferentes mutações após digestão com enzimas de restrição específicas.....	58
Tabela 05- Primers dos 14 exons do gene FANCG que foram utilizados na amplificação dos fragmentos para SSCP e suas temperaturas de anelamento e tamanhos em pb.....	59
Tabela 06- Relação dos indivíduos analisados indicando sexo, idade, cor, clínica e genótipo de cada um.....	66

	Pág.
Figura 01- Paciente portador com alteração na implantação dos polegares, hipoplasia radial (A) e manchas <i>café-au-lait</i> na região do tronco (B)...	21
Figura 02- Indivíduo com AF apresentando dismorfismos faciais.....	21
Figura 03- A figura representa quebras cromatídicas entre cromossomos não homólogos e conseqüente formação de cromossomos anômalos quadriradiais ocorrentes em células de indivíduos portadores.....	26
Figura 04- Metáfase mostrando aberrações cromossômicas estruturais em indivíduos portadores de AF. As flechas indicam os locais de quebras.....	27
Figura 05- Teste de complementação utilizando-se células de três indivíduos com AF (P1, P2 e P3). A fusão de P1 com P2 não levou à correção do fenótipo de celular (sensibilidade à mitomicina C), portanto são pertencentes ao mesmo grupo de complementação. Já no segundo caso (entre P2 e P3) ocorre a correção, o produto protéico de uma célula substitui o ausente na outra após a formação do híbrido e vice-versa, indicando que os indivíduos pertencentes ao mesmo grupo.....	30
Figura 06- Resultados baseados na análise de 241 famílias classificadas no EFARP (European Fanconi Anaemia Research Programme – 1994 a 2003). O número absoluto por grupo é: A-159, B-2, C-23, D1-8, D2-8, E-6, F-5, G-21, I-4, J-4 e L-1.....	31

Figura 07-	Representação do gene FANCC com seus exons (retângulos azuis) e a localização das duas principais mutações: IVS4+4A>T ocorrente no início do intron 4 e a mutação ΔG322.....	32
Figura 08-	Representação do gene FANCA com seus 43 exons e a localização da principal mutação: Δ3788_3790 no exon 38.....	33
Figura 09-	Representação do gene FANCE com seus 10 exons e as principais mutações: 355C>T e 421C>T localizadas no exon 2, 1111C>T e 1094G>A no exon 5, a IVS5-8G>A localizada no final do intron 5 e a 1504G>A no exon 9.....	34
Figura 10-	Representação do gene FANCF com seu único exon e a localização das principais mutações: 16C>T, 327C>G, 230-252del, 349-395del e 484-485del.....	34
Figura 11-	Representação do gene <i>FANCD2</i> com seus 44 exons e a localização das principais mutações descritas: 376A>G no exon 5, 904C>T e 958C>T no exon 12, exon17del no exon 18 e 3707G>A localizada no exon 37.....	35
Figura 12-	Representação do gene <i>FANCD1</i> com seus 27 exons e localização das principais mutações descritas: 352C>T no exon 12 e 443A>C no exon 15.....	36
Figura 13-	Representação do gene <i>FANCL</i> com seus 14 exons e a localização da mutação descrita: exon11del.....	36
Figura 14-	Representação do gene <i>FANCB</i> com seus 10 exons e a localização das mutações descritas: 811insT no exon 3, 1650delT e 1838delT no exon 8 e 10693del3314 no exon.....	37

Figura 15- Gene <i>FANCG</i> e sua estrutura com 14 exons representados por retângulos e os introns por barras delgadas. As quatro mutações principais estão indicadas na figura: IVS3+1G>C no início do intron 3, a IVS8-2A>G no início do intron 8, a IVS11+1G>C no início do intron 11 e uma deleção de 10 pares de bases localizada o início do exon 14.....	39
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....	46
Figura 17- Representação esquemática da atuação da enzima DdeI na clivagem do fragmento amplificado de 297 pb na PCR para análise da mutação IVS8-2A>G. A mutação abole o sítio de restrição na posição 106, dando origem a um fragmento de 250 pb observado no gel de acrilamida 12%.....	55
Figura 18- Representação esquemática da atuação da enzima Hph I na clivagem do fragmento amplificado de 250 pb na PCR para análise da mutação IVS11+1G>C. A mutação abole o sítio de restrição na posição 130, dando origem a um fragmento de 213 pb observado no gel de acrilamida 12%.....	56
Figura 19- Representação esquemática da atuação da enzima DdeI na clivagem do fragmento amplificado de 297 pb na PCR para análise da mutação IVS8-2A>G. A mutação adiciona um sítio de restrição na posição 106, dando origem a um fragmento de 250 pb observado no acrilamida 12%.....	57
Figura 20- Representação esquemática do ocorrente na mutação 1794_1803del10. Um fragmento de 273 pb aparece no gel de agarose 3% quando o indivíduo é homozigoto mutante.....	57

Figura 21-	Foto gel exemplificando os fragmentos de 297pb após PCR para análise da mutação.....	62
Figura 22-	Foto de gel de poliacrilamida 12% da digestão enzimática para análise de IVS8+2A>G. Os indivíduos 1-3 e 5-11 apresentaram bandas de 191 e 59 pb características de indivíduos normais. O indivíduo de número 4 (AF29) apresentou uma banda única de 250pb sendo homozigoto mutante para o distúrbio.	62
Figura 23-	Digestão dos fragmentos amplificados. Todos os indivíduos apresentaram uma banda única de 385 pb (para IVS3+1G>C) (A), bandas de 93 e 120 pb (para IVS11+1G>C) (B) e uma banda de 283 pb (para 1794_1803del10) (C) o que comprova serem normais para essas mutações.....	63
Figura 24-	Foto de gel não-desnaturante exemplificando a técnica de SSCP para o exon 8. Os indivíduos não apresentaram nenhuma alteração na migração.....	64
Figura 25-	Foto de um gel de SSCP. A flecha indica uma alteração de migração de um indivíduo na análise do exon 14.....	64
Figura 26-	Sequenciamento automático do exon 14 do indivíduo AF27. Houve a identificação de uma alteração neutra (1749T>C). Não alterou o aminoácido protéico (histidina para histidina).....	65

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença caracterizada por múltiplas anomalias congênitas, progressiva falha da medula óssea e alto risco para desenvolvimento de câncer. É denominada também de Síndrome da Instabilidade Cromossômica devido ao fato de suas células apresentarem hipersensibilidade a agentes indutores de quebras cromossômicas. A mais importante das características clínicas é a manifestação hematológica. A incidência da anemia aplástica, Síndrome Mieloplásica e Leucemia Mielóide Aguda é a maior responsável pela morbidade e mortalidade na AF. A incidência da AF em todo o mundo é de, aproximadamente, 3 por milhão. No Brasil não há dados sobre a prevalência da doença. Foram descobertos 12 grupos de complementação e descobertos, até o momento, 11 genes relacionados ao distúrbio. São eles: *FANCA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *I*, *J*, *L* e *M*. O trabalho teve como objetivo geral a análise das mutações principais (IVS8+2A>G, IVS11+1G>C, IVS3+1G>C e 1794_1803del10) do gene *FANCG* em pacientes com quadro clínico compatível com AF. Foram analisados 38 indivíduos por meio da técnica de PCR associada à digestão e triagem por SSCP e subsequente seqüenciamento. Nós encontramos um homozigoto para a mutação IVS8+2A>G e uma variante neutra (H482H). Concluímos com nosso estudo que, há uma heterogeneidade molecular em nosso meio; o DEB teste não é 100% eficaz na detecção de indivíduos com AF; o Teste de Complementação deve ser introduzido o quanto antes em nosso país para auxiliar no direcionamento da pesquisa para um determinado gene e minimizar os casos em que não há a confirmação de diagnóstico e, por último, há a necessidade de um Registro Brasileiro para AF com o objetivo de recolher informações clínicas e genéticas de indivíduos com o distúrbio.

ABSTRACT

Fanconi anaemia (FA) is an autosomal recessive disease characterised by congenital abnormalities, progressive bone marrow failure and high risk of developing cancer. It's called Chromosomal Instability Syndrome due to the fact of cells presents hypersensitivity to DNA cross-linking agents like mitomycin C and diepoxybutane. The most important clinical feature is hematologic. The incidence of aplastic anemia, myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia is the most important cause of morbidity and mortality in FA. 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 not data about prevalence of FA. It was discovered at least 12 complementation groups and eleven gene have been cloned: *FANCA*, *B*, *C*, *DI*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *I*, *J*, *L* e *M*. The study had as general objective the analysis of the main mutation (IVS8-2A>G, IVS11+1G>C, IVS3+1G>C e 1794_1803del10) of *FANCG* gene in patients with clinical features of FA. It was analysed 38 patients through the test polymerase chain reaction (PCR) associated with digestion and mutation screening by SSCP with posterior sequencing. Molecular analysis found a homozygote to IVS8-2A>G and a neutral variant (H482H). We concluded that there's a molecular heterogeneity in our region; it's necessary to introduce the use of complementary tests in Brazil, in order to address the molecular analysis and at last, it's necessary a Brazilian Fanconi Anemia Registry (BFAR) to receive clinical and genetics information of AF patients.

INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais

A Anemia de Fanconi (AF) foi descrita pela primeira vez em 1927 pelo pediatra suíço Guido Fanconi que descreveu uma forma familiar de anemia aplástica 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 da AF em todo o mundo é de, aproximadamente, 3-5 por milhão e a frequência de heterozigotos é estimada em 1 para 300 na Europa e Estados Unidos. A doença foi relatada em variados grupos étnicos e mutações têm sido descritas em judeus *Ashkenazi* com frequência da doença de 1 para 89 e, em nativos da África do Sul, de 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 é reduzida para, em média, 23 anos (0-38 anos) (Alter, 1996).

Dentre outras doenças associadas a aberrações cromossômicas estruturais e que possuem um espectro de características semelhantes à AF estão: Ataxia-Telangiectasia, Xeroderma Pigmentoso, Síndrome de Cockayne, Câncer Hereditário sem Polipose, Síndrome de Bloom, Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 e Síndrome de Nijmegen (Jorde et al., 2000; Tischkowitz e Hodgson, 2003).

1.2- Características clínicas

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

1.2A- Manifestações Físicas

Dentre as anomalias congênitas podemos destacar as do esqueleto como malformações dos polegares observadas em 39-55% dos casos. São elas: hipoplasia, ausência dos polegares ou ainda polegares supernumerários. 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) (de 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 algumas vezes, relacionado à deficiência de hormônio de crescimento ou hipotireoidismo, já que em um recente 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).

A baixa estatura, uma das principais características físicas da doença, é observada em mais de 60% dos indivíduos segundo Giampietro et al. (1993).

Concernente a malformações crânio-faciais o paciente apresenta micrognatia, microcefalia, base nasal ampla, fendas palpebrais estreitas e pregas epicânticas (Tischkowitz e Hodgson, 2003) (figura 2).

A mais comum das características físicas da AF é a anomalia cutânea devido à deposição de melanina em determinados locais. Ela consiste principalmente de manchas *café-au-lait* as quais são encontradas em 63-79% dos pacientes. 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. Outra anomalia cutânea é a hipopigmentação encontrada em 31% dos indivíduos, consistindo de manchas bem pequenas próximas umas das outras (de Kerviler et al., 2000; Smith et al., 1989) (figuras 1A e 1B).



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

Figura 1- Paciente portador de AF com alteração na implantação dos polegares e hipoplasia radial (A) e manchas *café-au-lait* na região do tronco (B).



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

Figura 2: Indivíduo com AF apresentando dismorfismos faciais.

Alterações nos níveis de glicose/insulina são muito comuns sendo que endocrinopatias adquiridas prejudicam ainda mais o crescimento (Tischkowitz e Dokal, 2004).

Surdez condutiva moderada é relativamente comum e pode ou não estar associada a malformações do ouvido externo (de Kerviler et al., 2000).

Anomalias nos rins 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 hipogenitalismo que afeta mais de 51% dos casos, hipospadia, sendo a infertilidade muito freqüente (Liu et al., 1991).

Anomalias menos encontradas são as gastrointestinais, cardíacas e do Sistema Nervoso Central (Kaplan et al., 1985).

Apesar dos pacientes apresentarem características em comum existe um amplo grau de variabilidade fenotípica (expressividade variável) entre famílias, como exemplificado por Koc et al. (1999) que descreveram quatro indivíduos afetados de duas famílias consanguíneas não relacionadas e 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 o mosaicismo somático seja a principal explicação para a variação fenotípica interfamiliar na AF.

O mosaicismo é definido como a presença, em um mesmo indivíduo, de duas ou mais linhagens celulares. Uma causa comum de mosaicismo é a não-disjunção em uma mitose pós-zigótica inicial (Nussbaum et al., 2002).

Enquanto os mosaicos somáticos apresentam fenótipo hematológico leve, isso não ocorre com os demais portadores (Lo Ten Foe et al., 1997).

Importante ressaltar que mais de um terço dos casos de AF não apresentam anormalidades congênicas 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 congênicas principais, sendo diagnosticados somente via análise citogenética e/ou molecular (Berger et al., 1993).

1.2B- Manifestações Hematológicas

A mais importante das características clínicas na AF é a hematológica responsável pela morbidade e mortalidade da doença. 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 no número de neutrófilos). Pancitopenia está presente tipicamente em crianças com idades entre cinco e dez anos, sendo a idade média de início de 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 é definida como sendo distúrbios hematológicos de cronicidade variável e pouco definidas que evoluem para leucemias agudas.

O termo pré-leucemia introduzido por Block et al. (1953) e utilizado para mielodisplasia, foi descrito por Linman et al. (1970) para 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), 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).

A incidência cumulativa de leucemia está em torno de 10% em indivíduos portadores com até 25 anos de idade, de acordo com vários estudos (Alter, 2003; Kutler et al., 2003; 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 (sete meses a 29 anos) e a incidência de leucemia foi de 30 % durante o período de acompanhamento dos pacientes (Rodriguez e Bertuzzo, 2005).

Auerbach e Allen (1991) realizaram uma análise de todos os pacientes com AF do Registro Internacional da Anemia de Fanconi (IFAR) e constataram uma incidência de leucemia 15000 vezes maior que a observada em crianças da população em geral. O IFAR, localizado na Universidade Rockefeller - Nova York - Estados Unidos, surgiu há vinte anos 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. Um outro estudo com 388 pacientes com AF realizado por Butturini et al. (1994), avaliou o 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).

1.2C- Anemia de Fanconi e o Surgimento de Neoplasias

Para os pacientes com AF que atingem a idade adulta, existe um risco 50 vezes maior de desenvolvimento de tumores comparado com a população geral, 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 são menos freqüentes como adenocarcinomas do estômago, tumores de mama, meduloblastomas, tumores de Wilms, linfomas, retinoblastomas e osteossarcomas (de 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 demonstrou que a anemia aplástica ocorre precocemente em indivíduos portadores (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 ocorrem 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 neoplasias 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. Nestas, não encontraram um aumento significativo de cânceres, ou 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 comprovaram 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, tais 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 tal característica, base para um teste diagnóstico eficaz (figura 4). 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 elas respondem notadamente por meio de quebras cromatídicas e intercâmbios cromatídicos, como quadriradial, o que as diferenciam de células controles que respondem a este tratamento, mas em uma porcentagem muito menor (Magdalena, 1999) (figura 3).

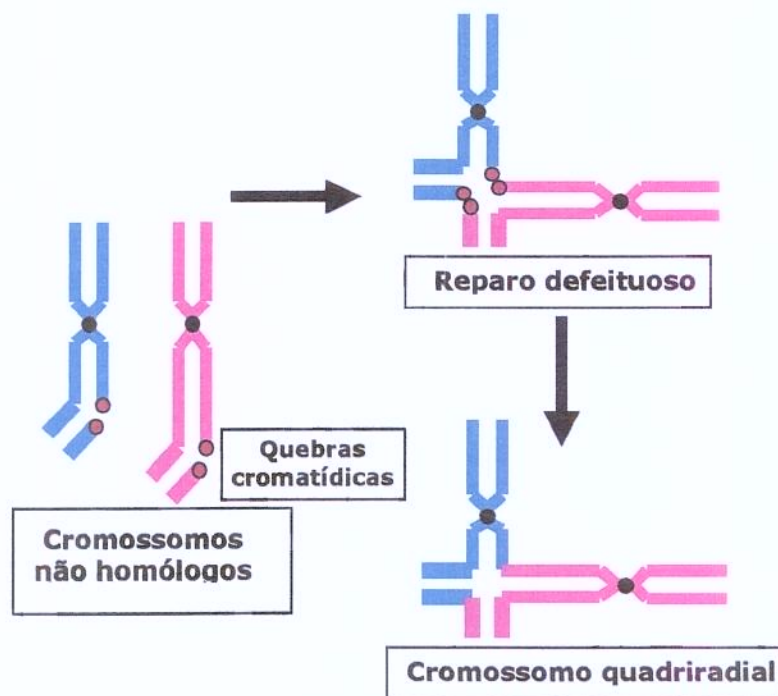
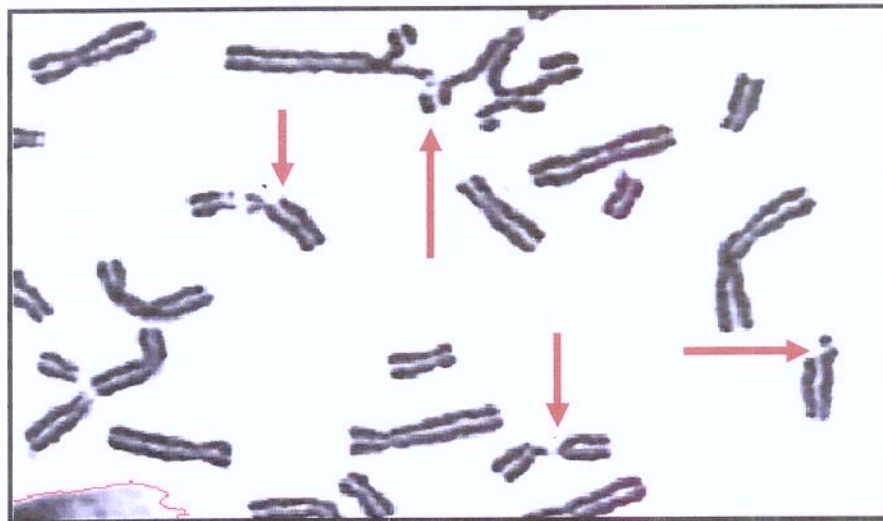


Figura 3- A figura representa quebras cromatídicas entre cromossomos não homólogos e conseqüente formação de cromossomos anômalos quadriradiais ocorrentes em células de indivíduos portadores (Adaptado de Joenje e Patel, 2001).

Mais de 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 e Bertuzzo, 2005).

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).



Fonte: Cortesia de Jack I. Spurbeck, Clínica Mayo, Rochester - Minnesota - EUA.
(spurbeck.Jack@mayo.edu)

Figura 4- Metáfase mostrando aberrações cromossômicas estruturais em indivíduos portadores de AF. As setas indicam os locais de quebras.

1.4- Testes diagnósticos e teste de complementação

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.

Em 1984 foi fundado um laboratório de referência para a realização do teste citogenético com a utilização do DEB na Universidade Rockefeller, Nova York, EUA. De acordo com o IFAR, os homozigotos 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 e Bertuzzo, 2005).

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

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).

No entanto, o mosaicismo somático, definido anteriormente, é o principal evento que acarreta dificuldades na interpretação diagnóstica em testes citogenéticos. Pode resultar da reversão do alelo patogênico em tipo selvagem em muitas células hematopoiéticas de indivíduos com o distúrbio. Como exemplo, podemos citar dois irmãos afetados em um estudo de Dokal et al. (1996), que apresentavam mutação no gene *FANCC* em DNA de sangue periférico mas somente um dos irmãos apresentou DEB teste positivo. Por isso a necessidade da realização do DEB teste em conjunto com a análise molecular.

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.

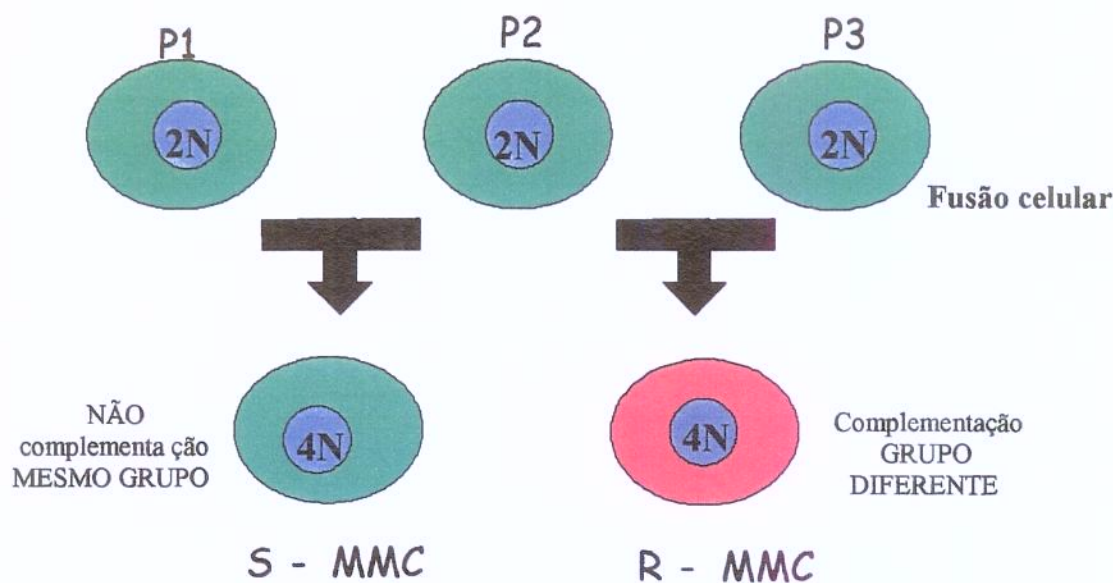
A citometria de fluxo, um segundo teste diagnóstico para o distúrbio, é baseado na mensuração do aumento da porcentagem de células na fase G2/M em culturas de células sanguíneas periféricas após sensibilização com mustarda nitrogenada. Esse teste foi desenvolvido por Berger et al. (1993).

Um terceiro teste relacionado à AF é o teste para análise do fenótipo celular denominado Teste de Complementação. Complementação é definido como sendo a correção de um dado fenótipo celular evidenciado por diferentes parâmetros; em se tratando da AF o parâmetro para evidenciar a correção do fenótipo celular é a sensibilidade das células a uma determinada substância clastogênica, tais como MMC (Rodriguez e Bertuzzo, 2005).

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 essa 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. Ocorrendo complementação do fenótipo, ou seja, surgimento de um híbrido 4n resistente à 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. (Zakrzewski e Sperling, 1980; Duckworth-rysiecki et al., 1985; Joenje et al., 1995; Joenje et al., 1997) (figura 5).

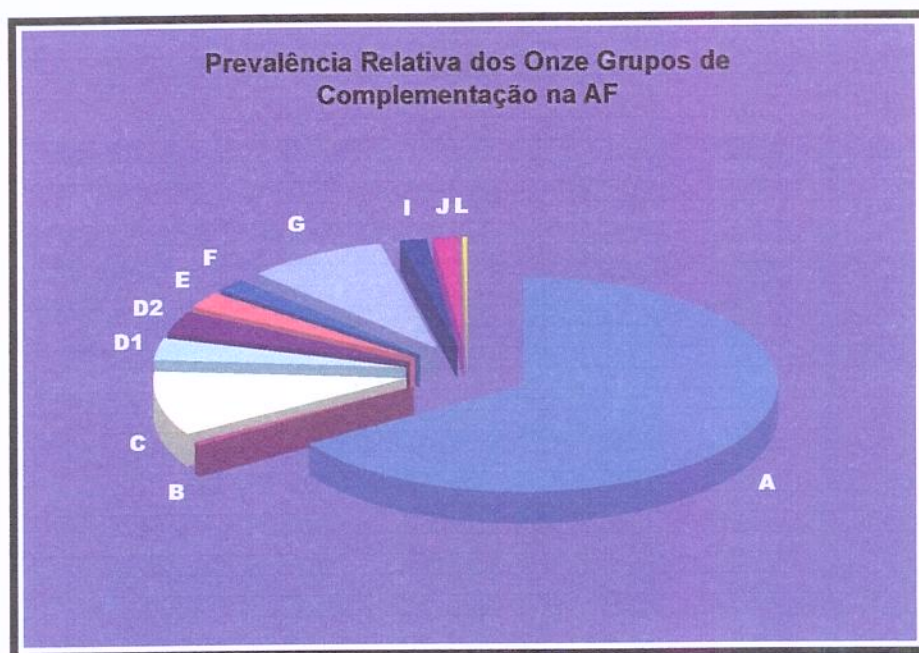
Por meio do teste de complementação e conseqüente correção da hipersensibilidade aos agentes clastogênicos utilizados, foram descobertos 12 grupos de complementação distintos: FAA, FAB, FAC, FAD1, FAD2, FAE, FAF, FAG, FAI, FAJ, FAL e FAM (Levitus et al., 2005; Meetei et al., 2005).



Fonte: Adaptado de Joenje e Patel (2001).

Figura 5- Teste de Complementação utilizando células de três indivíduos com AF (P1, P2 e P3). A fusão de P1 com P2 não levou a correção do fenótipo celular (sensibilidade à MMC), portanto são pertencentes ao mesmo grupo de complementação. Já no segundo caso (entre P2 e P3) ocorre a 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 a grupos distintos. S - sensível; R – resistente

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; Kutler et al., 2003).



Fonte: Adaptado de Levitus et al. (2004).

Figura 6- Resultados baseados na análise de 241 famílias classificadas pelo EFARP (European Fanconi Anaemia Research Programme – 1994 a 2003). O número absoluto por grupo é: A-159, B-2, C-23, D1-8, D2-8, E-6, F-5, G-21, I-4, J-4 e L-1.

1.5- Genética e Anemia de Fanconi

Em 1976, Schroeder et al., 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 heterogeneidade genética.

Foram identificados, até o momento, onze genes (*FANCA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *J*, *L* e *M*) pertencentes a seus grupos de complementação, comprovando, dessa maneira, a grande heterogeneidade genética na AF (tabela 1) (Savino et al., 2003; Soulier et al., 2005).

O primeiro gene a ser clonado foi o gene *FANCC* por Strathdee et al. (1992) e está localizado no braço curto do cromossomo 9, região 22.3. Apresenta 1.674 pb codificadores divididos em 14 exons. Os exons apresentam de 53 a 201 pb de tamanho (figura 7).

O gene codifica uma proteína de 63.000 daltons. 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 et al., 1998; Rodriguez, 2003).

A mutação mais freqüente é a IVS4+4A>T a qual leva a uma alteração do sítio de splice (processamento) e conseqüente deleção do exon 4. Essa mutação é particularmente prevalente em judeus *Ashkenazi* com uma freqüência de portadores de 1 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 prevalente é a $\Delta G322$ a qual resulta em fenótipo leve. 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).

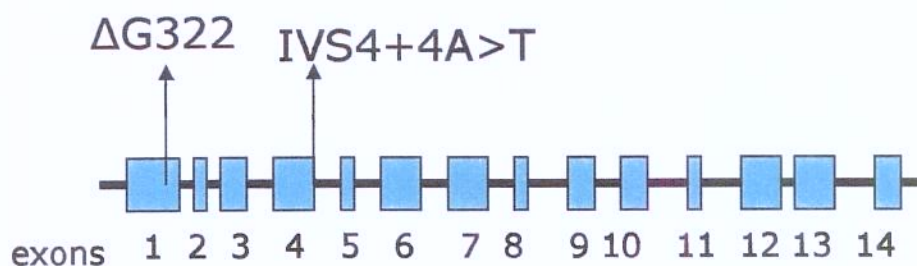


Figura 7- Representação do gene *FANCC* com seus éxons (retângulos azuis) e a localização das duas principais mutações: IVS4+4A>T ocorrente no início do intron 4 e a mutação $\Delta G322$ no éxon 1.

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

O gene *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 exons que variam de 34 a 188 pb (Rodriguez e Bertuzzo, 2005) (figura 8).

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

O gene *FANCE* (OMIM 600901), mapeado por Waisfisz et al. (1999), está localizado no braço curto do cromossomo 6, região 21.22. Essa 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 exons e codifica uma proteína de 536 aminoácidos (de Winter et al., 2000b) (figura 9).

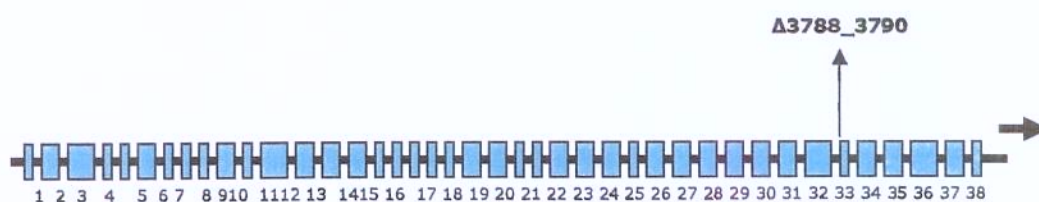


Figura 8- Representação do gene *FANCA* com seus 43 exons e a localização da principal mutação: $\Delta 3788-3790$ no exon 38.

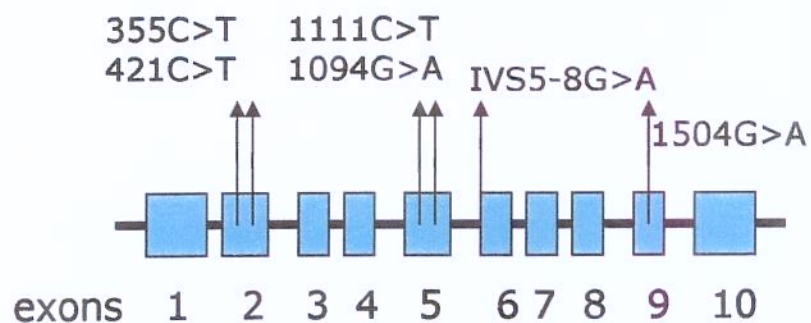


Figura 9- Representação do gene *FANCE* com seus 10 exons e as principais mutações: 355C>T e 421C>T localizadas no exon 2, 1111C>T e 1094G>A no exon 5, a IVS5-8G>A localizada no final do intron 5 e a 1504G>A no exon 9.

O gene *FANCF* (OMIM 603467) foi descoberto por de Winter et al. (2000a) e está localizado no braço curto do cromossomo 11 região 15. Codifica uma proteína de 374 aminoácidos a qual é homóloga a procariótica proteína de ligação a RNA denominada ROM (figura 10).

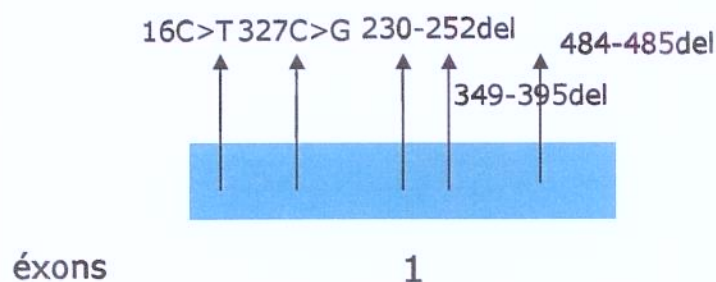


Figura 10- Representação do gene *FANCF* com seu único exon e a localização das principais mutações: 16C>T, 327C>G, 230-252del, 349-395del e 484-485del.

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 função do complexo da AF no reparo de DNA. O gene, constituído de 44 éxons, está localizado no braço curto do cromossomo 3 região 25.3 (figura 11).

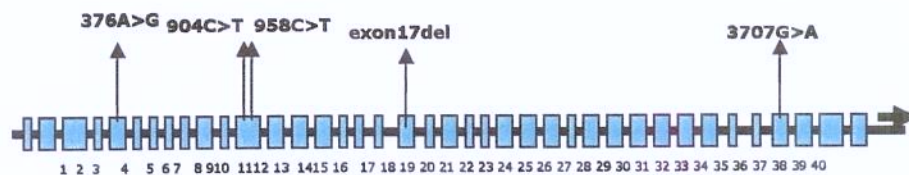


Figura 11- Representação do gene *FANCD2* com seus 44 éxons e a localização das principais mutações descritas: 376A>G no éxon 5, 904C>T e 958C>T no éxon 12, exon17del no éxon 18 e 3707G>A localizada no éxon 37.

Estudo recente de Howlett et al. (2002) demonstrou ser o gene *FANCD1* o próprio gene *BRCA2*. A sequência do *BRCA2* foi determinada em um paciente pertencente ao grupo D1 de complementação e mostrou a presença de duas mutações truncadas. O interessante é que homozigotos do gene *BRCA2* nunca foram descritos, uma vez que acreditava-se que esta combinação fosse 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., 2003b; Rodriguez e Bertuzzo, 2005; Stewart e Elledge, 2002; van der Heijden et al., 2003; Wang e D'Andrea, 2004) (figura 12).

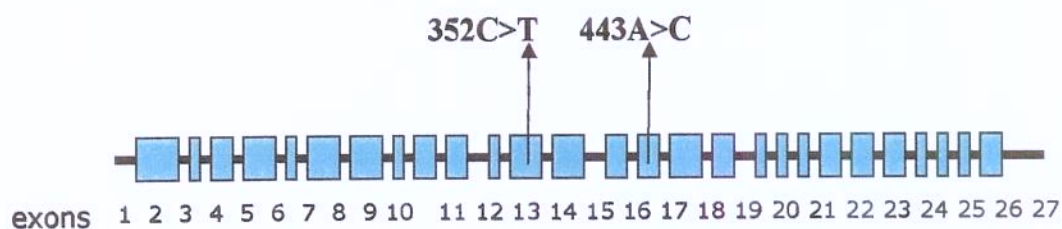


Figura 12- Representação do gene *FANCD1* com seus 27 exons e localização das principais mutações descritas: 352C>T no exon 12 e 443A>C no exon 15.

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).

FANCI (OMIM 609053) foi relatado em janeiro de 2003 mas não apresenta publicações em relação a mutações descritas (Levitus et al., 2004).

O gene *FANCL* (ou PHF9 - OMIM 608111), que codifica a proteína FAAP43, foi clonado por Meetei et al. (2003a). Esta, por sua vez, codifica uma proteína que possui atividade E3 ubiquitina ligase *in vitro* e é essencial para monoubiquilação de *FANCD2* *in vivo*. Está localizado no braço curto do cromossomo 2, região 16.1 (figura 13).



Figura 13- Representação do gene *FANCL* com seus 14 exons e a localização da mutação descrita: exon11del.

Descoberto em 2004 por Meetei et al., o gene que codifica a proteína FAAP95, o gene *FANCB* (figura 14), inesperadamente está localizado no braço curto do cromossomo X, região 22.31 e 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.

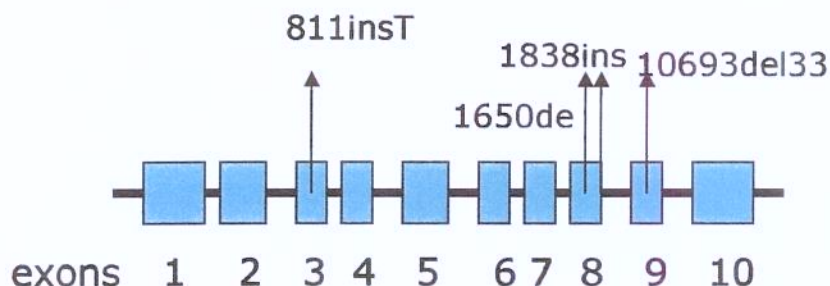


Figura 14- Representação do gene *FANCB* com seus 10 exons e a localização das mutações descritas: 811insT no exon 3, 1650delT e 1838delT no exon 8 e 10693del3314 no exon .

O gene *FANCI* (OMIM 609054), denominado também de BRIP1 e BACH1, foi descoberto por Levan et al. (2005), localiza-se em 17q22.24 e apresenta 20 exons. A proteína FANCI liga-se diretamente à BRCA1 no reparo de DNA por recombinação homóloga. Não apresenta até o momento relatos de mutações (Levan et al., 2005).

O gene *FANCF*, está localizado em 14q21.3 e é constituído de 11 exons codificantes. Produz uma proteína, a FAAP250, de 142 KD. Sem publicações sobre o gene (Meetei et al., 2005).

Tabela 1 – Características principais dos genes relacionados à AF (Adaptado de Wang e D’Andrea, 2004).

Subtipo	Localização Cromossômica	Produto Protéico(kD)	Nº éxons
A	16q24.3	163	43
B	Xq22-31	95	10
C	9q22.3	63	14
D1	13q12-13	384 (BRCA2)	27
D2	3p25.3	155.162	44
E	6p21-22	58	10
F	11p15	42	1
G	9p13	68(XRCC9)	14
J	17q22-24	141	20
L	2p16.1	43(E3 Ubiquitin Ligase PHF9)	14
M	14q21.3	142	11

Análises de mutações em genes responsáveis pela AF têm sido realizadas por países ocidentais, de acordo com The Rockefeller University - Fanconi Anemia Database.

Resultados de estudos a respeito das mutações no *FANCC* e *FANCA* foram anteriormente relatados em pacientes do IFAR e recentes estudos sobre rastreamento de mutações no *FANCG*. (Auerbach et al., 2003; Gillio et al., 1997; Kutler et al., 2003; Verlander et al., 1995).

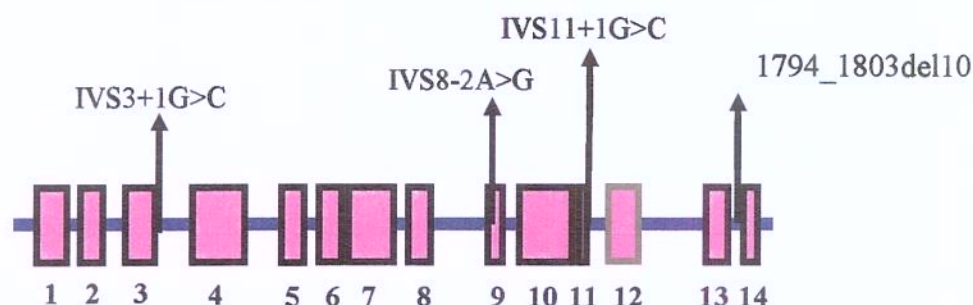
Como citado anteriormente, a mutação *IVS4+4A>T* no gene *FANCC* é altamente prevalente em judeus da população *Ashkenazi*. Interessantemente, essa mutação é a mais prevalente na população japonesa. Entretanto, o fenótipo é menos grave comparado ao da população *Ashkenazi*, sugerindo que genes modificadores de uma etnia específica ou fatores ambientais influem na gravidade do fenótipo (Tischkowitz e Hodgson, 2003).

Outro exemplo de mutação relacionada à etnia é a população da África do Sul. Caracterizada pela alta incidência da doença, quase todos os pacientes apresentam mutações no gene *FANCA*. Esta alta frequência de mutações encontradas foi atribuída ao efeito fundador, determinado em 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).

1.5A- *FANCG*

O gene responsável pelo grupo de complementação G, *FANCG* (OMIM602956) foi o terceiro a ser clonado por Saar et al. (1998) e foi descoberto, por de Winter et al. (1998), ser idêntico a sequência cDNA no GenBank (AJ007669) para XRCC9 humano. O gene está localizado no braço curto do cromossomo 9, região 13 (9p13) (figura 15).

O gene tem 5,42Kb sendo 1869 bp codificantes que estão divididos em 14 éxons (figura 15). A proteína codificada possui 622 aminoácidos, a qual não apresenta similaridade em sua sequência com nenhuma outra proteína conhecida que pudesse revelar uma possível função molecular para *FANCG*/XRCC9 (Auerbach et al., 2003; National Center for Biotechnology Information)



Fonte: Adaptado de Yagasaki et al., 2003.

Figura 15- Gene *FANCG* e sua estrutura com 14 éxons representados por retângulos e os introns por barras delgadas. As quatro mutações principais estão indicadas na figura: IVS3+1G>C no início do intron 3, a IVS8-2A>G no início do intron 8, a IVS11+1G>C no início do intron 11 e uma deleção de 10 pares de bases localizada o início do exon 14.

Desde a clonagem do gene, uma quantidade significativa de pesquisas foi realizada sobre ele. Em dois descendentes de uma família de libaneses consanguíneos, de Winter et al. (1998) concluíram que a AF era causada por homozigose para a mutação *IVS13-1G>C* no sítio acepor de splice. Em outro paciente, agora de etnia alemã, a mutação *313G>T* foi

identificada em ambos os alelos. Os pais e o irmão, desse indivíduo, eram heterozigotos não afetados para a mutação no gene *XRCC9/FANCG*. A mesma mutação estava presente, também, em um dos alelos em dois casos de heterozigotos compostos. Esses três pacientes tinham ascendência alemã, sugerindo um efeito fundador.

Em 2000, Demuth et al. detectaram, em estudo com nove pacientes alemães, a mesma transversão *313G>T* em oito dos 18 alelos mutados. Análise de ligação utilizando-se marcadores microsatélites indicou um haplótipo ancestral comum. A mutação *313G>T* no gene *FANCG* é responsável por, aproximadamente, 40% dos alelos mutados dos pacientes com AF na Alemanha. Neste mesmo trabalho, Demuth et al. (2000) identificaram, ao todo, 18 diferentes mutações no *FANCG* em um grupo de 20 pacientes com suspeita de mutações em *FANCG*, quatro das quais foram relatadas previamente por de Winter et al. (1998). Utilizando-se as técnicas de PCR e seqüenciamento, o grupo identificou 39 de 40 alelos mutantes. Muitas das mutações (94%) eram mutações do tipo sem sentido, as quais dariam origem a proteínas truncadas, e somente uma mutação de sentido trocado foi identificada.

Neste mesmo ano, Yamada et al. identificaram duas novas mutações no gene *FANCG*, *IVS3+1G>C* e *1066C>T*, que causavam produção de RNA aberrante em dois pacientes de AF. No total, 14 dos 20 pacientes japoneses não classificados pertenciam ao grupo FA-A, 6 ao grupo FA-G e nenhum pertencia ao FA-C. Em estudo recente, Yagasaki et al. (2003) analisaram 45 famílias com casos de AF no Japão e identificaram mutações nos dois alelos do *FANCG*. Essas mesmas mutações também foram relatadas por eles e acometem a maioria dos pacientes com AF da população japonesa (de Winter et al., 1998; Demuth et al., 2000).

Auerbach et al. (2003), estudaram uma gama de mutações *FANCG* em 307 pacientes de raças e etnias diversas do IFAR. As mutações no *FANCG* mais comuns nas populações do registro internacional foram: *IVS8-2A>G*, *IVS11+1G>C*, *IVS3+1G>C* e *1794_1803del10*.

Foram descobertas em torno de 26 mutações no gene *FANCG*. As mutações até o momento descritas estão listadas na tabela 2. Até o momento foram relatadas mutações do tipo inserção ou deleção ocorrentes no exon 14 de acordo com Auerbach et al (2003), nenhuma alteração de sentido trocado.

Tabela 2- Mutações descritas no gene *FANCG*.

Alteração no nucleotídeo	Tipo de mutação	Localização
INSERÇÃO/DELEÇÃO		
156_157insG***	F	Exon 2
219_220insT***	F	Exon 3
244_245insG*	F	Exon 3
[582A>C;583_584delTT]***	F	Exon 5
1008_1009insA***	F	Exon 8
[1182T>C;1183_1192del10]**	F	Exon 10
1310_1311insGA**	F	Exon 10
1593delC***	F	Exon 12
1649delC**	F	Exon 13
1794_1803del10***	F	Exon 14
1771_1772insC***	F	Exon 14
<i>Sem-sentido(nonsense)</i>		
118C>T***	Q40X	Exon 2
313G>T#	E105X	Exon 4
565G>T***	E189X	Exon 5
572T>G***	L191X	Exon 5
1066C>T ⁿ	Q356X	Exon 8
1642C>T**	R548X	Exon 13
<i>Processamento (splicing)</i>		
IVS3+1G>C ⁿ	S	Íntron 3
IVS5+1G>T**	S	Intron 5
IVS8-2A>G**	S	Intron 8
IVS9+5G>A***	S	Intron 9
IVS9-1G>C**	S	Intron 9
[IVS9-10C>A;IVS9-11T>G]***	S	Intron 9
IVS11+1G>C#	S	Intron 11
<i>Sentido trocado (Missense)</i>		
65G>C***	R22P	Exon 1
908T>C***	L303P	Exon 7
1562G>A***	G521E	Exon 12

Fonte: #de Winter et al, 1998; **Demuth, et al, 2000; *Yamada et al, 2000; *Nakanishi et al, 2001; ***Auerbach et al, 2003. OBS: F: frameshift - mudança de matriz de leitura; S: splicing – processamento

A AF tem grande relevância médica em vista de suas graves consequências anátomo-funcionais. O tratamento clínico é complicado devido à idade variável de início e à gravidade dos sintomas hematológicos. Avanços recentes na compreensão da biologia molecular da AF têm proporcionado a investigação da relação entre o genótipo, e a natureza e gravidade do fenótipo clínico.

Devido a isso, o reconhecimento de mutações no gene *FANCG*, bem como de suas variantes mutacionais, é de grande utilidade para alcançar um diagnóstico detalhado e preciso ajudando no esclarecimento das possíveis e variadas causas 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

1.6- Função das Proteínas

Em relação a proteínas codificadas pelos genes relatados, a ampla similaridade fenotípica entre os indivíduos dos diferentes grupos de complementação da AF nos 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 manutenção (*caretaker*) por causa de duas características da doença: as células 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 é 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 delas.

Evidências recentes indicam que um complexo central e nuclear composto por FANCA, B, C, E, F, G, I, M e, juntamente com FANCL, leva à ativação de FANCD2-S em FANCD2-L monoubiquilado. Isso é desencadeado pelo dano ao DNA. Sugerem também 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 de subunidade, a sua função permanece desconhecida. Pesquisas ainda 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 purificado (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 (Garcia-higuera, 2001).

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 monoubiquilação de FANCD2 se dá na lisina 561 (lis561) (K61). Esta lisina é conservada em muitas proteínas FANCD2 eucarióticas, por exemplo em *A. thaliana*, *C. elegans* e *D. melanogaster*, 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 monoubiquilação, 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 na 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 na fase S do ciclo celular (figura 16) (Couzin, 2003; D'Andrea e Grompe, 2003; Meetei et al., 2004; Nakanishi et al., 2002; Taniguchi et al., 2002; Wang e D'Andrea, 2004; Zhang et al., 2004; Taniguchi e D'Andrea, 2006).

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 apresentam fenótipo semelhante a 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 é responsável pela monoubiquilação de FANCD2 que atuam sobre proteínas 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 checkpoint (ponto de checagem) na fase S do ciclo celular, enquanto 3) em resposta a MMC, a NBS1 reúne-se em um mesmo *foci* nuclear com MRE11/RAD50 e FANCD2 (Venkitaraman, 2003).

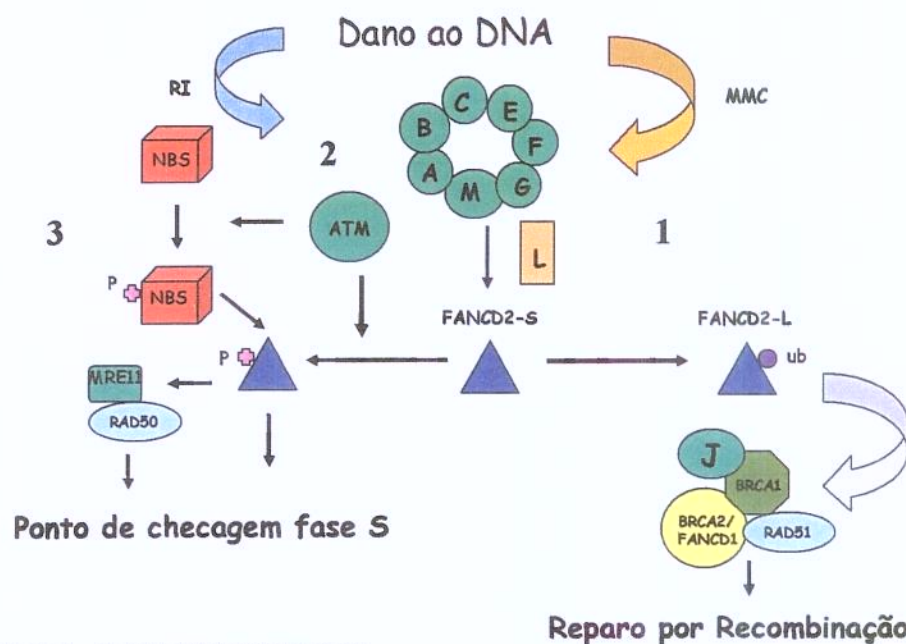
A descoberta de que *FANCD1* é, de fato, *BRCA2* indica que os passos envolvidos na susceptibilidade ao câncer de mama e AF são interconectados em mais de um nível (D'Andrea e Grompe, 2003; Witt e Ashworth, 2002).

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 trabalhem em uma rede de processos e não como simplesmente uma sequência linear de eventos na proteção contra aberrações cromossômicas estruturais (Venkitaraman, 2004).

Devido a heterogeneidades clínica e genética, seriam necessários maiores estudos a respeito das bases moleculares da AF.

No Brasil, em trabalho recente intitulado: “Estudo Molecular da Anemia de Fanconi” (Rodriguez e Bertuzzo, 2005), pacientes foram triados através da análise clínica e posteriormente analisados para a presença de mutações nos genes *FANCA* e *FANCC*. No entanto, a maioria dos pacientes (57,7%), apesar da clínica compatível, não apresentou mutações nestes genes. Considerando que mutações no gene *FANCG* acometem 10% dos portadores de AF no mundo e levando em consideração as consequências hematológicas prematuras, torna-se relevante a análise deste gene na população brasileira.



NAKANISHI *et al.*, 2005; TISCHKOWITZ, 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. ub- adição de uma ubiquitina (ubiquitilação); P- adição de um fósforo (fosforilação); RI- radiação ionizante;

1.7- Terapêutica e Perspectivas para o Futuro

Em um estudo genótipo/fenótipo realizado por Faivre *et al.* (2000), foram analisados os grupos de complementação em 245 pacientes, este grupo de pesquisa demonstrou que indivíduos que apresentavam mutações no *FANCG* e *FANCA* tinham um início precoce de anemia e incidência maior de leucemia.

Desta forma, os pacientes com mutações *FANCG* e *FANCA* parecem constituir grupos de alto risco, com anomalias hematológicas de início precoce e, portanto, ambos deveriam ser candidatos a monitoramento frequente e intervenção terapêutica precoce, como transplante de medula. Devido a isso existe uma grande necessidade de se detectar o quanto antes mutações em *FANCA* e *FANCG* (Reuter *et al.*, 2003).

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. Importante a tipagem de imunohistocompatibilidade (HLA) em antecipação a um possível transplante de medula (Tischkowitz e Hodgson, 2003).

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 (Tischkowitz e Hodgson, 2003).

Caso não existam distúrbios hematológicos no momento do diagnóstico, monitoramento deve ser exigido uma vez por ano, pois à medida que indivíduos tornam-se mais velhos, complicações hematológicas podem surgir. Muitos pacientes que desenvolvem inicialmente falhas na medula óssea respondem a medidas de suportes como transfusões sanguíneas, androgênios e citocinas (Rackoff, 1999).

Os androgênios são usados terapeuticamente pois eles aumentam a produção e secreção urinária de eritropoietina acarretando em aumento da produção celular pela medula óssea. Citocinas, G-CSF e GM-CSF podem aumentar a hematopoiese em conjunto com andrógenos. Não podem ser usados em pacientes com anomalias citogenéticas clonais como leucemia (Pavlatos et al., 2001).

Eventualmente muitos pacientes recorrem a transplante de células-tronco hematopoéticas (TCH) (Tischkowitz e Hodgson, 2003)

Transplante de células-tronco é o único tratamento curativo para restaurar a hematopoiese e prevenir a ocorrência de leucemia. Sangue de cordão umbilical é uma fonte alternativa de células-tronco hematopoéticas (Bielorai et al., 2004).

Gluckman et al. (1989) foram os pioneiros na realização do TCH em uma criança com AF.

Em trabalho recente, Bielorai et al. (2004) utilizaram diagnóstico pré-implantação na 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.

A Anemia de Fanconi é uma doença candidata a 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).

A utilização de vetores lentivirais em camundongos *knockout* têm oferecido resultados promissores; transdução eficiente pode ser alcançada utilizando dose viral baixa, sem pré-estimulação de citocinas e mínima estimulação *in vivo* e são comprovadamente melhores do que os retrovírus previamente utilizados (Croop, 2003).

OBJETIVOS

2A- Objetivo geral

- Identificar as mutações do gene *FANCG* em pacientes com quadro clínico de Anemia de Fanconi.

2B- Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência das mutações IVS8-2A>G, IVS3+1G>C, IVS11+1G>C e 1794_1803del10 no gene *FANCG* em pacientes com suspeita clínica de Anemia de Fanconi.
- Triar mutações no gene *FANCG*, por meio da técnica SSCP, em pacientes que não apresentarem as mutações conhecidas estudadas;

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3A- Casuística

Foram analisados 38 indivíduos com Anemia de Fanconi, com idades entre 0,123 (45 dias) e 32 anos, escolhidos através de uma triagem realizada nos Ambulatórios de Genética Médica do Hospital das Clínicas/UNICAMP, nos ambulatórios de Hematologia e casos que nos foram enviados de diversos hematologistas. A amostra é constituída de 30 caucasóides, 5 negros e 3 pardos com 22 mulheres e 16 homens. Grande parte dessa amostra (78%) foi utilizada no estudo anterior dos genes *FANCA* e *FANCC* (Rodriguez e Bertuzzo, 2005). A análise citogenética por meio da cultura de linfócitos com o agente clastogênico diepoxibutano (DEB), foi realizada pelo Laboratório de Citogenética do Hemocentro, coordenado pela Profa. Dra. Carmen Sílvia Passos Lima. O DEB teste foi positivo em 37 indivíduos variando de 2 a 4 aberrações por célula. Os critérios de inclusão foram: quadro clínico sugestivo de AF, DEB teste positivo e indivíduos que concordaram em participar da pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1).

3B- Métodos

O método utilizado para a realização do trabalho foi a análise molecular por PCR (SAIKI et al, 1989) associada à digestão enzimática. Nos casos em que não foram encontradas as mutações estudadas pela técnica acima, foi realizada uma triagem de mutações por meio da técnica de SSCP e sequenciamento.

3B.1- Extração de DNA de linfócitos periféricos utilizando-se LiCl (Cloreto de Lítio) e Proteinase K

Foram retirados assepticamente 5 ml de sangue venoso de cada um dos pacientes, preparadas as alíquotas e extraídos os DNAs (ANEXO 2).

3B.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 sequência 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 sequências. A amostra de DNA é misturada em uma solução com os iniciadores e, logo em seguida, são realizados, em um aparelho ciclador de temperatura, 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 sequência de DNA alvo.

A reação da PCR para análise das mutações, foi realizada em volume total de 50 µl, com a seguinte concentração de reagentes: 36,5 µl água de injeção; 5,0 µl tampão 10 x; 2,0 µl MgCl₂ 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 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.

Tabela 3- Produtos da reação de amplificação para as diferentes mutações, sequência dos primers e temperaturas de anelamento.

Mutações estudadas	Sequência dos Iniciadores ou desencadeadores	T (°C) Hibridização	Produto da PCR(bp)
“Forward” e “Reverse” 5’ – 3’			
IVS8-2A>G	9F: TCCTCAGGGCCCATGAACATCCAT	60	297
	9R: TGGGCCCCCAGACTGGACCAAAAG		
1794_1803del10	14F: TGAACACTGAAAGCGGGGGTATGG	59	283
	14Rb: TCCTAATGATGGTGAAGCAGAA		
IVS11+1G>C	11F: AGAGGGGGTGTGGAGGGATGATTT	51	250
	11R: GTCTTCCCAGCCTCACAGTCACCA		
IVS3+1G>C	3F: TCTCTGAGTTGGGATTTTATTG	56	385
	3R: TGTTGTTTATCCTCCCATCTCC		

Fonte: de Winter et al., 1998; Yamada et al., 2000; Auerbach et al., 2003;

Para detecção da mutação IVS8-2A>G utilizamos análise de sítio de restrição com a enzima Dde I (tabela 4). Houve a amplificação de um fragmento de 297 pb. A enzima Dde I reconhece três sítios (C/TNAG) ao longo do exon 9 (posições 32, 47 e 106). A mutação elimina o sítio de restrição na posição 106. Depois da digestão, um indivíduo normal apresentará uma banda visível de 191 pb e outra de 59 pb. Um homozigoto para a mutação terá uma única banda de 250 pb e, um heterozigoto, o qual apresenta um alelo normal e o outro mutante, as três bandas (figura 17).

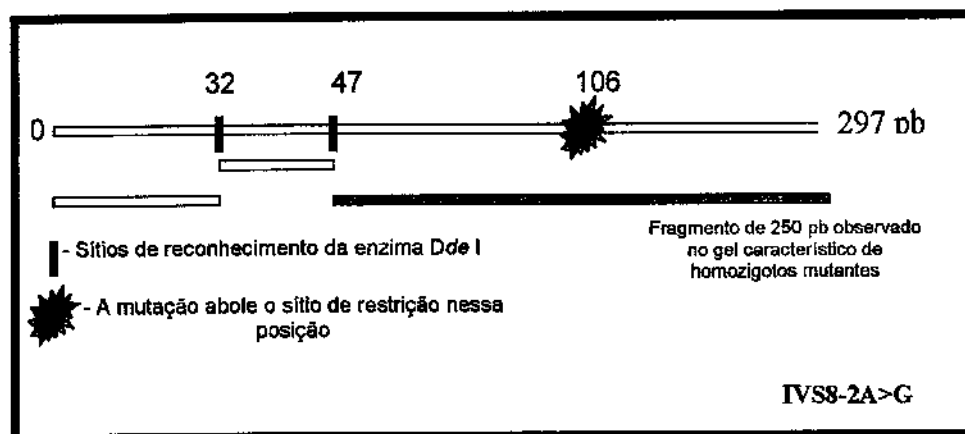


Figura 17- Representação esquemática da atuação da enzima Dde I na clivagem do fragmento amplificado de 297 pb na PCR para análise da mutação IVS8-2A>G. A mutação abole o sítio de restrição na posição 106, dando origem a um fragmento de 250 pb observado no gel de acrilamida 12%.

A reação de digestão consistiu em adicionar uma unidade de enzima Dde 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 IVS11+1G>C utilizamos a mesma técnica descrita anteriormente, porém utilizando a enzima Hph I para clivagem do DNA (tabela 4). A enzima reconhece dois sítios de restrição na sequência normal nas posições 37 e 130. O amplificado após a PCR apresenta 250 pb. A mutação IVS11+1G>C abole o sítio de restrição na posição 120, dando origem a dois fragmentos, um de 37 pb e outro de 213 pb (figura 18). Após a digestão um indivíduo normal apresentará bandas de 93 e 120 pb visíveis no gel. Um indivíduo afetado apresenta uma banda única de 213 pb e um heterozigoto as bandas de 93, 120 e 213 pb. Importante ressaltar que o fragmento de 37 pb, por ser muito pequeno, não aparece no gel após migração eletroforética.

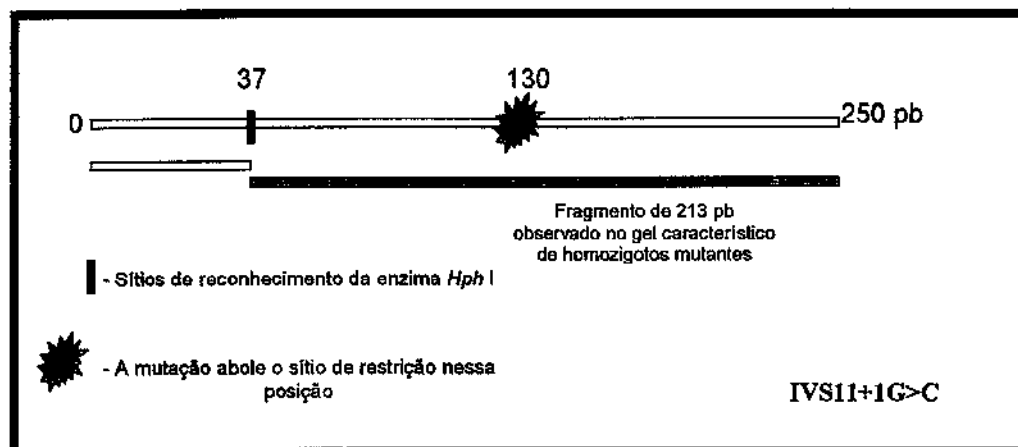


Figura 18- Representação esquemática da atuação da enzima *Hph* I na clivagem do fragmento amplificado de 250 pb na PCR para análise da mutação IVS11+1G>C. A mutação abole o sítio de restrição na posição 130, dando origem a um fragmento de 213 pb observado no gel de acrilamida 12%.

Na reação de digestão foi adicionado uma unidade da enzima *Hph* 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 *Dde* I para detecção da mutação IVS3+1G>C (tabela 4). Houve a amplificação de um fragmento de 385 pb. A enzima não reconhece nenhum sítio na sequência normal. A mutação adiciona um sítio de restrição na posição 249 pb desta sequência, dando origem a dois fragmentos, um de 249 pb e outro de 136 pb. O indivíduo que apresenta os dois alelos com a mutação apresentará duas bandas visíveis no gel, 136 e 249 pb (figura 19). O heterozigoto três bandas, 136, 249 e 385. O indivíduo normal uma banda única de 385 pb.

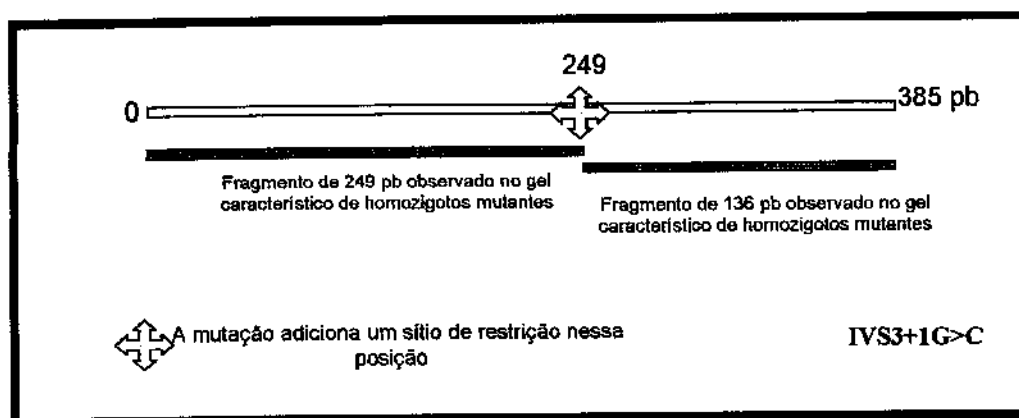


Figura 19- Representação esquemática da atuação da enzima DdeI na clivagem do fragmento amplificado de 297 pb na PCR para análise da mutação IVS8-2A>G. A mutação adiciona um sítio de restrição na posição 106, dando origem a um fragmento de 250 pb observado no acrilamida 12%.

Para análise da mutação 1794_1803del10 utilizamos somente a PCR já que se trata de uma deleção de 10 bp no início do éxon 14, facilmente visível em gel de agarose 3% (figura 20). Os primers, flanqueando a mutação, desencadearam a amplificação de uma região de 273 pb para o indivíduo mutante e 283 pb para o normal (tabela 4).

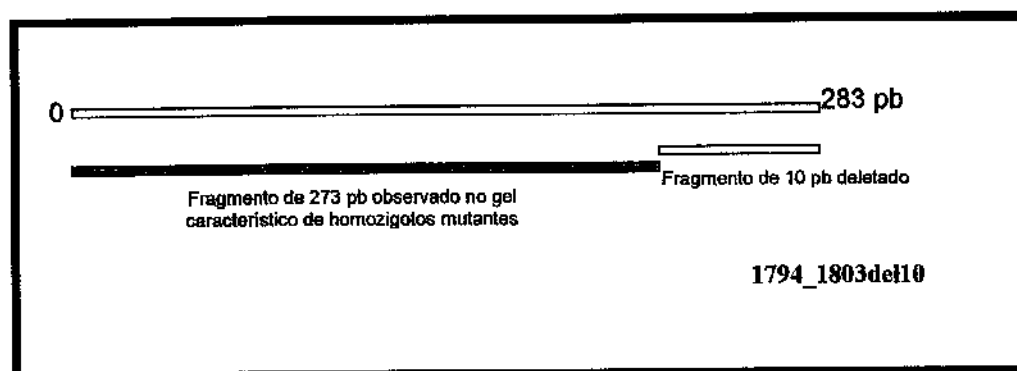


Figura 20- Representação esquemática do ocorrente na mutação 1794_1803del10. Um fragmento de 273 pb aparece no gel de agarose 3% quando o indivíduo é homozigoto mutante.

Tabela 4- Temperaturas de incubação e tamanhos dos fragmentos observados nas diferentes mutações após digestão com enzimas de restrição específicas.

Mutações estudadas	Enzima de restrição	T (°C) Incubação	Fragmentos mutantes (bp)	Fragmentos normais (bp)
IVS8-2A>G	Dde I	37	250	59+191
IVS11+1G>C	Hph I	37	213	93+120
IVS3+1G>C	Dde I	37	249+136	385

Fonte: Yamada et al., 2000; de Winter et al., 1998; Auerbach et al., 2003

3C.3- Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Após análise das principais mutações por digestão enzimática, os pacientes que apresentaram resultados negativos para as mesmas foram analisados 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 intermoleculares 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 5) 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% e volume final contendo 5% de glicerol. A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente. O padrão das bandas foi detectado por coloração de prata.

Tabela 5- Primers dos 14 éxons do gene FANCG que foram utilizados na amplificação dos fragmentos para SSCP e suas temperaturas de anelamento e tamanhos em bp.

Exon	Seqüência dos Iniciadores ou Desencadeadores “Forward” (5’ > 3’) e “Reverse” (5’ > 3’)	T°C Anelamento	Produto da PCR (pb)	Nome Primer
1	F: GGCCAGCTTCACCCITCCTAAGTC R: AAACCCGCTTTCAGGGATCTTGAG	61	198	1F-1R
2	F: AGATGGGGAGGGACTGAGCTTGAC R: TCCCTGCCCCGAGTAATTATATCGC	60	315	2F-2R
3	F: TCTCTGAGTTGGGATTTTATTTG R: TGTTGTTTATCCTCCCATCTCC	56	290	3F-3R
4	F: GTGTGGGGAGATGGAGGATGAGG R: GGAGGAGGAAGGAAGGAGGAGACC	60	326	4F-4R
5	F: GAGATAGGAGAAGACGGGGAGGTT R: CATGATGGGGAACAAGGGTCTAAG	59	311	5F-5R
6	F: TCTTAGACCCTTGTTCCCCATCAT R: GGCCTCAGCTACCCTTACAAA	57	283	6F-6R
7	F: TAAGGGTAGCTGAGGCCCGTGTCC R: TCAAGTCACCCCATCACAAGCACC	60	252	7F-7R
8	F: GGGTGGAGGATTCCTGAGGTGTTT R: TCCCCAAGTACCAAGAACAAAAG	59	358	8F-8R
9	F: TCCTCAGGGCCCATGAACATCCAT R: TGGGCCCCCAGACTGGACAGAC	60	297	9F-9R
10	F: AGAGGTTGGGGATGGTGGCTCATG R: AGCCGGGACATCTTGGGTAGCAGA	60	219	10AF-10AR
10	F: TCAGCCGCACATCATCTCTGCTAC R: CAGGGGTGAAGAGGAATCAATCTTC	59	293	10BF-10BR
11	F: AGAGGGGGTGTGGAGGGATGATTT R: GTCTTCCCAGCCTCACAGTCACCA	61	338	11F-11R
12	F: GAGGATTTGGGGTTTTTGGTGA CTG R: ACACTTACGCCCAAGTATTTCCCA	59	304	12F-12R
13	F: CCCCCGCTTCCATATGTGAGTGTA R: CTCTAGGACACCAACTGCCCCCTCA	59	303	13F-13R
14	F: TGAACACTGAAAGCGGGGGTATGG R: CACAGGCCTACCACCAATCTCACC	59	327	14F-14R

Fonte: Auerbach et al., 2003.

3C.4- Coloração de Prata

A técnica de coloração de prata para detecção das bandas pós migração eletroforética na técnica de SSCP utilizada neste estudo encontra-se no Anexo 3.

3C.5- Seqüenciamento Automático

Depois de detectada a alteração pelo SSCP, a mesma foi confirmada pelo seqüenciamento do exon em questão utilizando-se a técnica de terminação de cadeia desenvolvida por SANGER et al. (1977). Para a realização do seqüenciamento automático utilizamos o kit DYEnamic[™] ET dye Terminator Kit (MegaBACE[™]). Os primers foram os mesmos usados para a reação de SSCP.

RESULTADOS

4A- Mutação IVS8-2A>G

Dos 38 indivíduos analisados 1 (um) apresentou homozigose para essa mutação (figura 22).

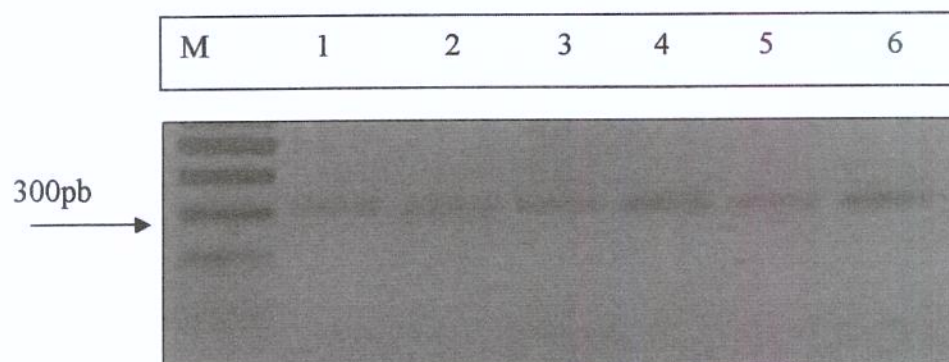


Figura 21- Foto gel exemplificando os fragmentos de 297 pb após PCR para análise da mutação.

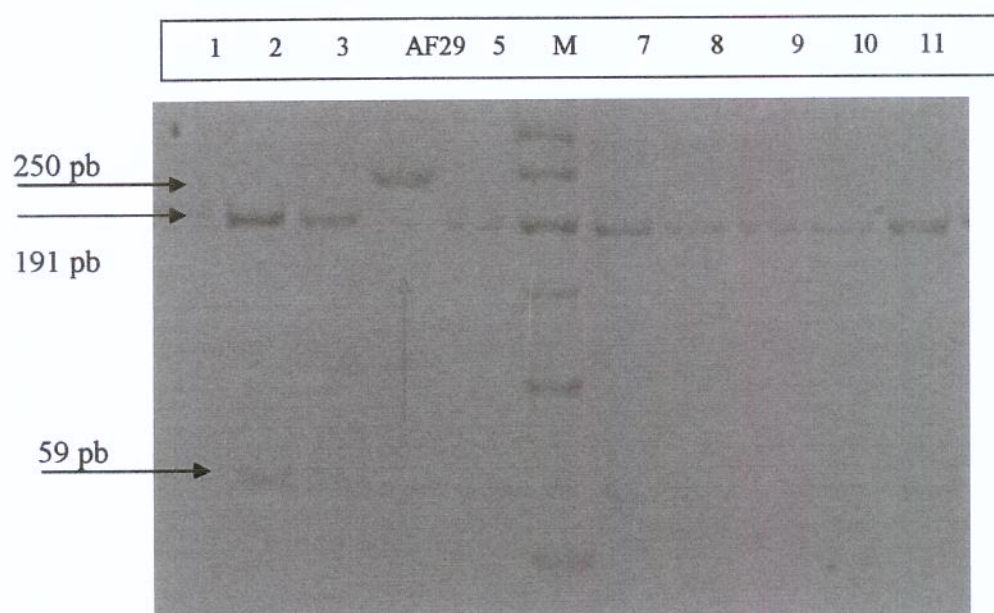
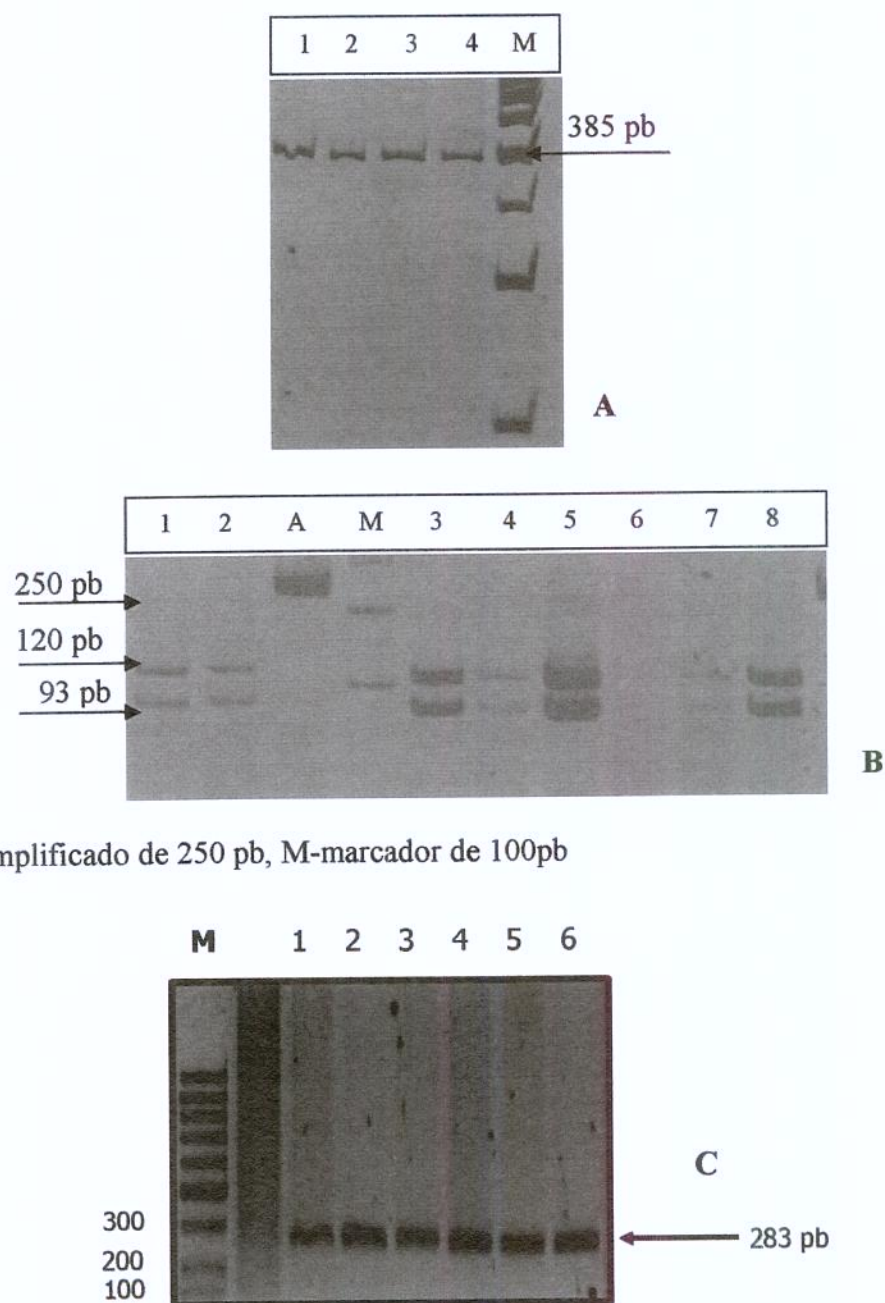


Figura 22- Foto de gel de poliacrilamida 12% da digestão enzimática para análise de IVS8+2A>G. Os indivíduos 1-3 e 5-11 apresentaram bandas de 191 e 59 pb características de indivíduos normais. O indivíduo de número 4 (AF29) apresentou uma banda única de 250 pb sendo homozigoto mutante para o distúrbio.

4B- Mutações IVS3+1G>C, IVS11+1G>C e 1794_1803del10

Os 38 indivíduos analisados não apresentaram essas mutações.



A-amplificado de 250 pb, M-marcador de 100pb

Figura 23- Digestão dos fragmentos amplificados. Todos os indivíduos apresentaram uma banda única de 385 pb (para IVS3+1G>C) (A), bandas de 93 e 120 pb (para IVS11+1G>C) (B) e uma banda de 283 pb (para 1794_1803del10) (C) o que comprova serem normais para essas mutações.

4C- SSCP

Foram analisados os 14 exons do *FANCG* dos 38 indivíduos para triagem mutacional. Somente uma alteração foi detectada no exon 14 no paciente AF27.

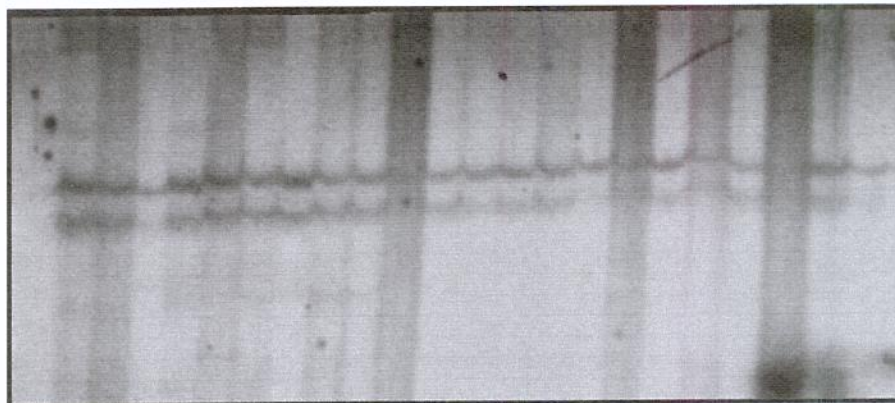


Figura 24- Foto de gel não-desnaturante exemplificando a técnica de SSCP para o exon 8. Os indivíduos não apresentaram nenhuma alteração na migração.

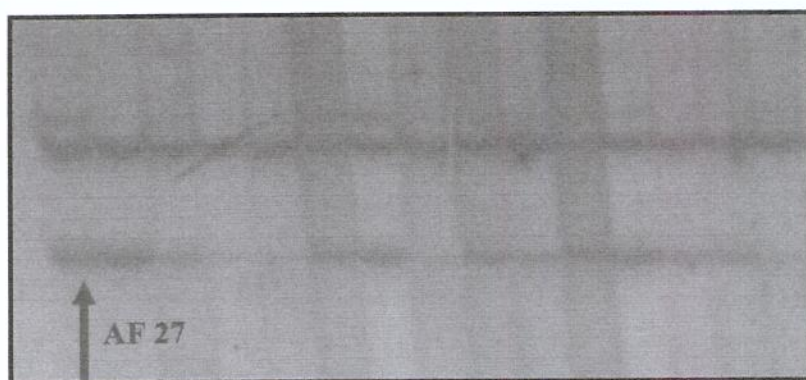


Figura 25- Foto de um gel de SSCP. A flecha indica uma alteração de migração de um indivíduo (AF27) na análise do éxon 14.

4D- Sequenciamento automático

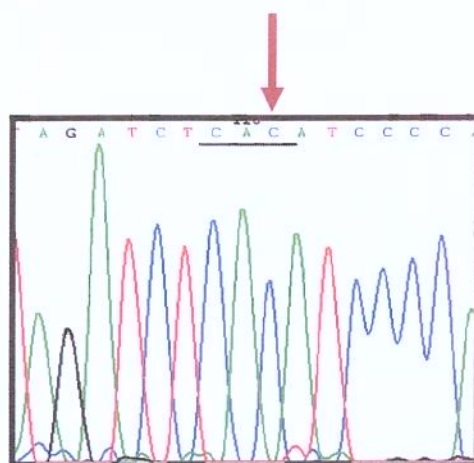


Figura 26- Sequenciamento automático do exon 14 do indivíduo AF27. Houve a identificação de uma alteração neutra (1749T>C). Não alterou o aminoácido protéico (histidina para histidina).

Tabela 6- Relação dos 38 indivíduos analisados com manifestação clínica, sexo, idade, cor, DEB e genótipo para FANCG.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	PACIENTE	SEXO	IDADE	COR	DEB	GENÓTIPO
pancitopenia e anomalias radiais	AF1	M	8	C	+	Ni
neutropenia e anomalias polegares	AF4	M	9	C	+	Ni
neutropenia, trombocitopenia, anomalias escapular e radial	AF11	M	18	C	+	Ni
pancitopenia e anomalias polegares	AF17	F	13	C	+	Ni
neutropenia e anomalias radiais	AF19	F	12	C	+	Ni
pancitopenia grave, polegares duplicados, consanguinidade	AF28	M	10	C	+	Ni
pancitopenia e anomalia radial bilateral	AF32	F	7	C	+	Ni
pancitopenia, anomalias radiais e consanguinidade	AF35	F	10	C	+	Ni
aplasia medular, manchas <i>café-au-lait</i> , microcefalia e microftalmia	AF2	M	9	C	+	Ni
neutropenia, palidez anêmica, hipopigmentação, microcefalia e microftalmia	AF8	M	18	N	+	Ni
neutropenia, trombocitopenia, hematomas e microftalmia	AF10	M	8	C	+	Ni
neutropenia, trombocitopenia, manchas <i>café-au-lait</i> e distúrbios faciais	AF27	F	32	C	+	1749T>C
pancitopenia	AF3	F	5	C	+	Ni
síndrome mielodisplásica não classificada	AF18	F	23	N	+	Ni
síndrome mielodisplásica não classificada	AF21	F	8	C	+	Ni
pancitopenia grave	AF25	F	12	PR	+	Ni
pancitopenia grave	AF29	M	10	C	•	IVS8/IVS8
síndrome mielodisplásica não classificada	AF36	F	29	C	+	Ni
síndrome mielodisplásica não classificada	AF37	F	25	C	+	Ni
neutropenia, retardo de crescimento, microcefalia e microftalmia	AF31	M	11	C	+	Ni
neutropenia, trombocitopenia, hipoplasia polegar e distúrbios faciais	AF24	F	10	C	+	Ni
pancitopenia, anomalias radiais e distúrbios faciais	AF14	M	5	C	+	Ni
sangramento, polegar duplicado e microftalmia	AF9	F	10	C	+	Ni
neutropenia, manchas <i>café-au-lait</i> e retardo de crescimento	AF6	F	9	C	+	Ni
SMD, manchas <i>café-au-lait</i> e anomalias radiais	AF26	M	9	N	+	Ni
macrocitose, hipopigmentação e anomalias radiais	AF38	F	1	C	+	Ni
neutropenia, manchas <i>café-au-lait</i> e anomalias radiais	AF31	M	11	C	+	Ni
pancitopenia, hipopigmentação, anomalias radiais e distúrbios faciais	AF33	F	13	N	+	Ni
macrocitose, hipopigmentação, anomalias radiais e distúrbios faciais	AF20	F	9	C	+	Ni
pancitopenia, microcefalia e micrognatia	AF15	M	13	C	+	Ni
pancitopenia e microftalmia	AF16	M	22	PR	+	Ni
neutropenia, trombocitopenia, microcefalia e microftalmia	AF7	M	20	PR	+	Ni
neutropenia e distúrbios faciais	AF34	F	12	C	+	Ni

F=feminino; M=masculino; C=caucasóide; N=negróide; PR=pardo; Ni=não identificadas mutações em FANCG.

DISCUSSÃO

A variabilidade da manifestação clínica da AF é relatada na literatura (Alter, 2003; Tischkowitz e Hodgson, 2003; Tischkowitz e Dokal, 2004; Rodriguez e Bertuzzo, 2005), tanto entre grupo de manifestação como intra grupo. Dessa forma, temos pacientes com manifestação hematológica e malformações congênitas como pacientes que apresentam apenas características hematológicas. Mesmo entre indivíduos com manifestação hematológica há grande variação desde pancitopenia até um quadro grave pré-leucêmico (SMD).

Por essa razão, muitas vezes o diagnóstico clínico depende da avaliação laboratorial, como o DEB teste, que, quando positivo, conclui o diagnóstico. É necessário afirmar que o DEB teste negativo não afasta a possibilidade do paciente apresentar AF como observado no indivíduo AF29 do presente estudo e em dois indivíduos em estudo realizado por Rodriguez e Bertuzzo (2005), que apresentaram DEB teste negativo e diagnóstico molecular positivo.

Frente a isso, um dos critérios de inclusão dos pacientes na amostra foi o DEB teste positivo. Apenas um dos pacientes (AF29) apresentou DEB teste negativo, mas de acordo com o Teste de Complementação, esse indivíduo pertence ao grupo G.

A quantidade de mulheres no estudo corrobora com estudos anteriores (Tischkowitz e Dokal, 2004) que retratam uma quantidade maior de mulheres com a doença (23 mulheres para 15 homens).

Em relação à etnia dos indivíduos analisados e às mutações relacionadas a grupos étnicos, podemos afirmar que a população brasileira é extremamente heterogênea, consistindo de americanos indígenas e imigrantes da Europa, Ásia e África (Alves-silva, 2000; Carvalho-silva, 2001; Rodriguez e Bertuzzo, 2005). 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 é a mais prevalente na população japonesa (Futaki et al., 2000). Devido a isso, não se pode basear na etnia para a escolha das mutações a serem analisadas, e sim nos dados sobre a prevalência de mutações de acordo com estudos do IFAR e do

EFARG (European Fanconi Anemia Research Group) (Auerbach et al. 2003; Faivre et al, 2000). Infelizmente não há registro brasileiro similar.

Nesse estudo, a grande maioria dos indivíduos de nossa amostra (78%) foi analisada anteriormente para as mutações em *FANCA* e *FANCC* de acordo com a ordem de prevalência mutacional em indivíduos dos grupos de complementação A e C. Mutações nesses genes acometem cerca de 85% dos casos de AF no mundo e mutações em *FANCG* de 8-10%, segundo dados de Tischkowitz e Hodgson (2003). Portanto seria muito provável que indivíduos que não apresentaram mutações em *FANCA* e *FANCC* apresentassem mutações em *FANCG*.

Nós analisamos quatro mutações do gene, pois elas acometem cerca de 60% dos indivíduos pertencentes ao grupo de complementação G. A mutação IVS8+2A>G é considerada a mutação brasileira para *FANCG*, pois 40% dos indivíduos brasileiros registrados no IFAR apresentaram essa mutação (Auerbach et al, 2003; Auerbach, AD).

Com relação ao tamanho amostral, devido ao fato da AF ser um distúrbio raro, para termos uma amostra considerável seria necessário um tempo maior para coleta.

Em 38 indivíduos analisados em nosso estudo dois alelos mutados foram encontrados (2,6%) e uma variante neutra 1749T>C (H482H) localizada a 120pb do final do éxon 14 não relatada anteriormente.

Em relação ao SSCP, apenas a mutação neutra foi detectada. Ressaltando que a técnica apresenta 80% de sensibilidade e 85 a 90% quando em duplicata.

Devido a esse fato, não podemos descartar a presença de mutações ou mesmo mosaïcismo somático, já que 10-25% dos indivíduos com AF apresentam populações de linfócitos distintas (Dokal et al, 1996).

Em relação ao fenótipo grave caracterizado por alterações hematológicas precoces em indivíduos com mutações no gene *FANCG* (Faivre et al, 2000), verificamos que em 20 indivíduos de nossa casuística com idades entre um a 10 anos apresentaram, juntamente ou não com manifestações físicas, alguma alteração hematológica, que vai de uma anemia leve

a aplasia medular. O indivíduo homozigoto mutante para IVS8+2A>G apresentou um quadro de pancitopenia grave aos 10 anos o que comprovou os dados anteriores. Entretanto, um estudo realizado por Fraive et al (2002) mostrou não haver correlação entre grupos de complementação (A, C e G) e fenótipo clínico. Esse tipo de análise é dificultada pelo número de pacientes e tipo de mutações descritas em *FANCG*.

Comprovou-se anteriormente que a variabilidade fenotípica está associada ao tipo de mutação. Aquelas que levam a uma produção nula da proteína desencadeariam um fenótipo mais grave do distúrbio. A maioria das poucas mutações relatadas em *FANCG* alteram o sítio de processamento, conduzindo a deleções ou alteram a matriz de leitura, produzindo uma nova proteína, refletindo um fenótipo mais grave. Por exemplo a mutação IVS3+1G>C a qual altera o sítio doador de splice no intron 3 é responsável pela perda dos aminoácidos da posição 176 a 510 (Maquat, 1996; Aoshima et al, 1996).

Somando nossos pacientes com os analisados por Rodriguez e Bertuzzo (2005), totalizamos 60 indivíduos, sendo que 14 apresentaram mutações no gene *FANCC* (61%), 8 com mutações em *FANCA* (35%) e 1 com mutação em *FANCG* (4%). Essas proporções diferem das descritas em outras regiões (Tischkowitz e Hodgson, 2003). No estudo de Yamada et al (2000) a ordem de prevalência dos subtipos na população japonesa foi FA-A, FA-G e FA-C. Com isso, podemos verificar que há uma variação regional em termos de prevalência de grupo de complementação, que para um melhor diagnóstico é essencial sabermos quais são prevalentes em nosso meio.

Ressaltamos que apesar do indivíduo AF29 apresentar homozigose para a mutação IVS8+2A>G ele não apresentou DEB teste positivo e que mesmo os demais indivíduos sem constatação mutacional em *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* apresentaram DEB teste positivo e manifestação clínica compatível com AF. Isso nos leva a discutir dois pontos importantes: o primeiro deles seria o DEB teste o qual não apresenta 100% de sensibilidade e que indivíduos com resultados negativos não excluem a possibilidade de serem portadores do distúrbio, como citado anteriormente. De acordo com Auerbach et al (1981), 80% dos linfócitos do sangue de 10 a 15% de indivíduos com AF exibem uma resposta normal ao DEB. O segundo ponto seria a heterogeneidade molecular. São, no mínimo, onze genes relacionados à AF constituídos de um número grande de éxons e com uma variedade

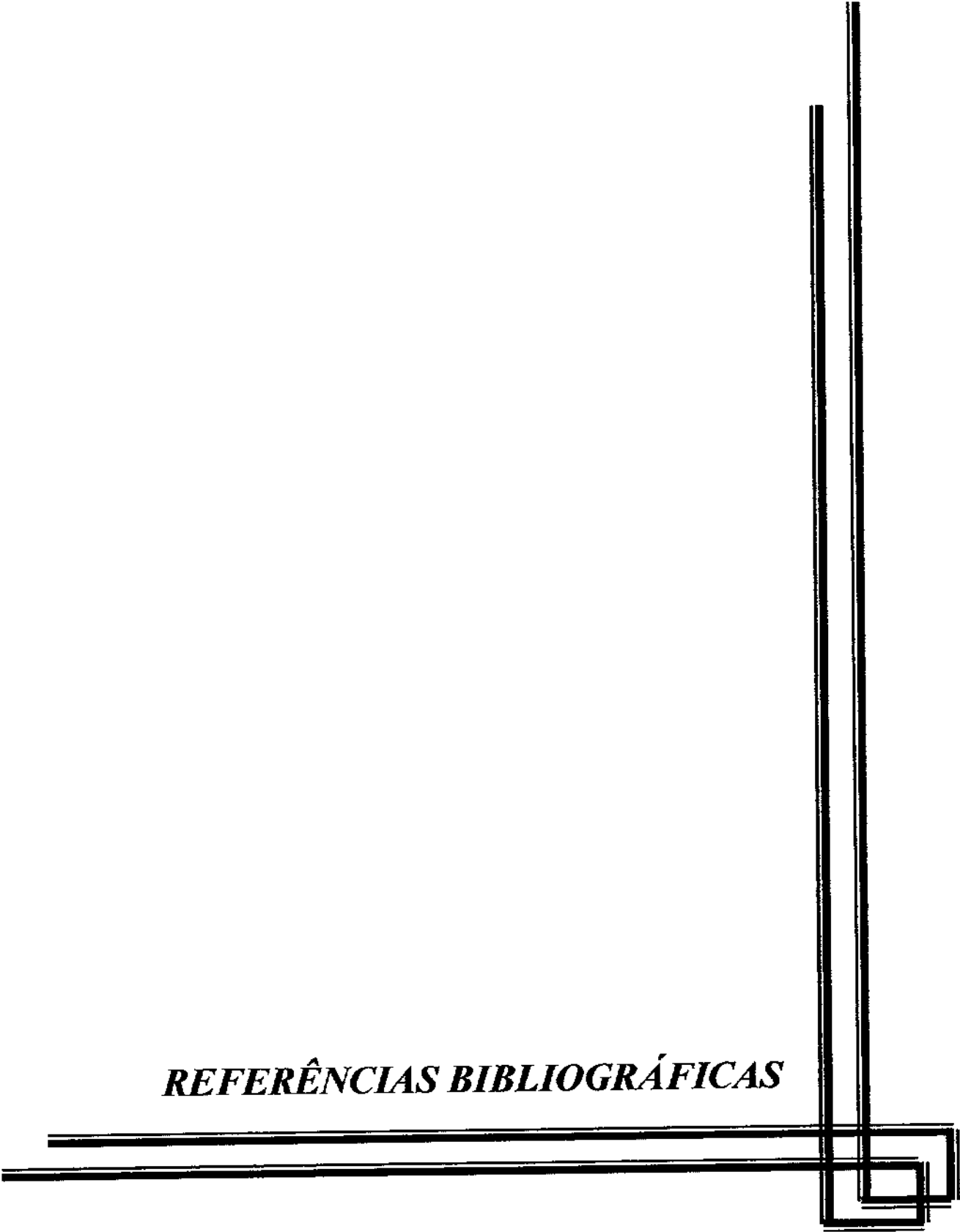
grande de mutações descritas ocorrendo em baixa frequência o que dificulta extremamente o diagnóstico imediato dos indivíduos portadores. Uma vez que é necessário a análise de todos os genes.

Em termos diagnósticos, o ideal seria direcionar a análise molecular pelo teste de complementação (Joenje e Patel, 2001), o que não foi possível pelo fato desse teste não ser realizado em nosso país.

CONCLUSÃO

Concluimos com esse trabalho que:

- 1) Existe grande heterogeneidade clínica na amostra estudada;
- 2) Com relação à investigação citogenética com DEB, observaram-se semelhanças com demais relatos da literatura;
- 3) No que se refere ao gene *FANCG*, 2,6% dos alelos apresentaram a mutação IVS8+2A>G;
- 4) Em vista da importância do Teste de Complementação e a baixa praticidade na detecção de mutações em indivíduos estudados, a introdução desse teste poderia direcionar a pesquisa molecular minimizando casos sem constatação diagnóstica.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. Br J Hematol 1993; 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 e Elghetany MT. Fanconi anemia. Myelodysplasia as a predictor of outcome. Cancer Genet Cytogenet 2000; 117:125-31.

Alter BP. Cancer in Fanconi anaemia, 1927-2002. Cancer 2003; 97:425-440.

Aoshima M, Nuno H, Shimazu M, Shimizu S et al. Two-exon skipping due to a point mutation in p67-phox-deficient chronic granulomatous disease. Blood 1996; 88:1841-45.

Apostolous S, Whitmore AS, Crawford J, et al. 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, 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.nd 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, 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.

Auerbach AD – informação pessoal.

Bennett BT, Beluhan FZ, Sarpel SC. Acute myelomonocytic leukemia in a Capuchin monkey (*Cebus apella*). *Lab Anim Sci* 1981; 31:519-22.

Berger R, Le Coniat M, e Gendron MC. Fanconi anemia. Chromosome breakage and cell cycle studies. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 69:13-16.

Bielorai B, Hugher MR, Auerbach AD, 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. Preleukemia acute human leukemia. *J Am Med Assoc* 1953; 152(11):1018-28.

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

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.

Croop JM Gene Therapy for Fanconi anemia. *Curr Hematol Rep* 2003; 2(4):335-40.

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

de Chadarevian 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 Kerviller E, et al. The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. *Clin Radiol* 2000; 55:340-45.

Demuth I, et al. Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:861-68.

de Winter, J.P. et al. The Fanconi anemia group G gene is identical with XRCC9. *Nat Genet* 1998; 20:281-83.

de Winter JP, van der Weel L, de Groot J, Stone S, 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, Leveille F, van Berkel CG, Rooimans MA, et al. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet* 2000b; 5:1306-08.

Dokal I, Chase A, Morgan NV, 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, et al. Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. *Somat Cell Mol Genet* 1985; 11:35-41.

Fanconi G. Familiaere infantile perniziosaartige Anaemie (pernizioeses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch Kinderheild* 1927; 117:257-80.

Faivre L, 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.

Faivre L, Le Mener M, Lyonnet S, Plauchu H, Dagoneau N, Campos-xavier et al. Clinical and genetic heterogeneity of Seckel syndrome. *Am J Med Genet* 2002; 112(4):379-83.

Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, 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, et al. Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using lentiviral vectors. *Blood* 2002; 100:2732-36.

- Garcia-Higuera, I. Interaction of Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 2001; 7:249-262.
- Giampietro PF, Adler B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD. *Pediatrics* 1993; 91(6):116-20.
- Giampietro PF, et al. 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, 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, et al. Phenotypic consequences of mutation in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 1997; 90:105-10.
- Glanz A e Fraser FC. Spectrum of anomalies in Fanconi anemia. *J Med Genet* 1982; 19(6):412-6.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, 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.
- Gush KA, Fu KL, Grompe M e Walsh CE. Phenotypic connection of Fanconi anemia group C Knockout mice. *Blood* 2000; 95:700-04.
- Gyuton AC e Hall JE. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. In: Hemácias, Leucócitos e Resistência do Corpo à Infecções. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p247-58.
- Hill LS, Dennis PM, Fairham SA. Adenocarcinoma of the stomach and Fanconi's anemia. *Postgrad. Med Jv* 1981; 57(668):404.

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.

Howlett NG, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in fanconi anemia. *Science* 2002; 297:606-9.

Jacobs P e 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, et al. Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for fifth genetic subtype. *Blood* 1995; 86:2156-60.

Joenje H, 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 LB, et al. *Genética Médica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 297p.

Kaplan MJ, et al. Squamous cell carcinoma in the immunosuppressed patient: Fanconi's anemia. *Laryngoscope* 1985; 95:771-75.

Koc A, et al. Variable pathogenicity of exon 43del (FAA) in four Fanconi anaemia patients within a consanguineous family. *Br J Haematol* 1999; 104:127-130.

Kutler DI, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003; 101(4):1249-56.

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

Levitus M. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for two new genetic subtypes. *Blood* 2004; 103:2498-2503.

Levitus M, 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, 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 preleukemia phase. *J Chronic Dis* 1970; 22(11):713-16.

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, 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. et al. 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, Rooimans MA, Bosnaan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, et al. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anemia gene, FAA. *Nat Genet* 1996; 14:320-23.

Lo Ten Foe, J.R., Kwee, M.I., Rooimans, M.A., et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 1997; 5:137-148.

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

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

Maquat LE. Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. *Am J Hum Genet* 1996; 59:279-286.

Meetei AR, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 2003a; 35(2):165-170.

Meetei AR, 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, et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 2004; 36:1219-24.

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

Nakanishi K, et al. Functional analysis of patient-derived mutations in the Fanconi anemia gene, FANCG/XRCC9. *Exp Hematol* 2001; 29(7):842-49.

Nakanishi, K. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature Cell Biology* 2002; 4:913-20.

Nakanishi K, 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.ensembl.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.

Pavlatos AM, Fultz O, Monberg MJ, Vootkur A, Pharm D. Review of oxymethalone: a 17alfa-alkylatedanabolic-androgenic steroid. *Clint Ther* 2001; 23:789-801.

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

Rackoff WD. Treatment of bone marrow. In:Owen J. Fanconi anemia – standards for clinical core. Oregon.FA Research Fund Inc; 1999. p.9-20.

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 e Bertuzzo CS. Molecular analysis of the most prevalent mutations of the *FANCA* and *FANCC* genes in Brazilian patients with Fanconi anaemia. *Genet Mol Biol* 2005; 28 (2):205-209.

Rosenberg PS, Greene MH e Alter BP. Cancer Incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 2003; 101:822-25.

Rosenberg PS, Huang R, Alter BP. Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. *Blood* 2004; 104(2):350-55;

Rosendorff J, et al. 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, et al. Localisation of a Fanconi anaemia gene to chromosome 9p. *Euro J Hum Genet* 1998; 6:501-08.

Saiki RK, 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, Boviullo A, d'Àpolito M, 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, et al. 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, et al. Formal genetics of Fanconi's anemia. Hum Genet 1976; 32(3):257-88.

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

Soulier J, Leblanc T, Larghero J, 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, 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, C.A., Gavish, H., Shannon, W.R., 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.

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

Taniguchi T, 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, 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, Kim S, Read EJ. et al. Deletion and reduced expression of the Fanconi anemia FANCA gene in sporadic acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004; 18:420-25.

Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi anaemia. *J Med Genet* 2003; 40(1):1-10.

van der Heijden MS, et al. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003; 63(5):1585-2588.

van de Vrugt HJ, 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. e 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, et al. Carrier frequency of the IVS4 + 4A→T mutation of the Fanconi Anemia gene FAC in the Ashkenazi Jewish population. *Blood* 1995; 86:4034-38.

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

Wajnrajch M.P. 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.

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

Witt E e Ashworth A. D-Day for BRCA2. *Science* 2002; 297:534.

Yagasaki H, 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, et al. 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, Crompe M, D'Andrea AD. Clinical variability of FA (type C) results from expression of an amino terminal truncated FA complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood* 1996; 87(10):4424-32.

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):223-26.

Zakrzewski S e 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, et al. The Fanconi anemia proteins functionally interact with the protein kinase regulated by RNA (PKR). *The journal of Biological Chemistry* 2004; 279:43910-19.

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 FANCG em pacientes com quadro clínico de Anemia de Fanconi.

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 FANCG para um diagnóstico preciso de pacientes que não apresentaram alterações em outro gene para 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 FANCG 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 consequências 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) 3788- 8902 (Lucila Gobby Amstalden).

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) 3788-8936.

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 500µL de sangue (sem plasma).
3. Adicione 800µL de tampão lise^a.
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 1000µL de tampão de lise).
8. Colocar 395µL de tampão de digestão^o por amostra e 20µL 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 200µL 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 60µL de H₂O 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)^a

Sacarose 320 mM 2,19 g

Tris HCL pH7,5 10 mM 500,0 µL (2N)

MgCL₂ 5 mM 500,0µL (1N)

(V/V tritonX100) 1% 1000,0µL

H₂O deionizada qsp 100,0 mL

Armazenar em geladeira.

TAMPÃO DE DIGESTÃO^o (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%

H₂O deionizada qsp 20,0 mL

Armazenar a temperatura ambiente

CLORETO DE LÍTIO (LiCl) 7,5 N (20,0 mL)*

$$PM = 42,39$$

$$N = 7,5$$

$$N = \frac{m}{PM}$$

$$PM \times V(L)$$

$$m = 0,02 \times 42,39 \times 7,5$$

$$m = 6,36 \text{ g diluídos em } 20,0 \text{ mL de H}_2\text{O}.$$

LiCl

6,3585g

H₂O deionizada qsp 20,0 mL

GEL DE POLIACRILAMIDA 12 %

H₂O 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)

H₂O deionizada qsp 1000,0 mL

Agitar para dissolver e autoclavar

ACRILAMIDA (100,0 ML) 40%

Acrilamida 38,6 g

Bisacrilamida 1,34 g

H₂O p/ completar 100,0 mL

PERSULFATO DE AMÔNIO 10% (5,0 ML)

persulfato de amônio 0,5 g

H₂O 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

H₂O 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