



_Anemia de Fanconi em Portugal: estudo retrospectivo de 34 anos de investigação no INSA (1980-2014)

Fanconi anemia in Portugal: retrospective study of 34 years of investigation at National Health Institute (1980-2014)

Ana Paula Ambrósio, Maria do Céu Silva, José Manuel Furtado, Neuza Silva, Catarina Ventura, Mónica Viegas, Hildeberto Correia

hildeberto.correia@insa.min-saude.pt

Unidade de Citogenética, Departamento de Genética Humana, INSA.

_Resumo

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença recessiva rara, com uma frequência estimada de 4 a 7 por 1 000 000 de nascimentos. Caracteriza-se por malformações congénitas, falência medular e hipersensibilidade a agentes clastogénicos de DNA. Devido à grande complexidade desta patologia a primeira abordagem de diagnóstico, consiste na análise da instabilidade cromossómica, após cultura celular com estimulação com agentes clastogénicos diepoxibutano (DEB) ou mitomicina C (MMC). Realizou-se um estudo retrospectivo de 34 anos (1980-2014) em 243 amostras com suspeita de AF e de 25 amostras de familiares de doentes de AF, num total de 268 amostras. Nas 243 amostras suspeitas de Anemia de Fanconi, foram identificadas 37 com AF. A idade média ao diagnóstico foi de 7 anos, existindo um ligeiro predomínio da incidência no sexo feminino (59%). Uma amostra foi classificada como AF(-/+). Nos familiares de doentes com AF foram identificados 2 casos positivos, o que perfaz 39 amostras de AF positivas. Em quatro das amostras AF negativas, observaram-se cariotipos anormais. Estes resultados não permitem estimar uma frequência de doentes de AF em Portugal, uma vez que não englobam indivíduos de todas as regiões portuguesas, mas permitem uma estimativa da frequência espectável.

_Abstract

Fanconi anemia (FA) is a rare recessive disease with an estimated frequency from 4 to 7 per 1 000 000 live births. It is characterized by congenital malformations, bone marrow failure and hypersensitivity to DNA clastogenic agents. Due to the great complexity of the pathology the first diagnostic approach is the analysis of chromosomal instability in cultured cells after stimulation with the clastogenic agents diepoxybutane (DEB) or mitomycin C (MMC). We performed a retrospective study of 34 years (1980-2014) in 243 samples suspected of FA and 25 samples from relatives of FA patients, totalizing 268 samples. In 243 suspected samples 37 were confirmed to be FA. The average age at diagnosis was 7 years, with a slight predominant incidence in females (59%). One sample was classified as FA (-/+). Among the patients' relatives, 2 positive FA cases were identified totaling 39 positive samples. In four negative samples of suspected FA, abnormal karyotypes were observed. Since these samples are not representative of individuals from all Portuguese regions, the data only allow estimating the frequency of FA in Portugal.

_Introdução

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença rara, com uma frequência estimada de 4 a 7 por 1 000 000 de nascimentos, podendo este valor aumentar em grupos étnicos com consanguinidade (1,2).

É uma doença genética autossómica recessiva, que poderá ter transmissão ligada ao cromossoma X (#227650) (3). Doentes com AF podem apresentar malformações congénitas, falência da medula óssea, hipersensibilidade a agentes clastogénicos de DNA, fragilidade cromossómica e uma maior suscetibilidade para doenças oncológicas. Entre 60 a 70% dos indivíduos afetados apresentam malformações congénitas entre as quais: baixa estatura, pigmentação anormal da pele (manchas *café-au-lait*), atraso de desenvolvimento, malformações do esqueleto, olhos, sistema urinário, cardíaco, gastrointestinal e nervoso central (3). A maioria destes doentes apresentam ainda uma falência medular progressiva que se caracteriza por pancitopenia e uma grande incidência de doenças hemato-oncológicas (10-30%) e de doenças oncológicas não hematológicas (25 a 30%), como os tumores sólidos da cabeça, pescoço, pele, entre outros (3).

A AF é uma patologia com uma grande heterogeneidade genética, que envolve vários genes de reparação de DNA e de estabilidade cromossómica (3). Até à presente data, já foram identificados 19 genes associados a AF, contudo, devido aos critérios de seleção, apenas 15 estão classificados como genes causadores de doença, nomeadamente, [FANCA; FANCB; FANCC; BRCA2 (FANCD1) FANCD2; FANCE; FANCF; FANCG (XRCC9); FANCI; BRIP1 (FANCJ); FANCL; PALB2 (FANCN); SLX4 (FANCP); FANCQ (ERCC4); FANCT] (4). Os genes

RAD51C (*FANCO*), *FANCR* e *FANCS* são considerados “AF-like”, uma vez que induzem síndromes de fragilidade cromossómica e malformações idênticas às observadas nos doentes de AF, mas não apresentam falência medular (4). O *FANCM* não é considerado um gene causador de AF, pois ainda não existem estudos suficientes que demonstrem esta associação (4). Aproximadamente 85% dos indivíduos afetados apresentam mutações nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* e as restantes encontram-se distribuídas pelos outros 12 genes (3,5,9). Contudo existem doentes de AF que não apresentam mutações nos 15 genes identificados, o que sugere que existem mais genes envolvidos por identificar (3,5).

Devido à grande complexidade desta patologia a primeira abordagem de diagnóstico, consiste na deteção de aberrações cromossómicas (quebras, rearranjos estruturais, radiais, anéis) em células de sangue periférico em cultura em resposta a um agente clastogénico como o diepoxibutano (DEB) ou mitomicina C (MMC).

_Objetivo

Apresentação dos resultados obtidos dos estudos de instabilidade cromossómica induzida por DEB e MMC realizados entre 1980-2014 na Unidade de Citogenética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

_Métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo de 34 anos (1980-2014) de 243 amostras enviadas à unidade de citogenética com suspeita de AF e de 25 amostras de familiares de doentes de AF. Num total de 268 amostras, foram analisadas 260 de sangue periférico, 3 de biópsia de pele, 3 de líquido amniótico, 1 de sangue do cordão e 1 de sangue medular.

As amostras foram processadas segundo o protocolo estabelecido para a análise cromossómica de doenças associadas a fraturas, incluindo cultura celular com estimulação por MMC e/ou DEB, para cada produto biológico, seguida de análise microscópica para estudo da determinação da instabilidade

cromossómica induzida pelo DEB e/ou MMC, de acordo com o protocolo estabelecido pelo *International Fanconi Anemia Registry* (IFAR).

_Resultados

Nas 243 amostras analisadas no período entre 1980 e 2014 foram identificados 37 casos (15,2%) de AF (gráfico 1).

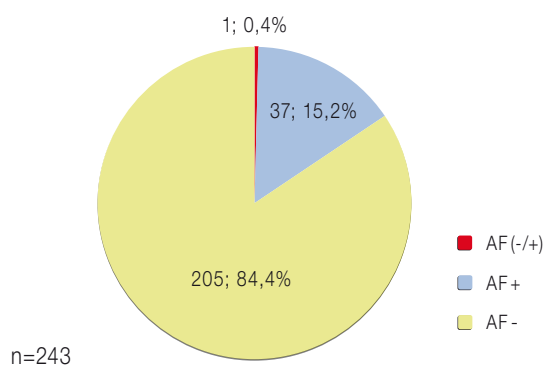
Uma das amostras foi classificada como AF (-/+), uma vez que o estudo não evidenciou um número de quebras cromossómicas suficientes para ser catalogado como doente de AF, podendo tratar-se de um mosaico, situação que este teste não permite identificar (9).

A idade média ao diagnóstico foi de 7 anos, existindo um ligeiro predomínio da incidência no sexo feminino, com 59%.

Nos estudos citogenéticos dos familiares com AF foram identificados mais 2 casos positivos, o que perfaz 39 amostras de AF positivas (14,6%), numa população total de 268.

Em quatro das amostras AF negativas analisadas foram observados cariotipos anormais (tabela 1).

Gráfico 1: Número de doentes identificados de Anemia de Fanconi, entre 1980 e 2014.



AF-/+ : não apresenta número de quebras cromossómicas suficientes para ser considerado doente de AF; AF+ : doente de AF; AF- : não doente de AF.

Tabela 1: ↓ Informação clínica *versus* dados bibliográficos nas 4 amostras de suspeita de Anemia de Fanconi com cariótipo anormal.

Caso nº	Informação clínica	Sobreposição c/ fenótipo AF	AF	Cariótipo	Fenótipo vs cariótipo (dados bibliográficos)
I	<input type="checkbox"/> Agenésia bilateral do rádio	+	-	mos47,XY,+7[3]/46,XY[47]	Baixa estatura ⁽⁶⁾
	<input type="checkbox"/> Proeminência das bossas frontais	-			Clinodactilia ⁽⁶⁾
	<input type="checkbox"/> Dismorfia das mãos	+			Assimetria corporal ⁽⁶⁾
	<input type="checkbox"/> Sem alterações do SP	-			Facies triangular ⁽⁶⁾
II	<input type="checkbox"/> Atraso de Desenvolvimento psico-motor	+	-	46,XY,dup(2)(p23.1p24.3).ish dup(2)(wcp2+)	Atraso desenvolvimento psico-motor ⁽⁷⁾
	<input type="checkbox"/> Peso e altura <P5 desde os 6 meses	+			Microcefalia ⁽⁷⁾
	<input type="checkbox"/> Implantação baixa do polegar	+			Testa proeminente ⁽⁷⁾
	<input type="checkbox"/> Outras pequenas dismorfias	+			Dismorfias faciais ⁽⁷⁾
III	<input type="checkbox"/> Malformações dos membros superiores	+	-	47,XX,+mar[2]/46,xx[28]	
IV	<input type="checkbox"/> Trombocitopénia ligeira + macrocitose	+	-	46,X,i(X)(p10)[11]/46,XX[39]	Pancitopénia com marcada trombocitopénia ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> Hb fetal ↑	+			Doenças hematológicas ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> Focomelia	+			Apneia ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> LCA (Amaurose congénita de Leber)	-			Hipotonia ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> Má evolução ponderal	+			Atraso de crescimento ⁽⁸⁾
	<input type="checkbox"/> Baixa estatura	+			

_Conclusões

Este estudo evidência que a maioria dos indivíduos com suspeita de AF são negativos. Este facto deve-se à sobreposição do fenótipo dos doentes de AF com o de outras síndromes, das quais é exemplo Dubowitz, Seckel, Holt-Oram, Baller-Gerold, trombocitopenia - ausência de rádio, síndromes de quebras de Nijmegen, associação VACTERL e/ou disqueratose congénita, e ainda, à presença de anomalias cromossómicas, que poderão induzir um fenótipo semelhante ao de um doente de AF. Também a existência de doentes de AF assintomáticos e a sobreposição fenotípica com outras síndromes, contribuem para um subdiagnóstico desta patologia.

Contudo, ao longo de 34 anos, foram identificados, 39 novos casos de AF oriundos maioritariamente da região de Lisboa e Vale do Tejo, casos pontuais da Região Autónoma dos Açores, região centro e dos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP). Dois destes novos casos foram identificados em familiares diretos dos casos índice, assintomáticos até à

data do diagnóstico, o que demonstra que o estudo citogenético é relevante, não só para a identificação dos doentes de AF, mas também para os seus familiares diretos. Por este motivo sugere-se que seja realizado o estudo familiar dos indivíduos AF positivos e um aconselhamento genético adequado.

Foram analisadas amostras, de indivíduos com um fenótipo sugestivo de AF, mas cujo estudo citogenético de quebras cromossómicas revelou não serem doentes de AF. No entanto, estes estudos permitiram pela análise cromossómica por citogenética convencional identificar um cariótipo anormal (tabela 1). Por este motivo e como forma de despiste primário, sugere-se a realização de cariótipo constitucional, em simultâneo com a pesquisa de quebras cromossómicas induzidas pelos agentes clastogénicos MMC e DEB.

Estes resultados não permitem estimar uma frequência de doentes de AF em Portugal, uma vez que não englobam indivíduos de todas as regiões portuguesas e por outro lado, estão incluídos dois indivíduos de origem PALOP. Se não considerar-

mos estas duas amostras provenientes dos PALOP e estimando uma população de 10 milhões de habitantes em Portugal, a frequência será muito baixa, com um valor aproximado de ≈ 4 indivíduos por milhão de habitantes. Este valor não se encontra longe do estimado para os países europeus que é de 4 a 7 por 1 000 000 de nascimentos, de acordo com Gulbis *et al.* em 2010 (1). A diferença observada entre estes valores poderá estar relacionada com o facto de o nosso estudo não englobar amostras provenientes de todas as regiões de Portugal.

Referências bibliográficas:

- (1) Gulbis B, Eleftheriou A, Angastiniotis M, et al. Epidemiology of rare anaemias in Europe. *Adv Exp Med Biol.* 2010;686:375-96.
- (2) Castella M, Pujol R, Callén E, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet.* 2011;48(4):242-50.
- (3) Alter BP, Kupfer G. Fanconi Anemia. In: Pagon RA, Adam MP, Adinger HH, et al. (eds). *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993-2016. Last Revision: February 7, 2013, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/
- (4) Bogliolo M, Surrallés J. Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Curr Opin Genet Dev.* 2015;33:32-40.
- (5) Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):800-6. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3644630/
- (6) Font-Montgomery E, Stone KM, Weaver DD, et al. Clinical outcome and follow-up of the first reported case of Russell-Silver syndrome with the unique combination of maternal uniparental heterodisomy 7 and mosaic trisomy 7. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005;73(8):577-82.
- (7) Aviram-Goldring A, Fritz B, Bartsch C, et al. Molecular cytogenetic studies in three patients with partial trisomy 2p, including CGH from paraffin-embedded tissue. *Am J Med Genet.* 2000;91(1):74-82.
- (8) Gray SL, de Chadarévian JP, Anderson CE, et al. Improvement of pancytopenia and thrombocytopenia with decreasing mosaicism for isochromosome Xp. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52(5):650-2.
- (9) Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res.* 2009;668(1-2):4-10. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2742943/