



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

**INSTABILIDADE CROMOSSÓMICA INDUZIDA PELO DIEPOXIBUTANO
(DEB) EM FIBROBLASTOS CUTÂNEOS PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA
DE FANCONI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública

Por Maria de Fátima de Sousa Leite

Porto, Setembro de 2012



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
↳ Instituto de Ciências da Saúde

**INSTABILIDADE CROMOSSÓMICA INDUZIDA PELO DIEPOXIBUTANO
(DEB) EM FIBROBLASTOS CUTÂNEOS PARA DIAGNÓSTICO DA ANEMIA
DE FANCONI**

Trabalho realizado no Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar da Universidade do Porto, com a colaboração do Laboratório de
Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Santo António, Centro
Hospitalar do Porto.

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública

Por Maria de Fátima de Sousa Leite

Sob orientação da Prof.^a Doutora Beatriz Porto

Porto, Setembro de 2012

A - Resumo

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença rara, de transmissão autossômica recessiva ou ligada ao X, geneticamente e fenotipicamente heterogénea, caracterizada por instabilidade cromossômica (IC), falência da medula óssea e predisposição para o cancro. A doença manifesta-se quando existem mutações em qualquer um dos 15 genes já identificados. A sua variabilidade fenotípica dificulta o diagnóstico com base nas características clínicas, sendo necessário a realização de testes laboratoriais para sua confirmação, como seja, a deteção de IC induzida por diepoxibutano (DEB) em culturas de linfócitos de sangue periférico (SP). A quantificação, por citometria de fluxo (CF), da percentagem de células acumuladas nas fases G2/M do ciclo celular, foi apontada como um método complementar de diagnóstico. No entanto, estes testes podem não ser sensíveis para os casos de mosaicismo, ou seja, nas situações em que há reversão das células hematopoiéticas com mutação AF, para um fenótipo normal. Nestas situações, devem então ser feitos esses mesmos testes em culturas de fibroblastos, onde não existe reversão, procedimentos laboratoriais que até ao momento não estavam disponíveis no Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP). Assim, os objetivos deste trabalho foram a caracterização da população de pacientes com AF, estudada no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP, relativamente à frequência de mosaicismo, e a implementação da técnica de cultura de fibroblastos, seguida de estudos de IC e do ciclo celular, realizada com a colaboração do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto. Dos 233 pacientes avaliados para IC no SP, 39 foram diagnosticados como pacientes com AF, e destes 13% foram caracterizados como mosaicos, valor este, que por si só já justifica a importância de implementar a técnica de análise da IC em fibroblastos. Esta foi implementada a partir de amostras de fibroblastos cutâneos de 6 indivíduos saudáveis e 2 pacientes enviados para exclusão de AF, em que não foi confirmado este diagnóstico. Os resultados obtidos nos fibroblastos, tanto para a IC induzida por DEB como para a acumulação de células em G2/M, estudada por CF, estão de acordo com os resultados descritos na literatura para controlos e pacientes não AF. Conseguiu-se então implementar, pela primeira vez e com sucesso, o protocolo de cultura de fibroblastos e o protocolo de análise do ciclo celular dos fibroblastos por CF. Contudo, o sucesso total do protocolo para o diagnóstico de AF requer ainda confirmação em amostras de fibroblastos de pacientes com AF, as quais não foram possíveis obter durante o período de execução deste trabalho, uma vez que se trata de uma doença rara.

B - Abstract

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease, autosomal recessive or X-linked, genetically and phenotypically heterogeneous, characterized by chromosomal instability (CI), bone marrow failure, and predisposition to cancer. The FA is caused by mutations in any one of 15 known genes. Diagnosis based on clinical manifestations can be difficult because of the phenotypic variability, and laboratory tests may be necessary to confirm it, such as the detection of CI induced by diepoxybutane (DEB) in peripheral blood (PB) lymphocyte cultures. In addition, flow cytometry (FC) based quantification of the percentage of cells accumulated at the phase G2 / M of cell cycle, was also described as a complementary test for the diagnosis of FA. However, these tests are not sensitive for the study of mosaicism, a situation where reversion of the AF mutation to a normal phenotype occurs in hematopoietic cells. In those situations the same tests may be performed in fibroblast cultures, where there is no reversion. Nevertheless, these laboratorial procedures were not yet available in the Laboratory of Cytogenetics of the Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), a reference lab for the study of FA. Therefore, the objectives of the present work were the characterization of the FA population previously studied in this laboratory concerning the percentage of mosaicism, and the implementation of the technique for fibroblast cultures followed by CI detection and study of progression of the cell cycle to G2/M, by FC. Flow cytometry studies were performed in collaboration with the Laboratory of Cytometry from the Haematology Department of Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto. Of the 233 patients studied for CI in the PB, 39 were diagnosed as FA and 13% of them as mosaics. This value, per se, justifies the importance of the implementation of the techniques for analysis of CI and cell cycle in fibroblasts. Therefore, implementation was achieved using cutaneous fibroblast samples from 6 normal individuals and 2 patients enrolled for exclusion of FA, in which the diagnosis was not confirmed. The results obtained in the fibroblasts, both for DEB-induced CI and G2/M arrest, are in agreement with results from the literature for controls and non FA patients. In conclusion, it was possible to implement for the first time and successfully the protocol for fibroblast cultures followed by DEB-induced CI analysis and cell cycle analysis by FC. However, the full success of the protocols still requires confirmation with samples of fibroblasts from FA patients. Unfortunately, it was not possible to get those samples during the period of execution of the present work, due to the rarity of the disease.

C - Agradecimentos

À Prof.^a Doutora Beatriz Porto, orientadora desta tese, pela transmissão de conhecimentos sobre a Anemia de Fanconi, e horas dedicadas nas correcções e sugestões apresentadas, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Prof.^a Doutora Margarida Lima, pela oportunidade que me foi concedida de fazer esta tese, e pela importante colaboração do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto, no estudo do ciclo celular dos fibroblastos por citometria de fluxo, realizado no âmbito deste trabalho.

À técnica Rosa Sousa, pela sua disponibilidade, dedicação e ajuda na implementação da técnica de cultura de fibroblastos.

À técnica Sónia Fonseca, pela sua disponibilidade e colaboração na realização do estudo do ciclo celular dos fibroblastos por citometria de fluxo, usado neste trabalho.

Ao Prof. Doutor Elísio Costa, coordenador deste mestrado, pelo acompanhamento durante o mestrado.

Ao Prof. Doutor Rui Pimenta pela ajuda na análise estatística.

E por fim, mas de modo algum por último, à minha família, por estarem presentes em todos os momentos, ao meu marido Armando, que sempre me incentivou e apoiou nas diferentes etapas da minha vida, e claro, ao meu querido filho Vasco, por tornar os meus dias mais plenos de felicidade.

D - Lista de abreviaturas e símbolos

<, menor do que

≤, menor ou igual a

≥, maior ou igual a

μg, microgramas

μl, microlitros

AA, aminoácido

Ac, anticorpo

AcMo, anticorpo monoclonal

ADN, ácido desoxirribonucleico

AF, Anemia de Fanconi

Ag, antigénio

Anti-IgG, anti-imunoglobulina G

ARN, ácido ribonucleico

BRCA, genes de susceptibilidade para o cancro da mama; do inglês *Breast Cancer Susceptibility Genes*

CD, do inglês *Cluster Designation*

cADN, ADN complementar

CF, citometria de fluxo

CHP, Centro Hospitalar do Porto

CVS, amostra de vilosidades coriónicas; do inglês *Chorionic Villous Sample*

DEB, diepoxibutano

FA, do inglês *Fanconi Anemia*

FC, do inglês *Flow Cytometry*

FITC, isotiocianato de fluoresceína; do inglês *Fluorescein isothiocyanate*

G1, intervalo 1 da interfase

G2, intervalo 2 da interfase

G-CSF, Fator estimulador de colónias de granulócitos; do inglês *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*

GH, hormona do crescimento; do inglês *Growth Hormone*

HLA, antigénios Leucocitários Humanos; do inglês *Human Leukocyte Antigens*

HSA, Hospital de Santo António

HSCT, transplante de células estaminais hematopoiéticas; do inglês *Human Stem Cell Transplantation*

IC, instabilidade cromossômica

ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

ICLs, ligações cruzadas entre cadeias do ADN; do inglês *interstrand cross-links*

IFAR, Registro Internacional da Anemia de Fanconi; do inglês *International Fanconi Anemia Registry*

IP, iodeto de propídeo

LMA, Leucemia Mieloblástica Aguda

M, mitose

MMC, mitomicina C

MO, medula óssea

PBS, tampão fosfato salino; do inglês *Phosphate Buffered Saline*

r.p.m., rotações por minuto

RNAase, ribonuclease ou nuclease do ARN; do inglês *Ribonucleic Acid nuclease*

S, intervalo S da interfase

SMD, Síndrome mielodisplásica

SP, Sangue periférico

TAR, trombocitopenia e ausência de rádio

TMO, transplante da medula óssea

UP, Universidade do Porto

VACTERL, do inglês V: *vertebral anomalies*, A: *anal atresia or imperforate anus*, C: *cardiac anomalies*, TE: *tracheoesophageal fistula*, R: *renal* e L: *limb defects*, para designar defeitos vertebrais, anais, cardíacos, traqueo-esofágicos, renais e dos membros.

E - Lista de quadros, tabelas e figuras

Lista de quadros

Quadro 1. Malformações congénitas nos pacientes com Anemia de Fanconi	7
Quadro 2. Grupos de complementação/Genes da Anemia de Fanconi	16

Lista de tabelas

Tabela 1. Instabilidade cromossómica induzida com DEB (0.05 µg/ml) numa população de 233 pacientes e 108 controlos.....	32
Tabela 2. Resultados obtidos a partir dos ensaios de instabilidade cromossómica espontânea e induzida com diferentes concentrações de DEB em fibroblastos.....	38

Lista de figuras

Figura 1. Características clínicas típicas de pacientes com Anemia de Fanconi.....	8
Figura 2. Curvas de sobrevivência da anemia de Fanconi (AF) descritas na literatura	9
Figura 3. Alterações cromossómicas observadas na Anemia de Fanconi	12
Figura 4. Representação esquemática da via AF/BRCA.....	14
Figura 5. Gráfico ilustrativo da distribuição das frequências das mutações nos genes relacionados com a Anemia de Fanconi	15
Figura 6. Instabilidade cromossómica induzida por DEB (0.05 µg/ml), expressa em nº quebras por célula (média) (A) e em % células aberrantes (média) (B), no grupo controlo (108 casos) e em 233 pacientes com suspeita clínica de Anemia de Fanconi (AF), distribuídos pelos grupos não AF e AF.	33
Figura 7. Instabilidade cromossómica induzida por DEB (0.05 µg/ml), expressa em nº de quebras cromossómicas por célula (média) (A) e em % células aberrantes (média)	

(B), em 233 pacientes com suspeita clínica de Anemia de Fanconi (AF), distribuídos pelos grupos não AF, AF “mosaico” e AF “não mosaico”.	34
Figura 8. Distribuição dos grupos não AF e AF “mosaico” e “não mosaico”, em função da % de células aberrantes e do índice n° quebras por célula. A linha exponencial marca a tendência dos AF.	35
Figura 9. Cromossomas dos fibroblastos de um indivíduo não AF..	37
Figura 10. Representação gráfica da % de células nas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) da amostra F02, sem DEB e com DEB nas concentrações de 0.005 µg/ml e 0.01 µg/ml.	39
Figura 11. Histograma representativo da distribuição da quantidade de ADN celular nos fibroblastos da amostra F02 expostos ao DEB na concentração de 0.01 µg/ml, ilustrando as diferentes fases do ciclo celular.	40
Figura 12. Histograma representativo da distribuição da quantidade de ADN celular nos fibroblastos da amostra F02 não expostos ao DEB, ilustrando as diferentes fases do ciclo celular.....	40
Figura 13. Histogramas representativos do ciclo celular de fibroblastos cultivados na presença de MMC, de um controlo (Non-FA) e de um paciente Fanconi (FA).....	44

F - Índice

A - Resumo.....	i
B - Abstract.....	iii
C - Agradecimentos.....	v
D - Lista de abreviaturas e símbolos	vii
E - Lista de quadros, tabelas e figuras	ix
F - Índice.....	1
I - Introdução	5
I.1 - Anemia de Fanconi: sumário	5
I.2 - Manifestações Clínicas.....	6
I.2.1 - Anomalias congénitas	7
I.2.2 - Endocrinopatias e atraso no crescimento	8
I.2.3 - Tumores sólidos	8
I.2.4 - Manifestações hematológicas	9
I.3 - Fenótipo das células na AF	9
I.4 - Diagnóstico	10
I.4.1 - Diagnóstico clínico	10
I.4.2 - Diagnóstico citogenético.....	11
I.4.3 - Estudos do ciclo celular por citometria de fluxo.....	12

I.4.4 - Diagnóstico molecular	13
I.4.5 - Estratégia dos ensaios	17
I.4.6 - Diagnóstico pré-natal	17
I.4.7 - Diagnóstico genético de pré-implantação	18
I.4.8 - Diagnóstico diferencial	18
I.5 - Tratamento	19
I.5.1 - Administração de androgénios.....	19
I.5.2 - Fatores de crescimento hematopoiético	20
I.5.3 - Transplante com células estaminais hematopoéticas	20
I.5.4 - Tratamento do cancro.....	20
I.6 - Mosaicismo somático	21
I.6.1 - Diagnóstico do mosaicismo	22
II - Objetivos.....	23
III - Material e métodos	25
III.1 - Pacientes e amostras	25
III.2 - Técnicas de diagnóstico.....	26
III.2.1 - Cultura de fibroblastos	26
III.2.2 - Análise citogenética	26

III.2.3 - Análise da instabilidade cromossômica	27
III.2.4 - Preparação dos fibroblastos para a citometria de fluxo.....	27
III.2.5 - Análise por citometria de fluxo do ciclo celular dos fibroblastos.....	28
III.3 - Análise estatística	29
IV - Resultados	31
IV.1 - Caracterização dos pacientes com Anemia de Fanconi	31
IV.2 - Avaliação da frequência de mosaicismo entre os pacientes com Anemia de Fanconi.....	33
IV.3 - Implementação da técnica da cultura de fibroblastos.....	35
IV.4 - Instabilidade cromossômica em culturas de fibroblastos	36
IV.5 - Estudo do ciclo celular dos fibroblastos por citometria de fluxo.....	39
V - Discussão.....	41
VI - Conclusões	45
VII - Bibliografia	47

I - Introdução

I.1 - Anemia de Fanconi: sumário

Características da doença: A Anemia de Fanconi (AF) foi descrita pela primeira vez em 1927 pelo pediatra suíço Guido Fanconi numa família de três irmãos que apresentavam uma variedade de anomalias congénitas, anemia severa, infeções recorrentes e hemorragias espontâneas, resultando numa morte prematura (Fanconi 1927). Em 1966 produziu-se o primeiro grande avanço no estudo da doença, quando *Schroeder* descreveu que esta estava associada à fragilidade cromossómica e reconheceu um padrão de transmissão autossómica recessiva (Schroeder 1966).

A AF é uma doença rara, de transmissão autossómica recessiva (exceto para AF tipo B, que é ligada ao X), com uma incidência estimada de 1:360.000 nascimentos, baseada numa frequência portadora assumida de 1:300 (Swift 1971). Em algumas populações (Ashkenazi Judaico, Cigano Espanhol, e os negros Sul-Africanos) a frequência de portadores de AF é estimada em cerca de 1:100 (Kutler e Auerbach, 2004; Callen *et al.* 2005; Morgan *et al.* 2005). Em Portugal não existe, até ao momento, um levantamento que permita estimar a frequência de pacientes com AF (Porto B *et al.* 2011). Embora a apresentação da doença seja muito heterogénea, cerca de 70% dos pacientes com AF exibem anomalias físicas, tais como alterações esqueléticas, incluindo hipoplasia radial, baixa estatura e microftalmia. Para além disso, a maioria dos pacientes apresenta hipo ou hiperpigmentação da pele, exibindo as manchas características “café com leite”, e com uma frequência mais baixa, malformações como, cardíacas, renais, gastro-intestinais e outras (Dokal 2006). A falência da medula óssea (MO) que resulta em pancitopenia progressiva, apresenta-se normalmente na primeira década de vida, sendo que no nascimento as contagens hematológicas são geralmente normais mas a maioria destes pacientes vem a desenvolver anemia macrocítica, trombocitopenia e leucopenia. Por volta dos 40-50 anos, a incidência acumulada estimada de falência medular é de 90%, a incidência de doenças hematológicas, principalmente síndromes mielodisplásicas (SMD) e leucemias mieloblásticas agudas (LMA) é de 10% -30%, e de malignidades não

hematológicas (tumores sólidos, principalmente da cabeça e pescoço, pele, trato gastrointestinal, e trato genital) de 25% -30% (Blanche *et al.* 2011).

Diagnóstico: O diagnóstico de AF assenta na deteção de aberrações cromossómicas (quebras, rearranjos, figuras radiais), em células após cultura com agentes clastogénicos, tal como o diepoxibutano (DEB) ou a mitomicina C (MMC), que provocam ligações cruzadas entre as cadeias (ICLs, do inglês *interstrand cross-links*) do ADN. O diagnóstico genético é complexo devido à existência de (pelo menos) 15 genes responsáveis pelos grupos de complementação AF conhecidos: A, B, C, D1 (BRCA2), D2, E, F, G, I, J (BRIP1), L, M, N (PALB2), O (RAD51C) e P (SLX4). Os últimos dois genes são ainda provisórios, pois não se enquadram do ponto de vista biológico, não estão completamente caracterizados e têm poucos indivíduos representativos. O teste genético molecular está disponível para diagnóstico clínico para a maior parte dos genes, mas o estudo é difícil quando não se conhece o gene afetado. Se o grupo de complementação é identificado, o teste genético molecular pode ser dirigido para o gene apropriado.

Tratamento: A administração de androgénios melhora os valores sanguíneos (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas), em aproximadamente 50% dos indivíduos com AF; administração subcutânea de fatores estimuladores de colónias de granulócitos (G-CSF, do inglês *Granulocyte - Colony Stimulating Factor*) aumenta o número de neutrófilos em alguns casos; o transplante de células estaminais hematopoiéticas (HSCT, do inglês *Human Haematopoietic Stem Cell Transplantation*) é a única terapia curativa para as manifestações hematológicas de AF, mas o risco de tumores sólidos permanece e pode mesmo aumentar. Todos estes tratamentos têm uma potencial toxicidade significativa.

I.2 - Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas agrupam-se em quatro grupos: malformações ou anomalias físicas existentes ao nascimento, endocrinopatias e atraso no crescimento, tumores sólidos e doenças hematológicas, incluindo insuficiência da medula óssea e desenvolvimento de leucemia aguda ou síndrome mielodisplásico (SMD).

I.2.1 - Anomalias congênitas

Cerca de 60-75% das crianças apresentam malformações, que podem afetar qualquer órgão. Podem ser em grande número ou, inversamente, muito poucas. O quadro 1 mostra uma lista de malformações e a sua frequência, e a figura 1 mostra algumas das características clínicas mais frequentes.

Quadro 1. Malformações congênitas nos pacientes com Anemia de Fanconi

Malformação	Frequência %
Esquelética (extremidades superiores, anca, costelas)	71
Pigmentação da pele (manchas "café com leite", hiper e hipopigmentação)	64
Baixa estatura	63
Microftalmia	38
Problemas no trato urinário	34
Malformações nos genitais masculinos	20
Atraso mental	16
Malformações no trato gastrointestinal (anorectal, atresia duodenal)	14
Anomalias cardíacas	13
Anomalias do ouvido	11
Anomalias do sistema nervoso central (microcefalia, hidrocefalo, <i>septum pellucidum</i>)	8
Sem anomalias	30

(Fonte: Dokal, 2000; adaptado)

Cerca de 30% dos pacientes com AF não apresentam malformações congênitas típicas da AF e, por outro lado, outras doenças que não a AF, podem apresentar estas malformações; assim sendo, estas não podem, por si só, servir de diagnóstico de AF.

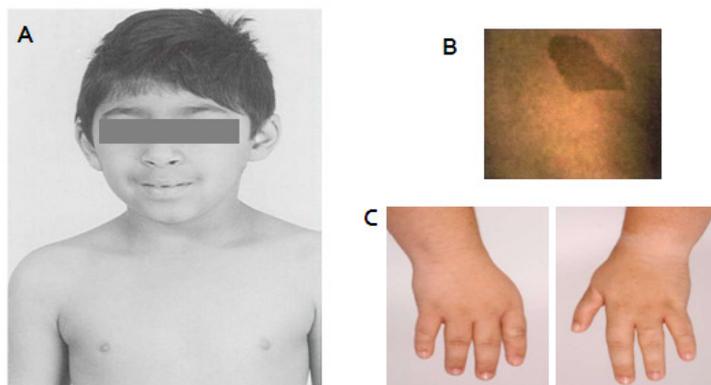


Figura 1. Características clínicas típicas de pacientes com Anemia de Fanconi. Fácies típica (A), manchas do tipo “café com leite” (B) e malformações das mãos (C).

I.2.2 - Endocrinopatias e atraso no crescimento

Estas manifestações encontram-se em cerca de 80% dos pacientes com AF (Wajnrajch MP *et al.* 2001), e consistem em baixa estatura, deficiência da hormona de crescimento, hipotireoidismo, intolerância à glicose, hiperinsulinismo e diabetes mellitus (Swift M *et al.* 1972). A baixa estatura é o produto de vários eventos, consequência de uma hipofunção hipotálamica, uma deficiência da hormona de crescimento (GH, do inglês *Growth Hormone*), resistência da acção da GH e hipotireoidismo. Pacientes dos grupos FANCA e FANCG são relativamente mais altos do que os dos outros grupos e os do grupo FANCC são os mais baixos. A substituição hormonal não corrige o tamanho destas crianças para o nível esperado. Alguns pacientes não têm défice hormonal detetável que justifique a baixa estatura e uma pequena percentagem de pacientes têm estatura normal.

I.2.3 - Tumores sólidos

O risco de desenvolvimento de tumores sólidos aumenta, especialmente após os 20 anos. As mulheres têm também o risco de desenvolver tumores da mama, colo do útero e vulva. Em ambos os sexos, em todas as idades, mas especialmente em homens a partir de 40 anos de idade, especialmente se são fumadores, há um risco de desenvolver cancro da cabeça, pescoço e esófago. Também tumores do fígado têm sido descritos geralmente em pacientes que recebem tratamento com androgénios (Alter BP 1996).

I.2.4 - Manifestações hematológicas

A AF é caracterizada pela falência progressiva da medula óssea que origina uma pancitopenia no sangue periférico, responsável pela astenia, anorexia, infecções e hemorragias. Uma vez detetadas as primeiras alterações hematológicas, a evolução para a pancitopenia ocorre em regra em cerca de 3 anos. Um pequeno número de pacientes inicia a alteração hematológica na presença de uma hemopatia grave, fundamentalmente síndromes mielodisplásicas (SMD), em 5% dos casos, e leucemia mieloblástica aguda (LMA) por volta de 10%. A tendência para apresentar hemopatias malignas durante o curso da evolução é muito elevada, cerca de 50%, com um tempo médio de aparição de 7 anos. Mais da metade dos pacientes morre antes de atingir a puberdade. Dos pacientes que chegam aos 40 anos, 98% têm doenças hematológicas graves (D'Andrea A *et al.* 2002). A figura 2 mostra a probabilidade de sobrevivência da AF descritas na literatura.

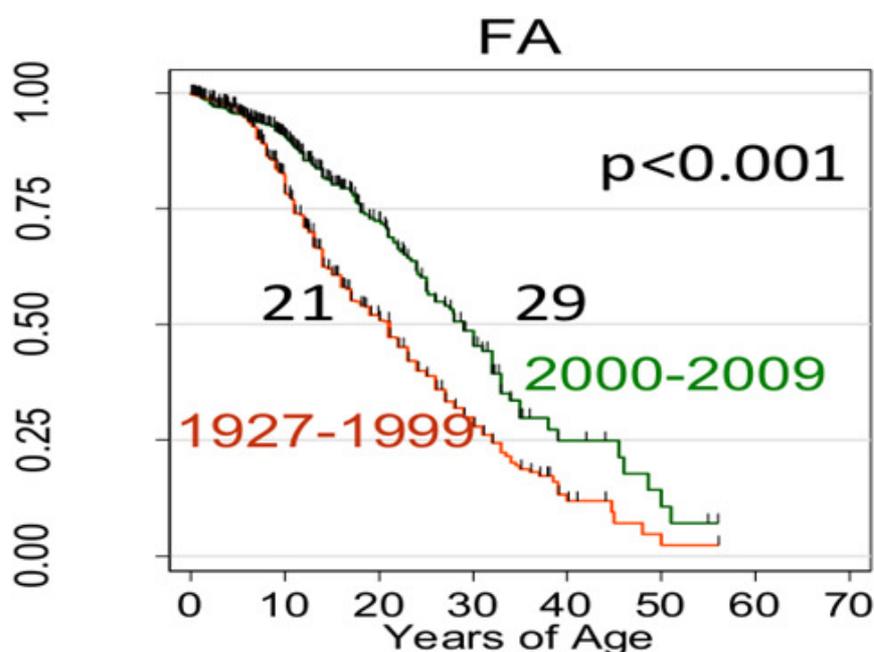


Figura 2. Curvas de sobrevivência da anemia de Fanconi (AF) descritas na literatura

(Fonte: Shimamura & Alter, Blood Reviews, 2010)

I.3 - Fenótipo das células na AF

A principal característica das células AF é a sua sensibilidade a ICLs. No entanto, estas células apresentam também outras características como sejam, anomalias nos telômeros, dano

oxidativo e desregulação da produção de citocinas apoptóticas. Estas características, geradoras de instabilidade cromossômica, encontram-se relacionadas entre si, e provavelmente todas explicam parte do fenótipo dos pacientes, embora o grau de contribuição de cada uma ainda não seja bem conhecido. Como consequência desta IC, as células podem entrar em apoptose ou então sofrerem transformações celulares que originam tumores sólidos e hematológicos.

I.4 - Diagnóstico

I.4.1 - Diagnóstico clínico

Na conferência de consenso de 2008 (Anemia de Fanconi: Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento 2008) foram acordadas as seguintes recomendações para o diagnóstico:

- **Alterações físicas**, incluindo a baixa estatura, a pigmentação anormal da pele, malformações dos polegares, antebraços, sistema esquelético, olhos, rins e trato urinário, ouvido, coração, sistema gastrointestinal, cavidade oral, sistema nervoso central; perda auditiva; hipogonadismo e atraso no desenvolvimento. Estas manifestações são variáveis e aproximadamente 25% -40% dos pacientes não têm alterações físicas. Assim, a ausência destas alterações não exclui o diagnóstico de AF.
- **Falência progressiva da medula óssea**, que se manifesta inicialmente por trombocitopenia, leucopenia, seguida de anemia, geralmente na idade de 7-8 anos. A medula óssea, inicialmente normocelular, torna-se progressivamente hipoplásica.
- **Início da anemia aplásica em adulto**, com macrocitose dos glóbulos vermelhos e níveis elevados de hemoglobina F.
- **Síndrome mielodisplásica ou leucemia mieloblástica aguda.**
- **Tumores sólidos**, apresentando-se atipicamente em pacientes jovens e na ausência de outros fatores de risco. Estes tumores incluem os carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço, esófago e vulva, cancro cervical e tumores hepáticos (geralmente, mas não exclusivamente, associados ao tratamento com androgénios orais). Os tumores sólidos podem ser a primeira manifestação da AF em indivíduos que não têm anomalias congénitas e não apresentam falência da medula óssea.
- **Toxicidades desordenadas de quimioterapia ou radioterapia.**

I.4.2 - Diagnóstico citogenético

Estudos de instabilidade cromossômica. O diagnóstico de AF baseia-se em testes citogenéticos de IC que analisam o aumento das quebras e rearranjos cromossômicos na presença de DEB (Auerbach 1993), ou de MMC (Cervenka *et al.* 1981). Ao tratar as células AF com DEB ou MMC, a incapacidade destas para reparar os ICLs faz com que se gerem roturas cromatídicas que podem dar origem à formação de estruturas tri e tetra-radiais, como resultado de uma má união entre os extremos quebrados. A taxa de IC é mais variável com MMC, podendo dar origem a falsos positivos, sendo também um composto mais instável que o DEB, perdendo atividade com o tempo; assim, alguns centros preferem usar DEB, enquanto outros centros usam ambos os agentes clastogénicos.

O sangue periférico é cultivado com um mitogénio de células T, fitohemaglutinina, na presença e ausência do agente alquilante. Um total de 50 células em metafase são analisadas para IC, que inclui quebras cromossômicas e rearranjos, principalmente do tipo formação de radiais. Os resultados são comparados com os das células controle normais e células AF positivas.

- Culturas sem o agente clastogénico podem ser usadas para medir a taxa de quebras espontâneas.
- Os resultados são relatados como o número médio de quebras/célula ou como a frequência de células com 1,2,3...> 8 quebras.
- O número de células com formas radiais é considerado.

Em resposta ao DEB ou MMC, os indivíduos com AF apresentam:

- Aumento das taxas de IC espontânea (pode ser visto na AF, bem como em outras síndromes de quebras cromossômicas).
- Aumento de quebras e figuras radiais (fig. 3) que distinguem AF de outras síndromes de quebras cromossômicas.

O aumento da sensibilidade ao DEB / MMC está sempre presente, independentemente do fenótipo, anomalias congénitas, ou gravidade da doença.

A interpretação dos resultados do teste de IC pode ser complicada pelo aparecimento de mosaicismo, definindo-se este como a presença de duas populações de linfócitos: uma

Introdução

mostrando aumento da sensibilidade ao DEB / MMC e a outra mostrando níveis normais de quebras cromossômicas em resposta ao DEB / MMC. O mosaïcismo dos linfócitos pode surgir em indivíduos que inicialmente seriam sensíveis ao DEB / MMC. Estes indivíduos podem ter um teste DEB / MMC falsamente normal. Se nestes casos a suspeita clínica de AF permanece, o teste DEB / MMC pode ser realizado noutro tipo de células alternativas, como fibroblastos cutâneos. Os pacientes com AF heterozigóticos não podem ser diagnosticados pelo teste de DEB / MMC, porque os resultados estão dentro dos valores normais.

Alterações:									
Ring	Dic ²	Frag ³	GCT ⁴	QCT ⁵	GCS ⁶	QCS ⁷	TR ⁸	QR ⁹	REARR ¹⁰
									
									
Pontuações:									
2	2	1	0	1	0	1	2	2	2

Figura 3. Alterações cromossômicas observadas na Anemia de Fanconi

Ring, cromossoma em anel; **Dic**, cromossoma dicêntrico; **Frag**, fragmento cromossômico; **GCT**, *gap* de cromatídeo; **QCT**, quebra de cromatídeo; **GCS**, *gap* de cromossoma; **QCS**, quebra de cromossoma; **TR**, figura tri-radial; **QR**, figura tetra-radial; **REARR**, rearranjos cromossômicos.

I.4.3 - Estudos do ciclo celular por citometria de fluxo

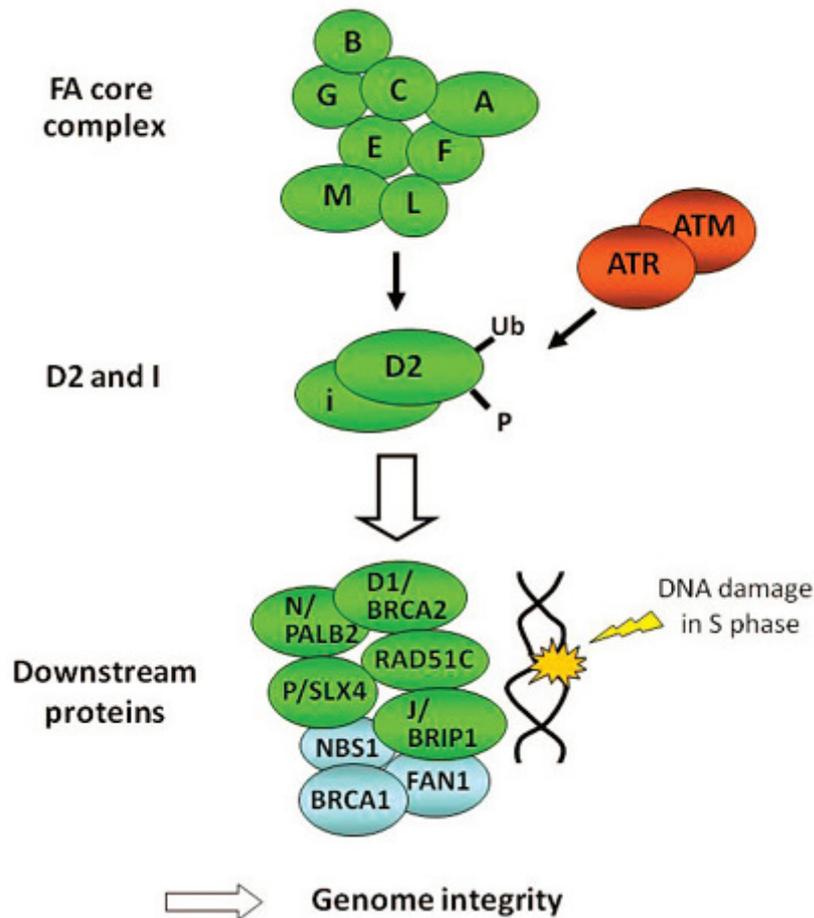
Paragem do ciclo celular. A MMC ou DEB induzem paragem do ciclo celular na fase G2. Assim, a avaliação por CF da paragem em G2 também tem sido usada para diagnóstico (Pulsipher *et al.* 1998). Neste teste, os fibroblastos da pele primários são expostos a MMC ou DEB e analisados por CF, para avaliar a percentagem de células que ficam acumuladas na fase G2 do ciclo celular. AF é suspeita quando uma grande fração de células se acumula na fase G2.

I.4.4 - Diagnóstico molecular

I.4.4.1 - Importância da via AF/BRCA para o diagnóstico molecular

Os agentes alquilantes ligam-se de forma covalente a ambas as cadeias da hélice de ADN, bloqueando a replicação do ADN e a transcrição. Como consequência da replicação parada produzida por ICLs ou na entrada da fase S, a via AF é ativada (Kee *et al.* 2010).

Proteínas codificadas pelos genes AF trabalham numa via comum de sinalização de reparação do ADN, a via AF / BRCA (fig. 4), que coopera estreitamente com outras proteínas de reparação do ADN, para repararem ligações cruzadas entre cadeias de ADN (ICLs) durante a replicação (Moldovan *et al.* 2009; Kee *et al.* 2010). Um evento central nesta via é a monoubiquitinação de FANCD2 e FANCI após dano celular, que é mediada por um grupo de proteínas AF a montante (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, e FANCM) que fazem parte de um grande complexo nuclear chamado complexo nuclear AF. A monoubiquitinação de FANCD2 e FANCI estabiliza o complexo nuclear e promove a sua retenção nos garfos de replicação parados. FANCM reconhece as ligações cruzadas entre cadeias de ADN e promove a sinalização ATR para reparação do ADN. FANCD2 e FANCI monoubiquitinadas interagem com as proteínas de AF a jusante tais como FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCI/BRIP1, FANCP/SLX4, RAD51C, e a sua proteína associada, BRCA1. FANCI (nuclease 1 Fanconi associada), uma proteína recentemente identificada Fanconi associada, fornece uma atividade de nuclease durante a reparação ICL (Liu *et al.* 2010; Kratz *et al.* 2010; Mackay *et al.* 2010). Proteínas de AF também podem ter outras funções ou participar em outras vias para além da reparação do ADN em resposta ao *stress* celular (Naim *et al.* 2009; Briot *et al.* 2008).



(Fonte: Jean Soulie, American Society of Hematology, 2011; as proteínas FANCD2 estão assinaladas a verde)

Figura 4. Representação esquemática da via AF/BRCA.

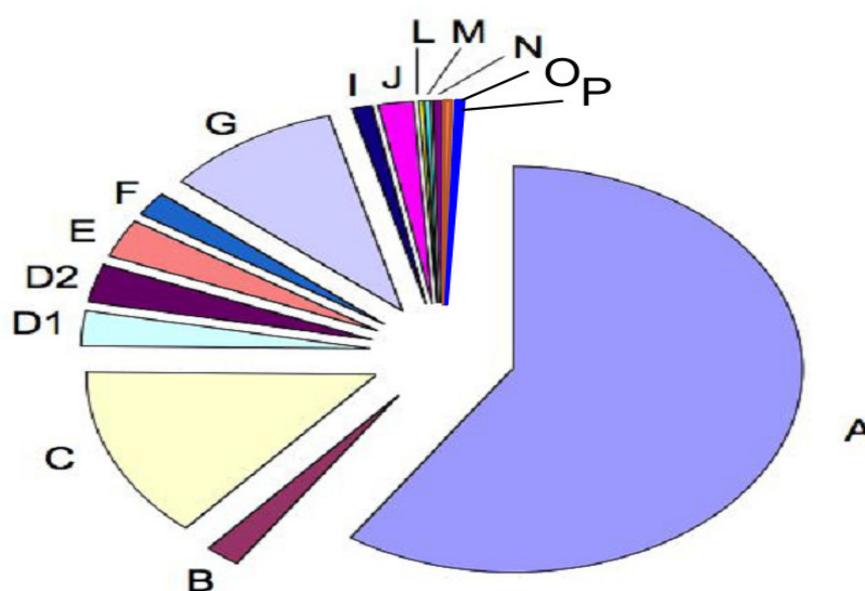
I.4.4.2 - Ensaio de “imunoblot” da monoubiquitinação da proteína FANCD2

As proteínas da anemia de Fanconi A, B, C, E, F, G, I, L, e M formam o complexo central necessário para a monoubiquitinação da proteína FANCD2 a jusante. A monoubiquitinação da proteína FANCD2 é essencial para a integridade funcional da via AF medida pela resistência ao MMC ou DEB. Porque a monoubiquitinação da proteína FANCD2 está intacta em outras síndromes de falência da medula óssea e síndromes de quebras cromossômicas testados até à data (Shimamura *et al.* 2002), a avaliação da monoubiquitinação da proteína FANCD2 por imunotransferência oferece um teste rápido de diagnóstico para anemia de Fanconi. Note-se que os subtipos raros AF AF-D1 (BRCA2), AF-J (BRIP1), e AF-N (PALB2) seriam perdidos por essa abordagem (porque eles são a jusante de FANCD2), assim

como os indivíduos com mosaïcismo somático. Este teste está disponível apenas para pesquisa.

I.4.4.3 - Determinação dos grupos de complementação

Com base em estudos de fusão com células somáticas, pelo menos, 15 grupos de complementação AF foram identificados: A, B, C, D1 (BRCA2), E, D2, F, G, I, J (BRIP1/BACH1), L, M, N (PALB2), O (RAD51C) e P (SLX4). A fig.5 mostra a distribuição das frequências das mutações dos genes já identificados.



(Dados da *Leiden Open Variation Database* disponíveis em <http://chromium.liacs.nl/LOVD2/FANC/home.php>).

Figura 5. Gráfico ilustrativo da distribuição das frequências das mutações nos genes relacionados com a Anemia de Fanconi

O grupo de complementação AF (quadro 2) pode ser caracterizado através da identificação de qual dos cADN dos 15 genes relacionados com a AF, quando expressos nas células do indivíduo afetado, corrige o fenótipo de sensibilidade DEB / MMC (Pulsipher *et al.* 1998). Para determinar qual o gene afetado em pacientes com AF, são realizados estudos de fusão das suas células com células de Fanconi em que se conhece o gene mutado. Quando as células de Fanconi são fundidas com células de um indivíduo saudável, desaparece a instabilidade cromossômica das células de Fanconi pela função fornecida pelos genes homólogos das células saudáveis. Para determinar se um paciente pertence ao grupo de complementação

Introdução

FANCA, as suas células são fundidas com células deficientes nesse gene. Se o defeito celular não for corrigido com esta fusão, mas sim com a fusão com outras linhagens celulares, a conclusão é que o paciente corresponde ao grupo de complementação FANCA.

Quadro 2. Grupos de complementação/Genes da Anemia de Fanconi

GC	Genes AF	Designação	Locus	cDNA	Exões	AA	%
A	FANCA	<i>Fanconi anemia, complementation group A</i>	16q24.3	5.5	43	1455	~70
B	FANCB	<i>Fanconi anemia, complementation group B</i>	Xp22.3.1	2.8	10	859	Raro
C	FANCC	<i>Fanconi anemia, complementation group C</i>	9q22.3	4.6	14	558	~10
D1	BRCA2 (*)	<i>Breast cancer 2, early onset</i>	13q12-q13	11.4	27	3418	Raro
D2	FANCD2	<i>Fanconi anemia, complementation group D2</i>	3p25.3	5	44	1451	Raro
E	FANCE	<i>Fanconi anemia, complementation group E</i>	6p22-p21	2.5	10	536	~5
F	FANCF	<i>Fanconi anemia, complementation group F</i>	11p15	1.3	1	374	Raro
G	FANCG	<i>Fanconi anemia, complementation group G</i>	9p13	2.5	14	622	~10
I	FANCI (KIAA1794)	<i>Fanconi anemia, complementation group I</i>	15q25-26	4.5	38	1328	Raro
J	BRIP1 (*)	<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>	17q22.2	4.6	20	1249	Raro
L	FANCL (PHF9) (POG)	<i>Fanconi anemia, complementation group L</i>	2p16.1	1.7	14	375	Raro
M	FANCM (Hef)	<i>Fanconi anemia, complementation group M</i>	14q21.3	6.5	22	2014	Raro
N	PALB2 (*)	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>	16p12.1	3.5	13	1186	Raro
O	RAD51C (*)	<i>RAD51 homolog C (S. cerevisiae)</i>	17q25.1	2.7	9	76	Raro
P	SLX4	<i>SLX4 structure-specific endonuclease subunit homolog (S. cerevisiae)</i>	16p13.3	26.6	15	1834	Raro

Abreviaturas: GC, grupo de complementação; AA, aminoácidos. (*) genes do cancro da mama

Também é possível determinar o grupo de complementação através da inserção de genes clonados em uma amostra de linfócitos de pacientes com AF utilizando vírus geneticamente modificados. Se, após a inserção de um gene específico o fenótipo das células Fanconi inverte, significa que o doente pertence a esse grupo de complementação específico.

I.4.4.4 - Análise da sequência génica

A análise da sequência génica está disponível para todos os genes associados com a AF que são conhecidos. No entanto, esta análise é complicada pelo número de genes a serem analisados, o grande número de possíveis mutações em cada gene, a presença de grandes inserções ou deleções em alguns genes, e o grande tamanho de muitos dos genes relacionados com a AF. Se o grupo de complementação foi estabelecido, a mutação responsável pode ser determinada pelo sequenciamento do gene correspondente.

I.4.4.5 - Análise deleção / duplicação

Esta análise é usada para detetar deleções de um ou mais exões ou um gene inteiro e está disponível para diagnóstico clínico, apenas em alguns dos genes associados com a AF.

I.4.5 - Estratégia dos ensaios

Em resumo, a confirmação / estabelecimento do diagnóstico de AF deve ser feita do seguinte modo:

- Realizar testes de citogenética em sangue periférico para verificação do aumento de quebras cromossômicas, rearranjos e figuras radiais na presença de DEB ou MMC.
- Realizar testes de citogenética na presença de DEB ou MMC em fibroblastos da pele, se o teste em sangue periférico foi normal ou inconclusivo e houver suspeita de mosaicismo.
- Assim que o teste citogenético confirme o diagnóstico de AF, deve-se fazer a análise do grupo de complementação (Chandra *et al.* 2005) e, em seguida, estudar a sequência génica.

I.4.6 - Diagnóstico pré-natal

Está indicado nas gestações em que o feto tem um risco de 25% de desenvolver AF e requer a identificação prévia das mutações causadoras da doença na família. O aconselhamento

genético é a parte mais importante de qualquer procedimento de diagnóstico pré-natal. A família que tem um membro com o diagnóstico de AF deve conhecer perfeitamente o modo de transmissão da doença e a possibilidade de diagnóstico pré-natal, com os riscos que o procedimento acarreta. O diagnóstico é feito através da realização de testes citogenéticos na presença de DEB / MMC para avaliar o aumento de IC em células fetais obtidas por colheita da amostra das vilosidades coriônicas (CVS, *Chorionic Villus Sampling*) entre as dez e as doze semanas de gestação, ou por amniocentese, normalmente realizada entre as 15-18 semanas de gestação. No entanto, se as mutações são conhecidas na família, os testes genéticos moleculares são o método de escolha para o diagnóstico pré-natal.

I.4.7 - Diagnóstico genético de pré-implantação

O diagnóstico genético de pré-implantação permite avançar o diagnóstico de AF, no estado de embrião, obtido por fecundação *in vitro*, o que lhe permite selecionar embriões saudáveis para serem transferidos para o útero materno (Sevilla *et al.* 2002). O objetivo é obter uma prole saudável em casais com grandes probabilidades de terem descendência afetada. Contudo será necessário conhecer a alteração genética específica que afeta a família. O diagnóstico genético de pré-implantação em si não aumenta o risco de qualquer complicação obstétrica particular, com a possível exceção da placenta prévia (Strom *et al.* 2000). O diagnóstico genético de pré-implantação também tem sido utilizado para selecionar os embriões compatíveis para os antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) humanos (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigens*) não afetados de doença, para obtenção de progenitores hematopoiéticos para o transplante, a partir de um novo filho saudável.

I.4.8 - Diagnóstico diferencial

A AF é a causa genética mais comum de anemia aplásica e uma das causas genéticas mais comuns de malignidades hematológicas.

O diagnóstico diferencial deve realizar-se com outras síndromes de IC, doenças ou síndromes que possam ter características clínicas comuns e com outras doenças hematológicas. As síndromes de IC tais como, ataxia-telangiectasia, síndrome de Bloom, xeroderma pigmentoso, etc. podem ter uma elevada taxa de quebras cromossômicas espontâneas, no entanto, só a AF

as apresenta na presença do DEB. Síndromes que podem ter semelhanças clínicas com AF incluem neurofibromatose tipo 1, que pode ser considerada porque apresenta manchas da pele “café com leite”; síndrome TAR (Trombocitopenia com Ausência de Rádio); síndrome VACTERL (sigla em inglês: V: vertebral anomalies, A: anal atresia or imperforate anus, C: cardiac anomalies, TE: tracheoesophageal fistula, R: renal e L: limb defects, para designar os defeitos vertebrais, anais, cardíacos, traqueo-esofágicos, renais e dos membros); etc. A AF é a causa genética mais comum de falência da medula óssea. O diagnóstico diferencial deve ser feito com todas as síndromes ou doenças congênitas ou adquiridas que provocam falência medular ou citopenias isoladas severas (Alter BP *et al.* 1993).

I.5 - Tratamento

O tratamento atual para os pacientes com AF é dirigido à falência medular. Considera-se falência medular quando a contagem de neutrófilos é $<1000 /\text{mm}^3$, a de plaquetas $<50000 \text{ mm}^3$, ou de hemoglobina $<8\text{g/dl}$. O transplante de medula óssea (TMO) é o único tratamento curativo que existe, embora seja muito usada a administração de androgénios como tratamento paliativo, quando aparecem os primeiros sintomas de falência medular.

I.5.1 - Administração de androgénios

Os androgénios melhoram as contagens hematológicas em aproximadamente 50% dos indivíduos com AF. A primeira resposta é observada em glóbulos vermelhos, com reticulocitose e aumento da hemoglobina, geralmente ocorrendo durante o primeiro ou segundo meses de tratamento. Em geral, obtêm-se melhorias mais acentuadas na contagem dos glóbulos vermelhos e respostas mais variáveis nas contagens de leucócitos e de plaquetas. Ao nível da contagem de plaquetas, as respostas são geralmente incompletas e podem ser observadas apenas após vários meses de terapia. A resistência à terapia pode-se desenvolver ao longo do tempo (geralmente anos). Os efeitos colaterais da administração de androgénios incluem toxicidade hepática, tais como aumento das enzimas hepáticas, colestase, peliose hepática (lesão vascular com múltiplos cistos cheios de sangue), e tumores hepáticos (Shimamura e Alter, 2010).

I.5.2 - Fatores de crescimento hematopoiético

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, do inglês *Granulocyte Colony Stimulating Factor*), administrado por via subcutânea, melhora a contagem de neutrófilos em alguns indivíduos.

I.5.3 - Transplante com células estaminais hematopoiéticas

O transplante com células estaminais hematopoiéticas (HSCT, do inglês *Human Stem Cell Transplantation*), nomeadamente o transplante de medula óssea (TMO), é atualmente, a única terapia curativa para as manifestações hematológicas da AF, incluindo anemia aplásica, síndromes mielodisplásicas (SMD) e leucemias mieloblásticas agudas (LMA). As células estaminais de doadores podem ser obtidas a partir de medula óssea, sangue periférico (após a estimulação da hematopoiese do dador com G-CSF), ou sangue do cordão umbilical. Idealmente, o HSCT é realizado antes do desenvolvimento de SMD / LMA e antes da evolução para a necessidade de múltiplas transfusões (administradas para suporte hematopoiético) (MacMillan e Wagner, 2010).

Uma vez que os pacientes com AF são extremamente sensíveis à toxicidade da quimioterapia usual e regimes de radiação utilizados na preparação para HSCT, estes tratamentos deverão ser administrados em doses reduzidas. Além disso, melhorias na profilaxia e tratamento da doença levaram a um maior recurso de doadores alternativos e diminuiu as diferenças nos resultados entre os transplantes entre irmãos e transplantes de doadores não relacionados. Indivíduos cujas manifestações hematológicas têm sido tratadas com sucesso com o transplante parecem ter um risco aumentado para tumores sólidos, particularmente carcinomas das células escamosas da língua. Num estudo representativo, o risco foi quatro vezes maior e a idade média de início foi de 16 anos mais cedo do que em pacientes com AF não transplantados (Rosenberg *et al.* 2005).

I.5.4 - Tratamento do cancro

O tratamento das neoplasias malignas é um desafio, entre outros, pelo aumento da toxicidade associada à quimioterapia e radiação em pacientes com AF.

I.6 - Mosaicismo somático

Mosaicismo somático é definido como a existência de duas ou mais populações de células com diferentes constituições genéticas num indivíduo. O mosaicismo somático pode ser causado por novas mutações no ADN ou por reversão espontânea das mutações herdadas (Lo Ten Foe JR *et al.* 1997; Gregory JJ *et al.* 2001). O mosaicismo não é um fenómeno exclusivo de AF, tem também sido observado noutras doenças, mas sempre em tecido hematopoiético, devido à elevada proliferação celular e à grande capacidade de colonização da medula óssea (Hirschhorn *et al.* 1996). Em culturas de linfócitos tratados com o agente alquilante observam-se duas populações de células: uma população com várias roturas cromatídicas em cada célula, que corresponde á população típica de células AF, não revertida, e outra população sem roturas que corresponde á população de células revertidas. O grau de colonização da medula por parte das células revertidas pode ser muito variável, de forma que o diagnóstico nestes casos pode ser complicado. A reversão original da mutação pode produzir-se numa célula mãe ou numa célula diferenciada de alguma das linhagens hematopoiéticas. Dependendo do estado de diferenciação da célula, a reversão envolverá todas as linhagens hematopoiéticas ou só parte delas. Quando a reversão se produz numa célula mãe as contagens hematopoiéticas do paciente voltam a níveis normais, processo que se conhece como “terapia génica natural” (Youssofian, 1996; Lo Ten Foe *et al.* 1997). Cerca de 15-25% dos pacientes desenvolvem mosaicismo durante a sua vida (Lo Ten Fo *et al.* 1997; Soulier *et al.* 2005) e geralmente a subpopulação de células revertidas substitui gradualmente a outra subpopulação, de modo que a maior parte dos linfócitos se tornam mais e mais resistentes a agentes alquilantes. Assim que a proporção de células resistentes é maior que 20%, essas células são detetáveis por diagnóstico baseado na hipersensibilidade de ICLs a agentes alquilantes. Mas assim que a percentagem de células revertidas atinge perto de 100%, o diagnóstico AF tem de ser confirmado em fibroblastos da pele, porque as células do mesênquima permanecem sensíveis aos agentes alquilantes (Joenje e Patel, 2001). Embora a presença de mosaicismo sugira um fenótipo hematológico mais brando, os pacientes que o apresentam frequentemente desenvolvem falência progressiva na medula óssea ou leucemia (Gregory *et al.* 2001). Outros autores sugerem ainda que o mosaicismo somático pode predispor a complicações após TMO, tal como a falência da medula óssea ou a rejeição do enxerto (Zanis-Neto *et al.* 2005).

I.6.1 - Diagnóstico do mosaicismo

Os pacientes com AF “mosaico” podem ser avaliados como não AF no ensaio de IC em SP, quando a repopulação da MO por parte das células revertidas se aproximar dos 100%. Os pacientes com AF “mosaico” apresentam um fenótipo celular normal no ensaio do bloqueio do ciclo celular em G2 em resposta a agentes indutores de ICLs e também apresentam uma monoubiquitinação normal da proteína FANCD2, levando a um diagnóstico errado. No entanto, uma pequena fração de “mosaicos” apresenta hipersensibilidade a agentes indutores de ICLs comparável a um paciente AF (Casado *et al.* 2007). Se um paciente tem o ensaio de IC negativo no SP mas mesmo assim existe suspeita clínica de AF, devem ser realizadas provas adicionais, para se descartar a hipótese de se tratar de um caso de reversão celular total. Como a reversão se produz a nível hematopoiético, realizam-se análises de IC ou bloqueio do ciclo celular em G2 em células mesênquimatosas, como sejam os fibroblastos de pele. No caso das contagens hematológicas serem normais dever-se-á proceder a uma repetição do ensaio de IC para se verificar se realmente se trata de mosaicismo somático.

Em resumo, embora o estudo de IC induzida por DEB em culturas de SP seja o teste de eleição para o diagnóstico de AF, este deverá ser sempre complementado com estudos em fibroblastos para os casos de mosaicismo somático.

II - Objetivos

A análise de instabilidade cromossômica (IC) induzida com DEB em culturas de linfócitos constitui o método de eleição para o diagnóstico de Anemia de Fanconi (AF). No entanto pode não ser o mais sensível para os casos de mosaicismo. Nestas situações deverá ser feito, como complemento, o estudo de IC em culturas de fibroblastos, mas até ao momento esta técnica ainda não tinha sido implementada no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP.

Assim, os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- Avaliar a frequência de mosaicismo entre os pacientes com AF previamente diagnosticados.
- Implementar e otimizar a técnica de detecção de IC em culturas de fibroblastos, na presença ou na ausência de DEB (espontâneas) para determinação do valor de referência do laboratório, analisando:
 - A frequência das variáveis de IC (quebras e rearranjos cromossômicos) induzidas e não induzidas por DEB.
 - A associação da frequência das diferentes variáveis com o resultado do teste DEB positivo e DEB negativo.
- Implementação e otimização da técnica utilizada para estudo da progressão do ciclo celular dos fibroblastos (com DEB e sem DEB) por citometria de fluxo, analisando:
 - A percentagem de células que se acumulam em cada fase do ciclo celular.
- Comparação dos resultados obtidos no estudo de instabilidade cromossômica com os resultados já descritos na literatura.

III - Material e métodos

III.1 - Pacientes e amostras

Para a realização deste estudo, foram recolhidas oito amostras de biopsias de pele em pacientes portugueses, sendo seis dessas amostras provenientes de indivíduos saudáveis submetidos a cirurgias diversas (F01, F02, F03, F04, F05 e Controlo 1) e que foram usadas como controlos, e duas de pacientes (Paciente 1 e Paciente 2) enviadas ao Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP para exclusão da anemia de Fanconi. As biopsias das amostras F01, F04 e F05 foram retiradas da região abdominal de indivíduos de ambos os sexos com uma média de idades de 50 anos, a amostra F02 foi também retirada da região abdominal de uma criança de 10 anos, e a amostra F03 retirada do prepúcio de uma criança de quatro anos. As biopsias das amostras Paciente 1 e Paciente 2 foram retiradas da região superior do antebraço. Das amostras de biopsias de pele derivaram culturas de fibroblastos primários. Para obtenção das amostras, obteve-se previamente o consentimento informado.

No Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP, onde foi efetuado este estudo, ainda não estava implementado um protocolo para cultura de fibroblastos primários de pele humana, o que gerou a necessidade de o estabelecer e testar. Foi também realizado e testado pela primeira vez no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP, um protocolo de citometria de fluxo para estudo do ciclo celular nos fibroblastos, e que deve ser efetuado como complemento aos estudos citogenéticos. As amostras de biópsia de pele foram usadas para testes de instabilidade cromossómica induzida com DEB e na ausência de DEB (espontâneas) e para estudar a influência do DEB no ciclo celular de fibroblastos não tratados e tratados com DEB.

Foi também feito um estudo comparativo entre a instabilidade cromossómica, observada nas amostras dos fibroblastos destes indivíduos, e nas amostras de sangue periférico de 233 pacientes portugueses e 108 controlos, previamente estudadas no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP. O período dos ensaios com as amostras de fibroblastos situou-se entre 2010-2011 e dos estudos com as amostras de sangue periférico entre 1992-2011.

III.2 - Técnicas de diagnóstico

III.2.1 - Cultura de fibroblastos

O protocolo de cultura de fibroblastos usado neste estudo foi adaptado do protocolo de A. Auerbach (2003), com algumas alterações. As culturas de fibroblastos primários para os ensaios de instabilidade cromossômica foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo: a biópsia de pele foi cortada com uma lâmina esterilizada em pedaços muito pequenos que seguidamente foram colocados em frascos T, previamente banhados com meio Ham (GIBCO Invitrogen Corporation, USA) suplementado com 1% Kanamicina, 1% penicilina/estreptomicina, 1% fungizona, 1% L-glutamina, 1% ultroser e 5% soro bovino fetal. Decorridas 24 horas, acrescentou-se mais meio Ham suplementado, e os frascos foram colocados na estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

Os fibroblastos foram observados periodicamente ao microscópio invertido (Olympus CKX41), para controlar o seu crescimento e a existência de possíveis contaminações. Também periodicamente foi mudado o meio, assim como monitorizadas a temperatura e a concentração de CO₂.

Após desenvolvimento suficiente dos fibroblastos adicionou-se o DEB (1,2:3,4-diepoxibutano, 298-18-0, D-7019, Lote 34H3683, Sigma Chemicals Co.), às concentrações finais no meio de 0.005, 0.01, 0.02 e 0.05 µg/ml, expondo-os a este agente clastogénico durante cerca de 48 horas.

III.2.2 - Análise citogenética

Para obtenção de metafases provenientes das culturas de fibroblastos foi efetuado o seguinte procedimento:

- Adicionou-se colcemide, á concentração de 4 µg/ml, durante 4 horas, mantendo os frascos na estufa a 37°C. Após este tempo, retirou-se todo o líquido e colocou-se este num tubo;
- Ao frasco T adicionaram-se cerca de 2 ml de tripsina, deixando novamente na estufa a 37°C durante 2 minutos;
- Quando os fibroblastos se encontraram soltos juntaram-se ao conteúdo do tubo anterior e centrifugaram-se durante 10 minutos a 1500 rpm, retirando o sobrenadante;

- Adicionou-se a cada tubo soluto hipotónico (0.05 M) suplementado com soro de bovino fetal, deixando atuar durante 35 minutos a 37°C;
- Após nova centrifugação, fixaram-se as células mediante 2 lavagens com metanol: ácido acético na proporção 6:1 seguindo-se outras 2 lavagens com o mesmo composto na proporção 3:1;
- Foram feitas preparações, em lâminas bem limpas e mantidas em álcool a 70°, usando o método de espalhamento e secagem ao ar, seguindo-se a coloração com Giemsa a 4%;
- Os cromossomas metafásicos foram observados ao microscópio óptico (Olympus CX31).

III.2.3 - Análise da instabilidade cromossômica

Para cada caso estudado selecionaram-se apenas metafases suficientemente bem definidas e isoladas. O mínimo de 20 metafases foi contado apenas nos casos em que o índice mitótico era muito baixo – especialmente nos fibroblastos – e o índice de quebras cromossômicas muito alto. Apenas foram analisadas metafases completas (com 46 cromossomas). As configurações com trocas cromatídicas do tipo figuras radiais e multiradiais, cromossomas dicêntricos e cromossomas em anel consideraram-se como rearranjos. Os *gaps* foram excluídos do cálculo da frequência de quebras e os rearranjos considerados como duas quebras (fig. 3).

Para a determinação da instabilidade cromossômica foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Percentagem de células com quebras (células aberrantes).
- Percentagem de células com duas ou mais quebras (células multiaberrantes).
- Número de quebras por célula.
- Número de quebras por célula aberrante.

III.2.4 - Preparação dos fibroblastos para a citometria de fluxo

Após os fibroblastos estarem expostos às várias concentrações de DEB, procedeu-se à sua colheita, retirando o meio e colocando-o num tubo. Adicionaram-se então cerca de 2 ml de tripsina ao frasco T, e quando os fibroblastos estavam soltos juntaram-se ao meio do tubo anterior. Após centrifugação durante 10 m a 1500 rpm, retirou-se o sobrenadante e colocou-se

1 ml de meio Ham suplementado. As amostras seguiram então para o Laboratório de Citometria.

III.2.5 - Análise por citometria de fluxo do ciclo celular dos fibroblastos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP, sendo as amostras previamente preparadas no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP. A análise final dos resultados foi feita em colaboração com estas duas instituições.

O procedimento utilizado permite identificar e selecionar as células alvo (neste caso, os fibroblastos) e avaliar o seu conteúdo em ADN. Baseia-se na imunofenotipagem celular, utilizando uma técnica de imunofluorescência com anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*), específicos para antígenos (Ag) expressos na membrana das células, e na quantificação do ADN celular, utilizando o iodeto de propídeo (IP). O IP é um corante fluorescente que se liga aos ácidos nucleicos de cadeia dupla de forma estequiométrica. Para quantificar o ADN é necessário tratar as células com ribonuclease, de forma a destruir o ácido ribonucleico (ARN). Nestas condições, as células emitem fluorescência na proporção direta do seu conteúdo de ADN, o que permite diferenciar as fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular.

A preparação da amostra foi realizada de acordo com um protocolo desenvolvido no Laboratório de Citometria e previamente descrito (Lima *et al.* 2000), que aqui se apresenta resumidamente:

- Imunofenotipagem dos fibroblastos com AcMo anti-CD29 conjugado com FITC:
 - Pipetar para tubo de polipropileno de 5 ml, 100 µl de suspensão celular contendo 0.5 - 1.0 fibroblastos / mm³, em PBS;
 - Adicionar a quantidade adequada de AcMo conjugado com FITC (neste caso, 10 µl AcMo anti-CD29 FITC);
 - Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro;
 - Lavar as células 2x em PBS, por centrifugação;
 - Suspender as células em 100 µl de PBS;

- Adicionar a quantidade adequada de Ac revelador conjugado com FITC (neste caso, 20 μ l de Ac policlonal anti-IgG, de coelho anti-ratinho).
- Marcação do ADN com IP, usando os reagentes DNA-Prep reagent Kit (Beckman Coulter):
 - Adicionar 100 μ l da solução DNA-Prep LPR (contém reagentes para lise dos eritrócitos e permeabilização dos leucócitos);
 - Agitar no vórtex durante 8 segundos;
 - Adicionar 2 ml da solução DNA-Prep Stain (contém IP, na concentração de 50 μ g/ml, e ribonuclease, para destruição do ARN, de forma a obter ligação específica do IP ao ADN);
 - Agitar no vórtex durante 10 segundos;
 - Incubar a 4°C, no escuro, durante 15 minutos;
 - Ler a amostra no citómetro de fluxo.

A aquisição das amostras foi feita no citómetro de fluxo EPICS-MCL-XL (Beckman Coulter), equipado com um laser de árgon (comprimento de onda de 488 nm) arrefecido a ar, utilizando o programa System II, Expo 32 (Beckman Coulter).

A análise do ciclo celular foi feita com o programa Multicycle software for Windows (Phoenix Flow System).

III.3 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada mediante o programa informático SPSS, versão 20, para Microsoft Windows. Utilizou-se o teste one-way ANOVA na comparação das diferenças de médias entre os grupos.

IV - Resultados

IV.1 - Caracterização dos pacientes com Anemia de Fanconi

Entre 1992 e 2011 foram enviadas ao Laboratório de Citogenética do ICBAS amostras de sangue periférico (SP) de 233 pacientes para diagnóstico/exclusão de AF. Foram feitas culturas de linfócitos induzidas com DEB e sem DEB, avaliada a instabilidade cromossômica de acordo com critérios previamente estabelecidos (tabela 1), e com base nestes dados foi definido o diagnóstico citogenético.

Dos 233 pacientes analisados, 39 destes foram considerados pacientes com AF, com um aumento de quebras cromossômicas e figuras radiais, quando as suas células foram expostas ao DEB. Pela análise da tabela 1 verifica-se que o nº quebras/célula dos pacientes com AF é 95 vezes superior aos pacientes não AF, enquanto na % de células aberrantes para os pacientes com AF este valor é 15 vezes superior aos pacientes não AF. No entanto, embora a média da % de células aberrantes seja bastante diferente nos dois grupos, os intervalos sobrepõem-se no grupo AF e não AF, podendo em alguns casos o diagnóstico resultar duvidoso ou erróneo (fig. 6 B). Por outro lado, não se verifica sobreposição no grupo AF e não AF no número de quebras por célula (fig. 6 A). Dentro do grupo AF existe uma maior heterogeneidade de valores quando comparado com o grupo não AF. Parte desta variabilidade deve-se à existência de um subgrupo de pacientes com AF que apresenta um número menor de células aberrantes, - $\leq 50\%$ de células aberrantes - enquanto a maioria dos pacientes com AF têm mais de 50% de células aberrantes. A presença de células multiaberrantes é característica dos pacientes com AF após tratamento com DEB, mas não é exclusiva, pois embora 49.5% dos pacientes não AF estudados não apresente nenhuma célula multiaberrante, 21 % tem $\geq 2\%$ de células multiaberrantes, e 3.6% tem $\geq 5\%$ de células multiaberrantes, pelo que a presença de uma célula multiaberrante não é necessariamente indicativo de AF. O critério que de facto caracteriza os pacientes com AF é o tipo de células aberrantes, ou seja, a existência de figuras tri- e tetra-radiais. Os valores obtidos para os controlos nos quatro índices que se observam na tabela 1 são em tudo muito parecidos com os dos pacientes não AF, e muito diferentes dos valores dos pacientes com AF, o que valida este estudo.

Resultados

Tabela 1. Instabilidade cromossômica induzida com DEB (0.05 µg/ml) numa população de 233 pacientes e 108 controles.

Grupo	% Células aberrantes			% Células multiaberrantes			Número de quebras/célula			Número de quebras/célula aberrante		
	N	Média	Intervalo (mín – máx)	N	Média	Intervalo (mín – máx)	N	Média	Intervalo (mín – máx)	N	Média	Intervalo (mín – máx)
Controlos	108	5.86	1.00 - 20.00	93	0.88	0.00 – 8.00	108	0.07	0.01 - 0.28	108	1.21	1.00 – 2.80
Pacientes não AF	194	5.38	0.00 – 21.10	194	1.02	0.00 – 7.40	194	0.07	0.00 - 0.28	194	1.21	0.00 – 4.00
Pacientes AF	39	78.18	20.00 – 100.00 ¹⁾	39	70.63	14.30 – 100.00 ¹⁾	39	6.63	0.86 – 17.00 ¹⁾	39	8.34	1.96 – 17.00 ¹⁾
AF “não mosaico”	34	83.86	55.00 – 100.00	34	76.99	26.00 – 100.00	34	7.26	1.02 – 17.00	34	8.46	2.27 – 17.00
AF “mosaico”	5	39.52	20.00 – 49.00 ²⁾	5	27.40	14.30 – 36.00 ²⁾	5	2.32	0.86 – 5.67 ²⁾	5	7.52	1.96 – 17.00 ²⁾

Abreviaturas: AF, Anemia de Fanconi; DEB, diepoxibutano; IFAR, Registro Internacional da Anemia de Fanconi; Mín, mínimo; Máx, máximo.

Classificação do IFAR para diagnóstico de AF (Auerbach, 2003, in: *Current Protocols in Human Genetics*, 8.7.1-8.7.15): AF: n°quebras/célula (média) em culturas tratadas com DEB = 1.10-23.9; Não AF: n° de quebras/célula (média) em culturas tratadas com DEB = 0.00-0.36.

1) $p < 0.001$ versus controlos e não AF;

2) $p < 0.001$ versus AF não mosaico.

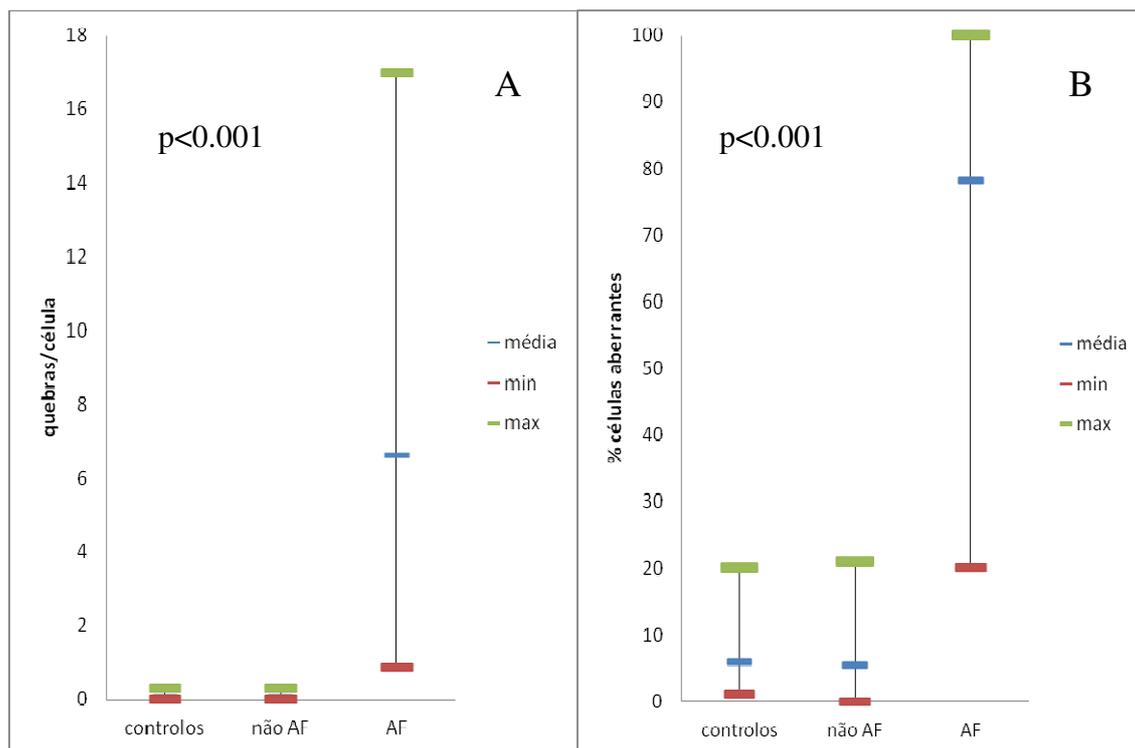


Figura 6. Instabilidade cromossômica induzida por DEB (0.05 µg/ml), expressa em nº quebras por célula (média) (A) e em % células aberrantes (média) (B), no grupo controlo (108 casos) e em 233 pacientes com suspeita clínica de Anemia de Fanconi (AF), distribuídos pelos grupos não AF e AF.

IV.2 - Avaliação da frequência de mosaicismos entre os pacientes com Anemia de Fanconi

A distinção entre pacientes com AF “mosaico” e “não mosaico” depende essencialmente da percentagem de células aberrantes. Neste estudo, tendo como base a classificação usada na literatura, consideraram-se AF “mosaico” os pacientes que têm $\leq 50\%$ de células aberrantes, e mais 50% de células aberrantes serão AF “não mosaico”. Foi então feita uma determinação da frequência de mosaicismos entre os 39 pacientes com AF previamente diagnosticados. Verificou-se que 5 destes pacientes (13%) apresentavam uma percentagem de células aberrantes inferior a 50% , sendo então considerados “mosaicos”.

Relativamente ao nº de quebras por célula, a maioria destes pacientes (34) apresentava uma média de quase 7 quebras/célula e uma minoria (5) apresentava uma média de cerca de 2 quebras/célula, existindo sobreposição entre “mosaicos” e “não mosaicos” (fig. 7 A). Assim, embora o parâmetro que mais rigorosamente discrimina os pacientes

com AF seja o nº de quebras cromossómicas por célula, este não pode ser usado para discriminar os “mosaicos”. Pelo contrário, o gráfico da fig. 7 B evidencia que não existe sobreposição entre o grupos AF “mosaico” e “não mosaico”, podendo a % de células aberrantes ser usada para discriminar os “mosaicos”

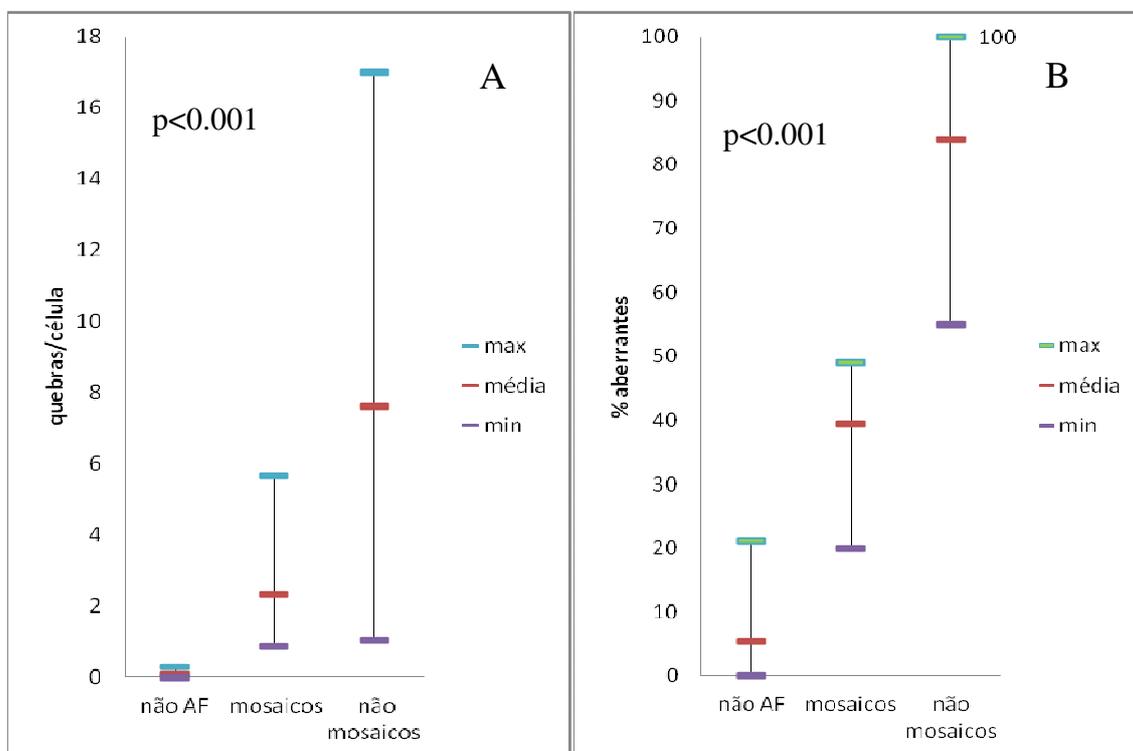


Figura 7. Instabilidade cromossómica induzida por DEB (0.05 µg/ml), expressa em nº de quebras por célula (média) (A) e em % células aberrantes (média) (B), em 233 pacientes com suspeita clínica de Anemia de Fanconi (AF), distribuídos pelos grupos não AF, AF “mosaico” e AF “não mosaico”.

O gráfico da fig.8 mostra a distribuição dos grupos não AF, AF “mosaico” e AF “não mosaico”, em função da correlação entre a % de células aberrantes e o nº de quebras por célula, onde se pode observar que existe diferenciação entre estes grupos. A linha exponencial que marca a tendência dos AF evidencia que á medida que aumenta a % de células aberrantes aumenta também o nº de quebras. Este aumento não é linear, pois, até 50 % de células aberrantes o nº de quebras regista um aumento pouco assinalável (cerca de 2 quebras), mas a partir dos 50% até aos 70% este aumento é mais abrupto, passando para as 4 quebras, e de 70% até 100% há um aumento para 10 quebras. Este gráfico evidencia também que o grupo AF “não mosaico” tem uma % de células aberrantes elevada correspondendo também um elevado nº de quebras.

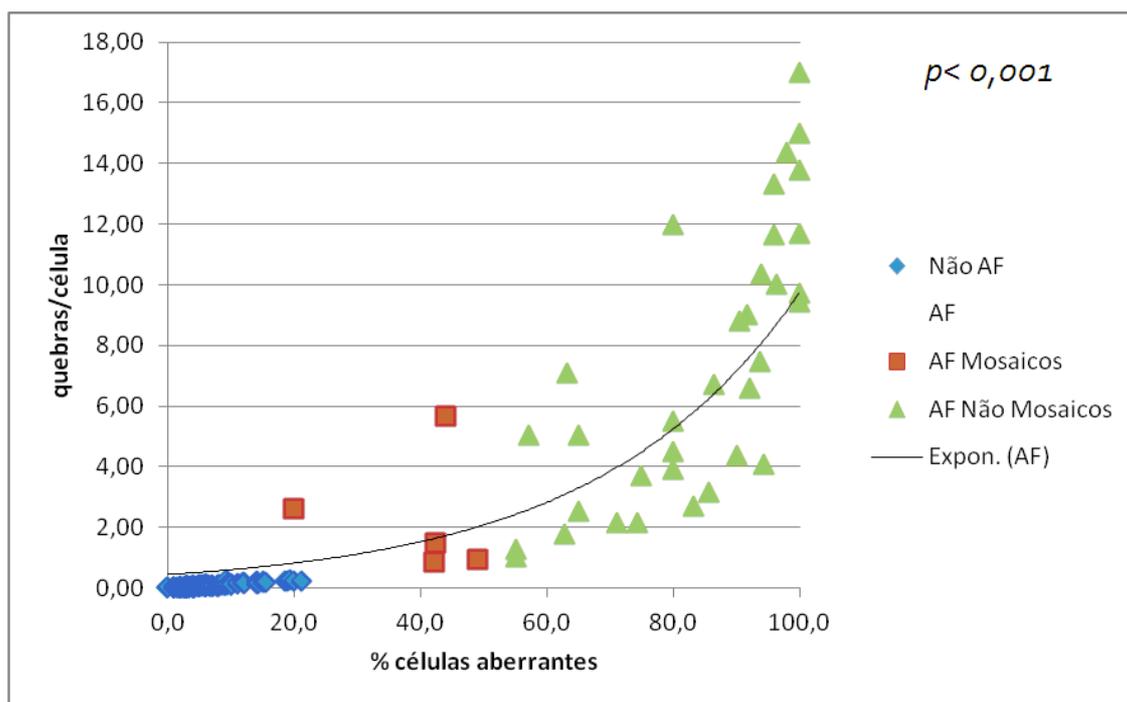


Figura 8. Distribuição dos grupos não AF e AF “mosaico” e “não mosaico”, em função da % de células aberrantes e do índice nº quebras por célula. A linha exponencial marca a tendência dos AF.

Para fazer a comparação entre os grupos, foram avaliadas as diferenças entre as médias. Como se observa na tabela 1, existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos AF, controlos e não AF ($p < 0.001$), e entre AF “mosaico” e AF “não mosaico” ($p < 0.001$) nos diferentes índices avaliados.

A confirmação de um diagnóstico AF com mosaicismo deverá ser feita com o apoio de uma análise de instabilidade cromossômica nouro tipo de células que não estejam sujeitas ao efeito do mosaicismo e que evidenciem as células típicas de AF. Atualmente a melhor aproximação é feita com a avaliação da instabilidade cromossômica em culturas de fibroblastos. A implementação desta técnica no Laboratório de Citogenética do ICBAS foi obtida com o presente trabalho, conforme se descreve a seguir.

IV.3 - Implementação da técnica da cultura de fibroblastos

Com este trabalho foi implementada a técnica de confirmação de um diagnóstico AF com mosaicismo, quer para casos que apresentem uma frequência de células aberrantes $\leq 50\%$, quer para casos com suspeição clínica de AF, mas em que os estudos de instabilidade cromossômica no sangue periférico são negativos. A técnica será então

efetuada a partir de culturas de fibroblastos primários, células estas que por princípio vão confirmar o diagnóstico de AF, por não serem afetadas pelo mosaicismo.

No decorrer da implementação da técnica verificou-se que duas das amostras da biópsia de pele ficaram contaminadas por bactérias. Para contornar este problema, foram aumentadas para o dobro as doses iniciais dos antibióticos kanamicina e penicilina/estreptomicina na altura da mudança do meio. Em média a cultura dos fibroblastos leva cerca de três semanas até se poder proceder á sua colheita e executar o procedimento para citometria de fluxo ou o procedimento para citogenética. Das amostras de fibroblastos testadas, a amostra de pele da região abdominal de uma menina de 10 anos (F02) destacou-se, pois foi a que teve um crescimento mais rápido (cerca 17 dias até preencher o frasco T) e um índice mitótico mais elevado (foi a única onde foi possível contabilizar 100 metafases). Ao contrário do esperado, a amostra de pele do prepúcio de um menino de 4 anos (F03), não cresceu bem e teve um índice mitótico muito baixo.

IV.4 - Instabilidade cromossómica em culturas de fibroblastos

Um dos objetivos deste estudo era determinar a concentração de referência do DEB em culturas de fibroblastos, para determinação do padrão da técnica, testando as amostras sem DEB e com várias concentrações de DEB, em controlos, pacientes não AF e AF. No entanto, devido à impossibilidade de se obterem amostras de pele de pacientes com AF durante o período de tempo deste estudo (a AF é uma doença muito rara), não foi possível testar a melhor concentração do DEB a aplicar em células de pacientes com AF. É de salientar que, ao contrário do que acontece com as amostras de sangue periférico, encontrar metafases nas amostras de fibroblastos nem sempre é tarefa fácil – devido ao baixo índice mitótico – quando comparada com as células sanguíneas. Por este motivo, houve amostras em que se obtiveram poucas metafases, e como não eram representativas (mínimo de 20 metafases) não foram apresentadas neste estudo, como é o caso das amostras F03 e F05.

Foram então, realizados nos fibroblastos de 4 controlos e 2 pacientes, ensaios de instabilidade cromossómica espontânea (sem DEB) e ensaios de instabilidade induzida com DEB nas concentrações de 0.005, 0.01, 0.02 e 0.05 µg/ml.

Como se observa na fig. 9, os cromossomas dos pacientes não AF normalmente não apresentam quebras nem figuras cromatídicas.

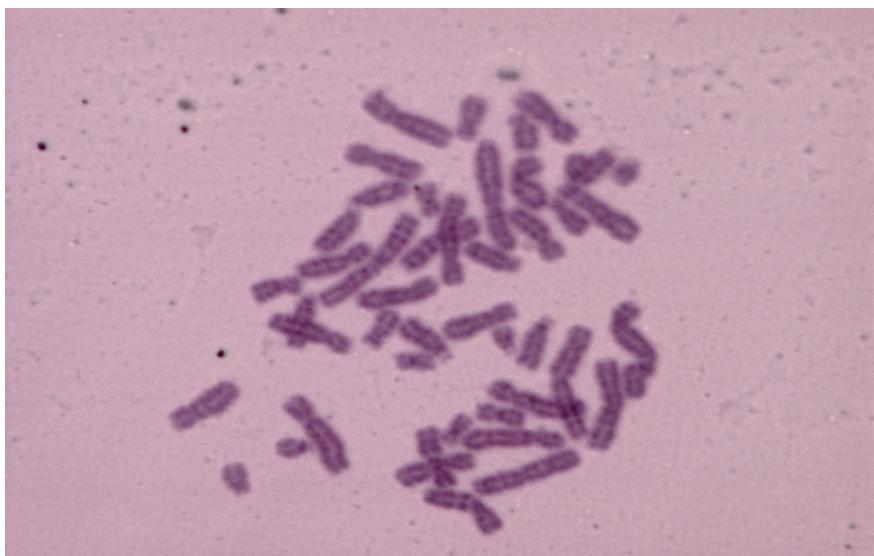


Figura 9. Cromossomas dos fibroblastos de um indivíduo não AF. Não se observam quebras nem figuras cromatídicas.

Através da observação dos resultados apresentados na tabela 2, verifica-se que o Paciente 2 tem nº quebras por célula ligeiramente superior (0.08) ao valor limite para não AF (0.07) com DEB 0.01 $\mu\text{g/ml}$, mas mesmo assim trata-se de um paciente não AF pois não existem figuras nem outro tipo de suspeita, e os valores estão longe dos considerados para ser AF. Na concentração de DEB 0.05 $\mu\text{g/ml}$ usada apenas no Paciente 1 e Controlo 1, observam-se os valores mais altos de nº de quebras por célula (0.27 e 0.33, respetivamente), o que não é de surpreender, pois esta concentração é muito elevada para os fibroblastos, não sendo usada como referência. Em relação às amostras F01, F02 e F04, com DEB na concentração de 0.01 $\mu\text{g/ml}$, os valores do nº de quebras por célula estão dentro dos considerados para controlos e não AF. Os valores obtidos com DEB na concentração de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ e espontâneas estão dentro dos valores estabelecidos por *Auerbach* (2003) para não AF, sendo que em relação às concentrações de DEB de 0.005, 0.05, 0.02 $\mu\text{g/ml}$ não foram encontradas comparações na literatura.

Resultados

Tabela 2. Resultados obtidos a partir dos ensaios de instabilidade cromossômica espontânea e induzida com diferentes concentrações de DEB em fibroblastos.

	Nº de metafases	% Células aberrantes	% Células multiaberrantes	Nº de quebras/ célula	Nº de quebras / célula aberrante
Paciente 2					
Espontâneas	100	2	0	0.02	1
DEB 0.005	62	5	1.6	0.04	1.33
DEB 0.01	25	8	4	0.08	1
DEB 0.02	20	10	0	0.1	1
Paciente 1					
DEB 0.05	22	18	4.5	0.27	1.5
Controlo 1					
DEB 0.05	33	21	12.1	0.33	1.57
F01					
DEB 0.01	28	0	0	0	0
F04					
DEB 0.01	23	0	0	0	0
F02					
Espontâneas	100	2	0	0.02	1
DEB 0.005	100	1	1	0.02	2
DEB 0.01	100	1	0	0.01	1

Classificação do IFAR para diagnóstico de AF (A. Auerbach (2003), in: Current Protocols in Human Genetics, 8.7.1-8.7.15): AF: nº de quebras/célula (média) em culturas de fibroblastos tratadas com DEB 0.01 µg/ml = 0.68-1,10; espontâneas = 0.20-0.36; Não AF: nº de quebras/célula (média) em culturas de fibroblastos tratadas com DEB 0.01 µg/ml = 0.00-0.07; espontâneas = 0.00-0.08

Abreviaturas: DEB, diepoxibutano; AF, Anemia de Fanconi

Embora seja ainda necessário testar mais amostras, principalmente obter amostras de pele de pacientes com AF, o valor de referência sugerido neste trabalho será $0.01 \mu\text{g/ml}$, uma vez que os valores obtidos com esta concentração, se encontram dentro dos valores estabelecidos por *Auerbach* (2003) para os controlos e pacientes não AF.

IV.5 - Estudo do ciclo celular dos fibroblastos por citometria de fluxo

Para estudar a influência do DEB no ciclo celular foi feito um estudo comparativo entre a % de células acumuladas na fase G2/M em culturas de fibroblastos primários, não tratadas e tratadas com DEB, nas concentrações de 0.005 e $0.01 \mu\text{g/ml}$, obtidas a partir das amostras F01, F02, F03 e F05.

A amostra F04 não foi analisada devido ao fraco crescimento dos fibroblastos (como as células não eram suficientes para estudo simultâneo de citogenética e CF, optou-se por fazer exclusivamente a análise citogenética).

Para as restantes amostras, Paciente 1, Paciente 2 e Controlo 1, não foi feito o estudo em CF, uma vez que estas foram obtidas antes da implementação desta técnica.

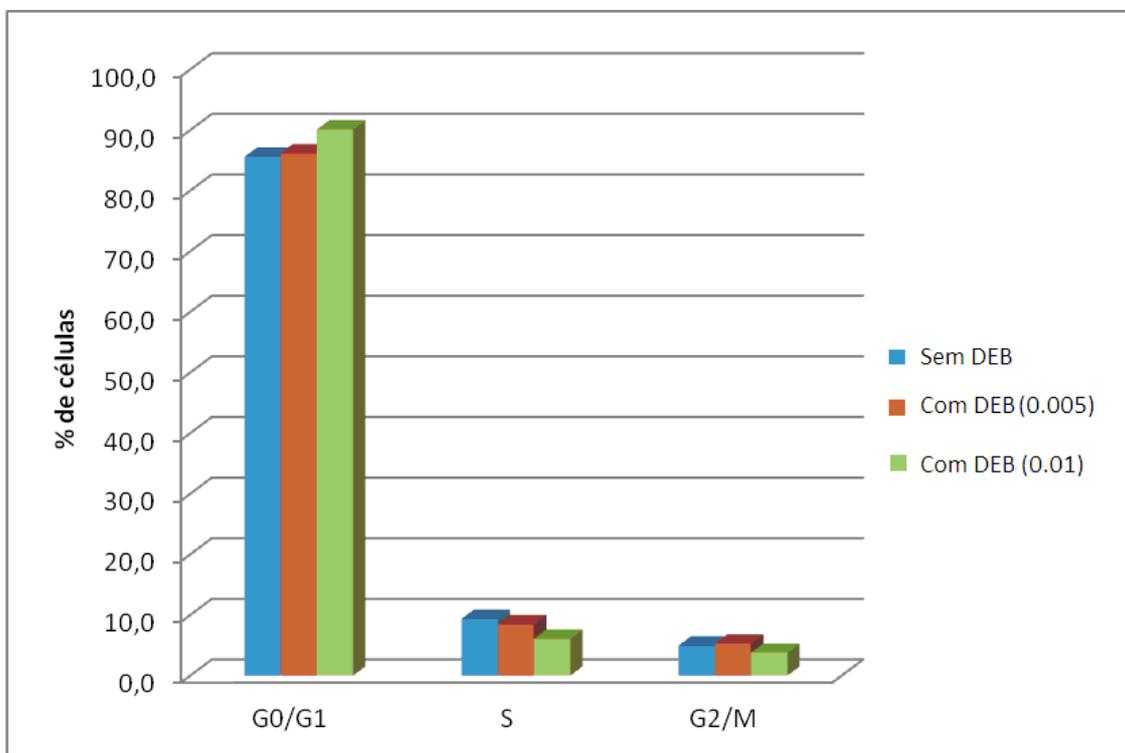


Figura 10. Representação gráfica da % de células nas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) da amostra F02, sem DEB e com DEB nas concentrações de $0.005 \mu\text{g/ml}$ e $0.01 \mu\text{g/ml}$.

Observa-se através do gráfico da figura 10 que existem poucas células acumuladas nas fases G2/M do ciclo celular. As figuras 11 e 12, mostram os histogramas de distribuição das células pelas fases G0/G1, S e G2/M dessa mesma amostra F02, na presença de DEB (0.01 µg/ml) e sem DEB, respetivamente. Aí pode confirmar-se que as culturas de fibroblastos dos indivíduos não AF têm uma baixa acumulação de células em G2/M.

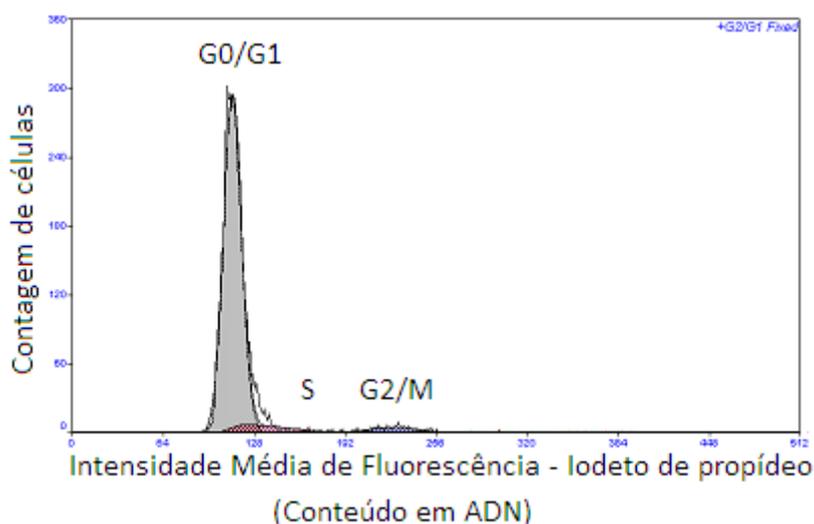


Figura 11. Histograma representativo da distribuição da quantidade de ADN celular nos fibroblastos da amostra F02 expostos ao DEB na concentração de 0.01 µg/ml, ilustrando as diferentes fases do ciclo celular.

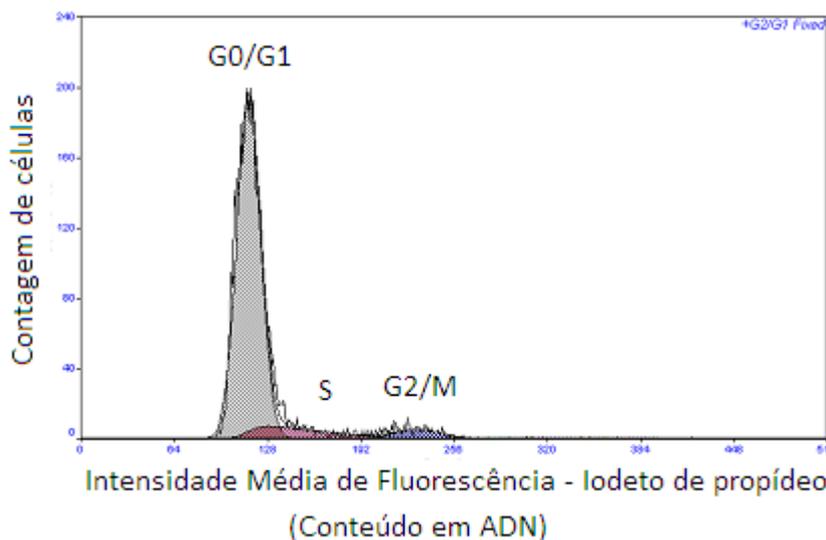


Figura 12. Histograma representativo da distribuição da quantidade de ADN celular nos fibroblastos da amostra F02 não expostos ao DEB, ilustrando as diferentes fases do ciclo celular.

Verifica-se pois, que os valores obtidos por CF, para os indivíduos não AF, são concordantes com os descritos na literatura para as mesmas concentrações de DEB.

V - Discussão

A primeira descrição de AF como uma síndrome de instabilidade genómica foi realizada a partir da observação de células sanguíneas em condições basais (Schroeder, 1966). Mais tarde, foi descrita a hipersensibilidade das células de pacientes com AF a agentes indutores de ligações cruzadas entre cadeias (ICLs, do inglês *interstrand cross-links*) no ADN (Auerbach, 1989). Desde então, a AF passou definitivamente a ser considerada como uma síndrome de instabilidade cromossómica. O ensaio de instabilidade cromossómica em culturas de sangue periférico (SP) induzidas por agentes clastogénicos como o diepoxibutano (DEB) é o teste de diagnóstico mais utilizado até aos dias de hoje, particularmente o uso do DEB como agente indutor de ICLs, que demonstrou uma alta especificidade e estabilidade, não tendo sido encontrado até hoje outro grupo de pacientes que apresente uma sensibilidade tão elevada ao DEB como os pacientes com AF (Castella M *et al.* 2011). No entanto, este ensaio é muito laborioso e requer pessoal especializado.

A maior limitação ao diagnóstico de AF por meio da técnica de IC induzida pelos agentes clastogénicos surge nos casos de mosaïcismo somático. Este é definido como a presença de populações geneticamente distintas de células somáticas em um dado organismo, sendo relativamente comum em pacientes com AF, e necessita de ser considerado quando se fazem testes genéticos para esta síndrome. O mosaïcismo somático nos pacientes com AF pode ser causado por novas mutações no ADN ou por reversão espontânea das mutações herdadas (Lo Ten Foe JR *et al.* 1997; Gregory JJ *et al.* 2001). Esta condição pode dar às células uma vantagem seletiva, devido à perda de sensibilidade do ADN para as ligações cruzadas. Uma população de células que perdeu a sensibilidade para as ligações cruzadas, pode aparecer cedo na embriogénese ou após o nascimento, em diferentes tecidos como sejam a medula óssea, ao nível das células estaminais ou das células progenitoras linfoides (Auerbach, 2009). Esta “terapia genética endógena” espontânea tem sido associada a contagens sanguíneas mais elevadas, melhor evolução clínica (Gross *et al.* 2002; Soulier *et al.* 2005) e ocasionalmente com cancro (Ikeda H *et al.* 2003). Enquanto a discriminação entre pacientes não AF e pacientes com AF não oferece nenhuma dúvida, pois os valores obtidos nestes grupos nos índices utilizados para expressar a sensibilidade (% de células aberrantes e nº de quebras/ célula) são distintos entre si, o mesmo não acontece quando

se analisa o mosaicismismo, que pode representar 15-25% de todos os pacientes com AF (Lo Ten Foe *et al.* 1997; Soulier *et al.* 2005), com um nº quebras por célula próximo do valor observado nos pacientes não AF, podendo o diagnóstico ficar comprometido. A distinção entre pacientes com AF “mosaico” e “não mosaico” é mais complicada, devido ao fato da reversão ser um processo dinâmico em que se verifica colonização por parte das células revertidas, o que pode ser variável, dependendo do momento em que se efetua o ensaio. *Auerbach*, considerada a nível mundial uma referência na AF, utiliza o valor de 50% de células aberrantes como sendo o valor limite para classificar os pacientes com AF nos tipos “mosaico” e “não mosaico” (Auerbach, 2009). Utilizando o critério de 50% de células aberrantes, a incidência de mosaicismismo no presente estudo, para uma população de 39 pacientes com AF diagnosticados no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP, foi de 13%, o que está um pouco abaixo da frequência de mosaicismismo de outras populações a nível mundial (15-25%). Nos pacientes considerados “mosaicos”, é necessário acompanhar a evolução: obter dados sobre a evolução hematológica e repetir o ensaio de fragilidade cromossômica ao longo do tempo, são alguns dos recursos disponíveis para monitorizar e verificar se o mosaicismismo progrediu.

Como já foi referido, a confirmação de um diagnóstico AF com mosaicismismo deverá ser feita com o apoio da análise de instabilidade cromossômica noutra tipo de células que não estejam sujeitas ao efeito do mosaicismismo e que evidenciem alterações típicas de AF. Atualmente a melhor aproximação é feita com a avaliação da instabilidade cromossômica em culturas de fibroblastos.

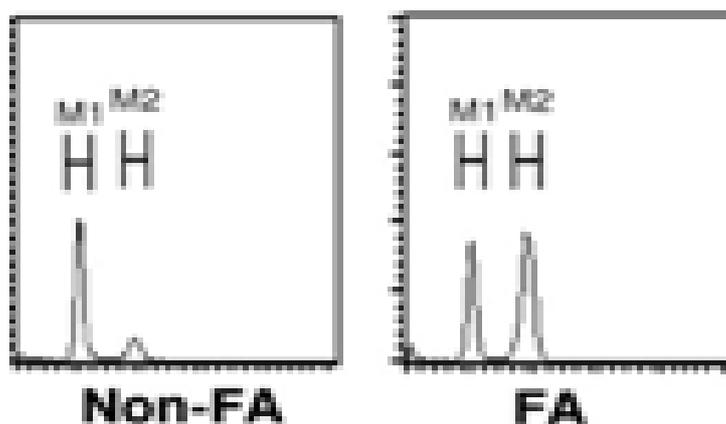
Com o presente trabalho foi elaborado e testado pela primeira vez no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP, um protocolo de cultura de fibroblastos primários de pele humana. Existem dificuldades acrescidas quando se trata de culturas de fibroblastos, pois são células com um índice mitótico baixo quando comparadas às células sanguíneas, o seu crescimento é lento, e para além disso, trata-se de células bastante exigentes em relação aos requisitos necessários para o seu crescimento e viabilidade, podendo a sua cultura ficar comprometida se estes não forem respeitados. A prova da dificuldade na obtenção destas amostras está na publicação de *Auerbach* para definição do protocolo (Auerbach, 2003). Neste trabalho, o número de amostras de fibroblastos de pacientes com AF foram 3 e de pacientes não AF foram 2, enquanto nesse mesmo estudo o número de amostras de SP foram 98 para pacientes com AF e 124 para

pacientes não AF. Na elaboração deste protocolo, foram atingidos os objetivos propostos, conseguindo-se que todas as culturas de fibroblastos crescessem e sobrevivessem até à sua colheita, contornando problemas como por exemplo a contaminação bacteriana, para assim ser possível executar o procedimento da análise citogenética e citometria de fluxo e fazer uma comparação com os resultados da literatura. As culturas de fibroblastos são úteis em pacientes que têm mosaïcismo somático hematopoiético, em pacientes depois de um transplante medular, ou para diagnóstico pré-natal (utilizando células das vilosidades coriônicas ou do líquido amniótico). Estas células podem utilizar-se na análise de IC, por estudos citogenéticos, ou do ciclo celular, por citometria de fluxo (*Fanconi Anemia Research Foundation*, 2008).

Relativamente à análise citogenética da IC nas culturas de fibroblastos, com e sem DEB, apenas em seis das oito amostras foi possível observar metafases em número suficiente – apenas foram consideradas as amostras onde foi possível observar um mínimo de vinte metafases. Em todas as amostras analisadas, com DEB na concentração de 0.01 µg/ml e sem DEB, verificou-se que os valores obtidos no nº de quebras por célula estão dentro dos valores considerados por *Auerbach* (2003) para indivíduos não AF. Para completar este estudo falta fazer o teste do DEB em fibroblastos de pacientes com AF, para assim testar a técnica nestes pacientes. Mas para já, pode-se afirmar que a concentração de DEB a usar no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP, será de 0.01 µg/ml, uma vez que, para os controlos e pacientes não AF, os valores obtidos com esta concentração encontram-se dentro dos valores estabelecidos por *Auerbach* e sua equipa.

Neste trabalho foi também elaborado e testado pela primeira vez um protocolo de estudo do ciclo celular em fibroblastos por CF. Esta é uma técnica alternativa na AF, - embora ainda não muito usada em laboratórios de diagnóstico – sendo menos exigente e tendo a vantagem de medir rapidamente grandes quantidades de células a baixo custo, podendo ser usada para discriminar entre pacientes com e sem AF. *Shindler et al.* (2007) preferem a CF na análise do ciclo celular, para a discriminação inicial dos pacientes, nos quais existe trombocitopenia inexplicada, anemia aplásica macrocítica ou outros achados clínicos que requeiram exclusão de AF. Quando expostas a agentes indutores de ICLs como o DEB, as células AF ficam bloqueadas em G2, sendo uma resposta normal do *checkpoint* ao ADN danificado e não reparado, durante a fase S (*Seyschab H et al.* 1995; *Heinrich MC et al.* 1998; *Akkari YM et al.* 2001).

Consequentemente, as células AF experimentam uma progressão lenta no ciclo celular, inibição de crescimento, aumento da expressão de *p53* e morte celular (Kupfer GM *et al.* 1996; Kruyt FA *et al.* 1996; Rani R *et al.* 2008). Como consta na literatura, as células dos pacientes com AF sob o efeito do DEB acumulam-se em G2/M, devido aos danos provocados no ADN e à existência nesta fase de um *checkpoint*, que evita que as células danificadas avancem no ciclo celular até serem reparadas ou entrarem em apoptose. A CF pode dar um resultado falso negativo nos pacientes com AF, com SMD ou LMA (Fanconi Anemia Research Foundation, 2008). Neste estudo, para as concentrações de DEB usadas e sem DEB, e ao contrário do que acontece nos pacientes com AF (fig. 13), não foi verificado um aumento da % de células nas fases G2/M do ciclo celular, nem a diminuição correspondente da % de células nas fases G0/G1, pois os casos estudados correspondiam a indivíduos não AF; assim, como o seu ADN não estava danificado, não foi ativado o *checkpoint* e as células não se acumularam em G2/M.



(Fonte: Raphael Ceccaldi, J Clin Invest., 2011)

Figura 13. Histogramas representativos do ciclo celular de fibroblastos cultivados na presença de MMC, de um controlo (Non-FA) e de um paciente Fanconi (FA). No paciente com AF observa-se uma acumulação de células na zona correspondente às fases G2/M do ciclo celular.

Os resultados obtidos no estudo por CF do ciclo celular dos fibroblastos estão de acordo com os resultados obtidos na literatura para os controlos e indivíduos não AF, o que valida este estudo para no futuro se poder aplicar este procedimento às amostras de fibroblastos dos pacientes com AF.

VI - Conclusões

1. Foi feita a caracterização da instabilidade cromossômica em culturas de sangue periférico induzidas com DEB de 233 pacientes previamente estudados no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP para diagnóstico/exclusão de AF. Destes, 39 foram diagnosticados como pacientes com AF, com um número de quebras/célula 95 vezes superior aos pacientes não AF e com uma % de células aberrantes 15 vezes superior aos pacientes não AF.
2. Foi determinada a percentagem de pacientes com mosaicismo na população de pacientes com AF diagnosticada no Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP, sendo esta de 13%. Este valor por si só já justifica a importância da implementação da técnica de análise da instabilidade cromossômica em fibroblastos, como apoio para uma maior precisão do diagnóstico.
3. Foi implementado com eficácia o protocolo de cultura de fibroblastos. Os resultados obtidos no estudo da instabilidade cromossômica induzida com DEB e sem DEB nas culturas de fibroblastos estão de acordo com os descritos na literatura para controlos e pacientes não AF. Contudo, o sucesso do protocolo requer ainda confirmação em amostras de fibroblastos de pacientes com AF.
4. Foi implementado com sucesso o protocolo de estudo por citometria de fluxo, do ciclo celular dos fibroblastos. Os resultados obtidos relativamente à acumulação de células na fase G2/M, estão em concordância com os resultados obtidos na literatura para os controlos e pacientes não AF. Contudo, o sucesso do protocolo requer ainda confirmação em amostras de fibroblastos de pacientes com AF.

VII - Bibliografia

- Akkari YM, Bateman RL, Reifsteck CA, D'Andrea AD, Olson SB, Grompe M. The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. *Mol Genet Metab* 2001; **74**(4):403–412.
- Alter BP, Young NS. The bone marrow failure syndromes. *Hematology of infancy and childhood*. Nathan DG, Oski FA, ed. Philadelphia. WB Saunders, 1993.
- Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. *Am J Hematol* 1996; **53**: 99-110.
- Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry. Relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* 1989;**73**: 391– 396.
- Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol* 1993 ; **21**:731–3.
- Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DR, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR, editors. *Current Protocols Human Genetics Supplement*. John Wiley & Sons, Inc; Hoboken. 2003; **37**: 8.7.1–8.7.15.
- Auerbach AD, Flit Y, Batish SD, Morales J, Berwick M. A 25 year perspective of the DEB test for Fanconi anemia: correlation of mosaicism with clinical outcome. *Am J Hum Genet* 2004; (Suppl): **90**.
- Auerbach, AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 2009; **668** (1-2): 4-10.
- Blanche P Alter, MD, MPH, FAAP, Gary Kupfer, MD. Fanconi Anemia. *GeneReviews* 2011.
- Briot D, Mace-Aime G, Subra F, Rosselli F. Aberrant activation of stress-response pathways leads to TNF-alpha oversecretion in Fanconi anemia. *Blood* 2008; **111**(4):1913-1923.
- Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, Dasi A, Estella JM, Munoz A, Ortega JJ, de Winter J, Joenje H, Schindler D, Hanenberg H,

- Hodgson SV, Mathew CG, Surralles J. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* 2005; **105**: 1946–9.
- Casado J, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, Lobitz S, Ferro T, Munoz A, Sevilla J, Cantalejo A, Cela E, Cervera J, Sanchez-Calero J, Badell I, Estella J, Dasi A, Olive T, Jose Ortega J, Rodriguez -Villa A, Tapia M, Molines A, Madero L, Segovia JC, Neveling K, Kalb R, Schindler D, Hanenberg H, Surralles J, Bueren JA. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet* 2007; **44**(4): 241-9.
- Castella M, Pujol R, Callén E, Ramírez M J, Casado JA, Talavera M, Ferro T, Muñoz A, Sevilla J, Madero L, Cela E, Beléndez C, Heredia CD, Olivé T, Toledo JS, Badell I, Estella J, Dasí A, Villa AR, Gómez P, Tapia M, Molinés A, Figuera A, Bueren JA, Surrallés J. Chromosome fragility in Fanconi anemia patients: diagnostic implications and clinical impact. *Journal of Medical Genetics* 2011; **48**(4): 242.
- Ceccaldi R, Briot D, Larghero J, Vasquez N, Enghien CD, Chamousset D, Noguera ME, Waisfisz Q, Hermine O, Pondarre C, Leblanc T, Gluckman E, Joenje H, Lyonnet D S, Socié G, Soulier J. Spontaneous abrogation of the G2 DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. *The Journal of Clinical Investigation* 2011; **121**(1):184-194.
- Cervenka J, Arthur D, Yasis C. Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic aplastic anemia and Fanconi anemia. *Pediatrics* 1981; **67**(1):119–27.
- D'Andrea A, Dahl N, Guinan E, Shimaruma A. Marrow failure. *Hematology* 2002; **12**: 58-72.
- Dokal I. The genetics of Fanconi's anaemia. *Bailliers Best Pract Res Clin Haematol* 2000; **13**(3):407-25.
- Dokal I. Fanconi's anaemia and related bone marrow failure syndromes. *Br Med Bull* 2006; **77-78**:37-53.

-
- Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Third Edition. Eugene, OR: Fanconi Anemia Research Fund, Inc. 2008.
- Fanconi G. Familiäre infantile perniziosartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische* 1927; **117**:257-280.
- Gregory JJ, Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide C, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lympho-hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2001; **98**:2532–2537.
- Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 2002; **98**:126–35.
- Heinrich MC, et al. DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood* 1998; **91**(1):275–287.
- Hirschhorn, R., D. R. Yang, J. M. Puck, M. L. Huie, C. K. Jiang, L.E. Kurlandsky. Spontaneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency. *Nat Genet* 1996; **13**(3): 290-5.
- Ikeda H, et al. Genetic reversion in an acute myelogenous leukemia cell line from a Fanconi anemia patient with biallelic mutations in BRCA2. *Cancer Res* 2003; **63**(10): 2688–2694.
- Joenje H, K. J. Patel. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nat Rev Genet* 2001; **2**(6):446-57.
- Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev* 2010; **24**(16):1680-1694.
- Kratz K, Schopf B, Kaden S, et al. Deficiency of FANCD2- associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell*. 2010; **142**(1):77-88.
- Kutler DI, Auerbach AD. Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. *Fam Cancer* 2004; **3**:241–8.

- Kruyt FA, Dijkmans LM, van den Berg TK, Joenje H. Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 1996; **87**(3):938–948.
- Kupfer GM, D’Andrea AD. The effect of the Fanconi anemia polypeptide, FAC, upon p53 induction and G2 checkpoint regulation. *Blood* 1996; **88**(3):1019–1025.
- Lima M, Teixeira Mdos A, Fonseca S, Gonçalves C, Guerra M, Queirós ML, Santos AH, Coutinho A, Pinho L, Marques L, Cunha M, Ribeiro P, Xavier L, Vieira H, Pinto P, Justiça B. Immunophenotypic aberrations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol Dis*. 2000; **26**(6):634-45.
- Liu T, Ghosal G, Yuan J, Chen J, Huang J. FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science* 2010; **329**(5992):693-696.
- Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, Pauli RM, Shahidi NT, Dokal I, Roberts I, Altay C, Gluckman E, Gibson RA, Mathew CG, Arwert F, Joenje H. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 1997; **5**:137–48.
- MacKay C, Declais AC, Lundin C, et al. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell* 2010; **142**(1):65-76.
- MacMillan ML, Wagner JE. Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia - when and how? *Br J Haematol* 2010; **149**(1):14–21.
- Moldovan GL, D’Andrea AD. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 2009; **43**:223-249.
- Morgan NV, Essop F, Demuth I, de Ravel T, Jansen S, Tischkowitz M, Lewis CM, Wainwright L, Poole J, Joenje H, Digweed M, Krause A, Mathew CG. A common Fanconi anemia mutation in black populations of sub-Saharan Africa. *Blood* 2005;**105**: 3542–4.

-
- Naim V, Rosselli F. The FANC pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat Cell Biol* 2009; **11**(6):761-768.
- Porto B, Sousa R, Ponte F, Torgal A, Campilho F, Campos A, Gonçalves C, Barbot J. Anemia de Fanconi – diagnóstico citogenético de 40 casos. *Acta Med Port.* 2011; **24**(3):405-412.
- Pulsipher M, Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Lee J-S, Jakobs P, Grompe M, Joenje H, Sieff C, Guinan E, Mulligan R, D'Andrea AD. Subtyping analysis of Fanconi anemia by immunoblotting and retroviral gene transfer. *Mol Med* 1998; **4**:468.
- Rosenberg PS, Socié G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood* 2005; **105**(1):67–73.
- Rani R, Li J, Pang Q. Differential p53 engagement in response to oxidative and oncogenic stresses in Fanconi anemia mice. *Cancer Res* 2008; **68**(23): 9693–9702.
- Schindler D, Friedl R, Gavvovidisa I, Kalb R, Neveling K, Linka Y, Hanenberg H, Kubbies M, Hoehn H. Applications of Cell Cycle Testing in Fanconi Anemia. Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging. *Monogr Hum Genet Basel*, Karger. 2007; **15**: 110–130.
- Schroeder T.M.. Cytogenetic and cytologic findings in enzymopenic panmyelopathy and pancytopenias. Familial myelopathy of Fanconi, glutathione- reductase deficiency anemia and megaloblastic B12 deficiency anemia. *Humangenetik* 1966; **2**(3):287-316.
- Sevilla J, Madero L. Diagnóstico genético preimplantacional de la anemia de Fanconi. Boletín Informativo para especialistas y familiares de pacientes. Grupo Español para el estudio y tratamiento de la anemia de Fanconi 2002; **1**: 10-1.
- Seyschab H, et al. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 1995; **85**(8): 2233–2237.

- Shimamura A, de Oca RM, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, D'Andrea AD. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood*. 2002; **100**: 4649–54.
- Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* 2010; **24**(3):101–22.
- Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, et al. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood* 2005; **105** (3):1329-36.
- Strom CM, Levin R, Strom S, Masciangelo C, Kuliev A, Verlinsky. Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: the first 109 infants. *Pediatrics* 2000; **106**: 650-653.
- Swift M. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. *Nature* 1971; **230**(5293):370–3.
- Swift M, Sholman L, Gilmour D. Diabetes Mellitus and the gene for Fanconi's anemia. *Science* 1972; **178** : 308-310.
- Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z, Popovic J, Lin K, Verlander P et al. Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics* 2001; **107**: 744-754.
- Yousoufian H. Natural gene therapy and Darwinian legacy. *Nat Genet* 1996; **13**(3): 255-6.
- Zanis-Neto J, Flowers ME, Medeiros CR, Bitencourt MA, Setúbal DC, Funke V, Sanders J, Deeg HJ, Kiem HP, Martin P, Leisenring W, Storb R, Pasquini R. Low-dose cyclophosphamide conditioning for haematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors in patients with Fanconi anemia. *Br J Haematol* 2005; **130**(1): 99-106.