

**DANIELA VANDRESEN PILONETTO**

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA DE FANCONI:  
ANÁLISE DA VIA DE INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF/BRCA POR MEIO DA  
DETECÇÃO DA PROTEÍNA FANCD2 E DE SUA FORMA MONOUBIQUITINADA  
PELO MÉTODO DE *WESTERN BLOT***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Departamento de Clínica Médica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

**Orientador:**  
Prof. Dr. Ricardo Pasquini

**Co-orientadoras:**  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neiva Isabel Rodrigues Magdalena  
Dra. Noemi Farah Pereira

**CURITIBA**

**2007**

*Dedico este trabalho à memória de meu pai e a todos os  
pacientes que assim como ele acreditaram que na  
ciência encontrariam a cura de suas doenças.*

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini, orientador desta dissertação pelas horas dedicadas nas correções e pelas sugestões apresentadas, fundamentais para realização deste trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Noemi Farah Pereira, co-orientadora desta dissertação pela oportunidade na participação no Projeto em Anemia de Fanconi, pela importante colaboração nas diversas etapas deste estudo e pelo exemplo de dedicação e competência profissional.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neiva Isabel Rodrigues Magdalena, co-orientadora desta dissertação, pelas correções, pela disponibilidade no atendimento e pelas palavras de estímulo que muito me incentivaram.

Ao médico Dr. Marco Antonio Bitencourt, responsável pelo Ambulatório em Anemia de Fanconi do HC-UFPR, pelo importante e imprescindível trabalho realizado no atendimento a estes pacientes que possibilitou a realização desta pesquisa.

À assistente social Marlene Dias de Araújo Oliveira pela incansável dedicação na assistência prestada aos pacientes e seus familiares fundamental para a logística deste trabalho.

À minha colega bioquímica Elizabete Regina Vieira pelo excelente trabalho realizado e pelo companheirismo e amizade que tornam os dias de trabalho muito mais agradáveis.

Ao *St Jude Children's Research Hospital - International Outreach Program*, pelo auxílio financeiro a este estudo.

Ao Dr. Grover Bagby, e suas colaboradoras Dra. Jane Yates e Dra. Hanqian Carlson pelo treinamento em *Portland* na *Oregon Health and Science University* e pelas importantes sugestões na fase de implantação da metodologia utilizada neste estudo.

Ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli e a equipe da citogenética em especial às colegas Roseli do Rocio da Silva e Loraine Beatriz Acosta Veiga pela realização das análises citogenéticas.

À Prof.<sup>a</sup> Maria Felicitas Niedfeld de Rodriguez e toda a equipe da subseção de Cultivo de Tecidos do Laboratório de Imunogenética pelo apoio, incentivo e compreensão.

À Prof.<sup>a</sup> Márcia Olandoski e ao Prof. Ari Elias Sabbag Júnior pela análise estatística dos dados.

À Prof.<sup>a</sup> Eliane Cesário e a Prof.<sup>a</sup> Denise de Carvalho pela orientação e revisão da análise dos dados deste estudo.

À minha mãe Aladir, por estar sempre presente e por me ensinar a transpor obstáculos quando a vida exhibe seus grandes percalços.

Ao meu marido Marcelo, meu companheiro, incansável incentivador e responsável pelos melhores momentos da minha vida.

Aos meus filhos Camila, Marcelo Henrique e Lorenzo pela compreensão nos vários momentos importantes de suas vidas que estive ausente e por tornarem a minha vida a cada dia mais significativa.

A tantos outros que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste estudo, mas por serem muitos não podem ser citados, porém não estão esquecidos.

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| <b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....  | viii |
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....  | ix   |
| <b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....  | x    |
| <b>RESUMO</b> .....  | xii  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | xiii |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 1    |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....   | 3    |
| 2.1 HISTÓRICO DA ANEMIA DE FANCONI .....   | 3    |
| 2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS DA ANEMIA DE FANCONI ...                            | 4    |
| 2.3 PREVALÊNCIA DA ANEMIA DE FANCONI .....   | 7    |
| 2.4 HETEROGENEIDADE GENÉTICA DA ANEMIA DE FANCONI .....  | 7    |
| 2.5 GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO OU SUBTIPOS DA AF: GENES, SEUS<br>PRODUTOS, FUNÇÕES E MUTAÇÕES..... | 10   |
| 2.5.1 Grupo de Complementação FA-A .....   | 10   |
| 2.5.2 Grupo de Complementação FA-B .....   | 11   |
| 2.5.3 Grupo de Complementação FA-C .....   | 11   |
| 2.5.4 Grupo de Complementação FA-D1 .....  | 14   |
| 2.5.5 Grupo de complementação FA-D2 .....  | 14   |
| 2.5.6 Grupo de Complementação FA-E .....   | 15   |
| 2.5.7 Grupo de Complementação FA-F.....  | 15   |
| 2.5.8 Grupo de Complementação FA-G .....   | 16   |
| 2.5.9 Grupo de Complementação FA-H .....   | 17   |
| 2.5.10 Grupo de Complementação FA-I.....   | 18   |
| 2.5.11 Grupo de Complementação FA-J .....  | 19   |
| 2.5.12 Grupo de Complementação FA-L.....   | 19   |
| 2.5.13 Grupo de Complementação FA-M.....   | 20   |
| 2.5.14 Grupo de Complementação FA-N .....  | 21   |
| 2.6 INSTABILIDADE GENÔMICA E NEOPLASIAS MALIGNAS .....   | 24   |
| 2.7 REPARO DO DNA .....  | 25   |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.7.1    | Recombinação Homóloga .....   | 26 |
| 2.7.2    | Junção de Terminações Não Homólogas.....  | 28 |
| 2.7.3    | Ubiquitinação .....   | 28 |
| 2.8      | BASES MOLECULARES DA ANEMIA DE FANCONI .....  | 30 |
| 2.8.1    | Formação do Complexo .....  | 33 |
| 2.8.2    | Monoubiquitinação da FANCD2 e Ações a Jusante do Complexo Principal.....  | 35 |
| 2.9      | DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA DE FANCONI.....  | 37 |
| 2.9.1    | Testes de Quebras Cromossômicas .....   | 38 |
| 2.9.2    | <i>Western Blot</i> para FANCD2.....  | 39 |
| 2.9.3    | Ensaio de Complementação/Subtipificação .....   | 40 |
| 2.9.4    | Citometria de Fluxo.....  | 41 |
| 2.9.5    | Pesquisa de Mutações .....  | 41 |
| 2.10     | MOSAICISMO .....  | 44 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 46 |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 46 |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 46 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 47 |
| 4.1      | CASUÍSTICA.....   | 47 |
| 4.1.1    | Pacientes .....   | 47 |
| 4.1.2    | Controles .....   | 48 |
| 4.2      | MÉTODOS .....   | 50 |
| 4.2.1    | <i>Western Blot</i> para FANCD2.....  | 50 |
| 4.2.2    | <i>Western Blot</i> para BRCA2 .....  | 53 |
| 4.2.3    | Teste de Sensibilidade ao Diepoxibutano (Teste do DEB).....   | 54 |
| 4.2.4    | Métodos Estatísticos.....   | 55 |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | 57 |
| 5.1      | INVESTIGAÇÃO DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA FANCD2 EM PACIENTES<br>AF E CONTROLES SAUDÁVEIS PELO MÉTODO DE <i>WESTERN BLOT</i> ..... | 57 |
| 5.2      | PESQUISA DA PROTEÍNA BRCA2 PELO MÉTODO DE <i>WESTERN BLOT</i> .....   | 57 |
| 5.3      | COMPARAÇÃO ENTRE OS FENÓTIPOS DA FANCD2 OBTIDOS NO <i>WESTERN<br/>BLOT</i> E OS RESULTADOS OBSERVADOS NO TESTE DO DEB .....     | 58 |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 5.4      | COMPARAÇÃO ENTRE OS FENÓTIPOS DA FANCD2 E OS VALORES HEMATIMÉTRICOS EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI.....   | 60         |
| 5.5      | DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA FANCD2.....  | 61         |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>63</b>  |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | <b>74</b>  |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>76</b>  |
|          | <b>APÊNDICE 1 - DADOS GERAIS DOS PACIENTES</b> .....  | <b>83</b>  |
|          | <b>APÊNDICE 2 - DADOS E RESULTADOS DOS CONTROLES SAUDÁVEIS</b> .....  | <b>87</b>  |
|          | <b>APÊNDICE 3 - RESULTADOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA FANCD2, TESTE DO DEB E ESTUDO DE GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO/PESQUISA DE MUTAÇÕES</b> ..... | <b>90</b>  |
|          | <b>APÊNDICE 4 - RESULTADOS DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA FANCD2, TESTE DO DEB</b> .....                                | <b>94</b>  |
|          | <b>ANEXOS 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....  | <b>99</b>  |
|          | <b>ANEXOS 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO DOS PACIENTES</b> .....  | <b>101</b> |
|          | <b>ANEXOS 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO DOS CONTROLES</b> .....  | <b>104</b> |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| QUADRO 1 | - MARCOS HISTÓRICO DA ANEMIA DE FANCONI.....   | 3  |
| QUADRO 2 | - GRAUS DO COMPROMETIMENTO MEDULAR NA AF .....   | 5  |
| TABELA 1 | - GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO (SUBTIPOS GENÉTICOS) DA ANEMIA DE FANCONI.....  | 23 |
| TABELA 2 | - CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO .....  | 49 |
| TABELA 3 | - INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO <i>WESTERN BLOT</i> PARA FANCD2 .....  | 53 |
| TABELA 4 | - FENÓTIPOS DA FANCD2 OBTIDOS PELO MÉTODO DE <i>WESTERN BLOT</i> EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI E CONTROLES SAUDÁVEIS.....                     | 57 |
| TABELA 5 | - CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM O FENÓTIPO FANCD2S+/FANCD2L+ NO TESTE DE <i>WESTERN BLOT</i> .....                                | 58 |
| TABELA 6 | - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE DO DEB E OS FENÓTIPOS DA FANCD2 EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI.....                                  | 59 |
| TABELA 7 | - COMPARAÇÃO ENTRE VALORES HEMATIMÉTRICOS E FENÓTIPOS FANCD2 DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI .....   | 61 |
| TABELA 8 | - DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO DE <i>WESTERN BLOT</i> EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI E EM CONTROLES SAUDÁVEIS..... | 62 |



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| GRÁFICO 1 - ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS.....  | 6  |
| GRÁFICO 2 - PREVALÊNCIA DOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO NA AF .....   | 8  |
| GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS FENÓTIPOS OBSERVADOS NO <i>WESTERN BLOT</i> E A PORCENTAGEM DE CÉLULAS REVERTIDAS EM PACIENTES COM AF..... | 60 |
| FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PROTEÍNAS AF.....   | 24 |
| FIGURA 2 - RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA .....   | 27 |
| FIGURA 3 - UBIQUITINAÇÃO MEDIADA POR E1, E2 E E3 CONFERE ESPECIFICIDADE E ATIVA DIFERENTES PROCESSOS.....                                  | 30 |
| FIGURA 4 - ASSOCIAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF COM ATM E BRCA EM RESPOSTA À RADIAÇÃO IONIZANTE E MMC (MITOMICINA C) .....                          | 32 |
| FIGURA 5 - MODELO PARA FORMAÇÃO DO COMPLEXO PRINCIPAL DA AF .....  | 34 |
| FIGURA 6 - INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF NO MECANISMO DE REPARO DO DNA .....  | 36 |
| FIGURA 7 - MODELO DE ATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF NO REPARO DE LIGAÇÕES CRUZADAS INTERCADEIAS DO DNA.....                                     | 37 |
| FIGURA 8 - EXEMPLO DE RESULTADO DO TESTE DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA FANCD2.....   | 53 |
| FIGURA 9 - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM CÉLULAS AF EXPOSTAS AO DEB.....   | 55 |
| FLUXOGRAMA 1 - COMPLEMENTAÇÃO DIAGNÓSTICA DA AF.....   | 43 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                 |   |   |
|-----------------|---|---|
| ACD             | - | Ácido cítrico e dextrose  |
| AF              | - | Anemia de Fanconi   |
| APS             | - | <i>Amonium Persulfate</i>   |
| AT              | - | Ataxia- telangiectasia  |
| ATM             | - | Produto do gene da Ataxia-telangiectasia  |
| ATP             | - | Adenosina trifosfato  |
| ATR             | - | <i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>   |
| BRAFT           | - | Complexo de proteínas: BLM, RPA, AF e Topoisomerase III   |
| BRCA1           | - | <i>Breast Cancer Suscetibility Gene 1</i>   |
| BRCA2           | - | <i>Breast Cancer Suscetibility Gene 2</i>   |
| Cdc             | - | Quinases dependente de ciclinas   |
| DEB             | - | Diepoxibutano   |
| DGGE            | - | <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>  |
| DHPLC           | - | <i>Denaturing high performance liquid chromatography</i>  |
| DNAc            | - | DNA complementar  |
| dsRNA           | - | <i>Double strand ribonucleic acid</i>   |
| eIF- 2 $\alpha$ | - | Fator iniciador da tradução   |
| FAAPs           | - | <i>Fanconi Anemia Associated Polypeptides</i>   |
| GSTP1           | - | <i>Glutathione S Transferase P1</i>   |
| HR              | - | <i>Homologous repair</i>  |
| HRP             | - | <i>Horse Radish Peroxidase</i>  |
| Hsp70           | - | <i>Heat Shock Protein 70</i>  |
| ICL             | - | <i>Interstrand Cross-linking</i>  |
| IFAR            | - | <i>International Fanconi Anemia Registry</i>  |
| IFN $\gamma$    | - | <i>Interferon <math>\gamma</math></i>   |
| LMA             | - | Leucemia Mielóide Aguda   |
| MDS             | - | <i>Myelodysplastic Syndromes</i>  |
| MLPA            | - | <i>Multiplex ligation probe amplification</i>   |
| MMC             | - | Mitomicina C  |
| MRE11           | - | Proteína reparadora do DNA com atividade nuclease, pode também designar o complexo de proteínas: MRE11, Rad50 e NSB1/Xrs2 |
| NADPH           | - | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase   |
| NHEJ            | - | <i>Non-homologous end-joining</i>   |
| NLS             | - | <i>Nuclear localization signal</i>  |
| NSB             | - | <i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>   |
| NBS1            | - | Produto do gene da <i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>  |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | - Anion superóxido  |
| OH <sup>-</sup>             | - Radical hidroxila reativo   |
| PALB2                       | - Proteína de interação com BRCA2   |
| PBS                         | - <i>Phosphate Buffer Saline</i>  |
| PHA-P                       | - <i>Phytohemagglutinin P</i>   |
| PHD finger                  | - <i>Plant homeodomain finger</i>   |
| PKR                         | - Quinase protéica dependente de RNA  |
| RAD51                       | - Proteína reparadora do DNA com atividade nuclease   |
| ReCQ                        | - Enzima helicase que desespiraliza o DNA para que ocorra a replicação, transcrição e reparo do DNA |
| RNA                         | - <i>Ribonucleic Acid</i>   |
| ROM                         | - Proteína de ligação ao RNA  |
| ROS                         | - <i>Reactive oxygen species</i>  |
| RPA                         | - Proteína de replicação A  |
| SBF                         | - Soro bovino fetal   |
| SDS-PAGE                    | - Sodium Dodecil Sulfate – <i>Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i>                                |
| SOD                         | - Superóxido dismutase  |
| STATs                       | - <i>Signal Transducer and Activation of Transcription</i>  |
| TBS                         | - <i>Tris Buffer Saline</i>   |
| TEMED                       | - <i>N', N', N', N'- Tetramethylethylenediamine</i>   |
| TNF <sub>α</sub>            | - <i>Tumoral Necrosis Factor Alpha</i>  |
| TopIII <sub>α</sub>         | - Topoisomerase III Alpha   |
| XP                          | - <i>Xeroderma Pigmentosum</i>  |

## RESUMO

Anemia de Fanconi (AF) é uma doença autossômica recessiva ou ligada ao X, cuja heterogeneidade clínica e genética resulta de diferentes mutações em genes cujos produtos estão envolvidos nas vias de reparo do DNA. A variabilidade fenotípica desta doença dificulta o diagnóstico com base nas características clínicas, sendo necessários testes laboratoriais para sua confirmação. Avanços no conhecimento da patogênese molecular da AF levaram ao desenvolvimento do *Western Blot* para FANCD2 para auxílio diagnóstico. O objetivo deste estudo foi analisar a via de interação das proteínas AF/BRCA por meio da detecção da proteína FANCD2, por *Western Blot* e investigar a contribuição dada por esta análise na elucidação do diagnóstico da AF. Foram incluídos 84 pacientes AF e 98 indivíduos saudáveis, no período de setembro de 2004 a novembro de 2006. O método de *Western Blot* permite detectar a forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 em linfócitos do sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina. Indivíduos saudáveis apresentam uma banda S (*Short*) correspondente à isoforma não ubiquitinada da FANCD2 e uma segunda banda L (*Long*) referente à isoforma monoubiquitinada desta proteína (FANCD2S+ /FANCD2L+). Pacientes com AF mostram ausência da FANCD2 monoubiquitinada (FANCD2S+ /FANCD2L-) ou de ambas isoformas (FANCD2S- /FANCD2L-), porém também expressam o fenótipo FANCD2S+ /FANCD2L+ quando pertencentes aos subtipos com atuação a jusante da FANCD2 ou devido à presença do mosaïcismo somático. Dentre os 84 pacientes analisados, 77 (91,7%) foram positivos no teste do DEB e apresentaram o fenótipo FANCD2S+ /FANCD2L- no *Western Blot*; 2 (2,4%) foram DEB+ e no *Western Blot* o fenótipo FANCD2S- /FANCD2L-; 5 (5,9%) positivos no DEB porém *Western Blot* com fenótipo FANCD2S+ /FANCD2L+. Quanto aos indivíduos controle, todos apresentaram resultados negativos, concordantes entre as duas metodologias. Com base nestes resultados, o *Western Blot* para FANCD2 apresentou 94% (79/84) de sensibilidade e 100% (98/98) de especificidade. Foi realizada uma análise comparativa entre a porcentagem de reversão observada no DEB e os fenótipos observados no *Western Blot*. Houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,006$ ) entre o grupo de pacientes que expressam ambas as isoformas da FANCD2 que mostraram um número mais elevado de células revertidas ( $M=68\%$ ) quando comparados ao grupo com ausência da FANCD2 monoubiquitinada ( $M=6\%$ ), o que sugere a presença de mosaïcismo somático de células hematopoéticas. A monoubiquitinação do FANCD2 detectada pelo *Western Blot* associada ao teste de quebras cromossômicas (DEB) e aos parâmetros clínicos possibilitou a corroboração do diagnóstico da AF. A análise direta do mecanismo molecular que leva à monoubiquitinação da FANCD2 permitiu classificar os pacientes de acordo com a etapa da via AF/BRCA que se encontra comprometida. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar o mosaïcismo nos pacientes FANCD2L+ /FANCD2S+ com DEB+, bem como a pesquisa de subtipos genéticos uma vez que este fenótipo também sugere subtipos envolvendo mutações em genes que codificam proteínas com ação a jusante da FANCD2.

**Palavras-chave:** Anemia de Fanconi, *Western blotting* para FANCD2, Teste de quebras cromossômicas.

## ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is an autosomal recessive or X-linked disease, in which the clinical and genetic heterogeneity comes from different genetic mutations in genes involved on DNA repair pathway. Diagnosis based on clinical manifestations can be difficult because of the phenotypic variability and laboratory tests may be necessary to confirm it. These necessities and the new advances into the molecular pathogenesis of FA led to the development of the Western Blot for FANCD2 to complement the diagnosis of FA. The objective of this study was to analyze the FA/BRCA pathway by the detection of FANCD2 protein, by Western Blot and identify the contribution of this analysis to the diagnosis of FA. In this study samples from 84 patients with diagnosis of FA and 98 healthy controls were included all of them collected within September 2004 to November 2006. The Western Blot allows detection of monoubiquitinated form of FANCD2 protein from peripheral blood lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin on primary culture. Healthy people show one band S (short) corresponding to the unmodified form of FANCD2 and a second band L (long) referent to the monoubiquitinated isoform of this protein (FANCD2S+/FANCD2L+). Patients with FA show absence of FANCD2 monoubiquitinated isoform (FANCD2S-/FANCD2L-) or the absence of both isoforms (FANCD2S-/FANCD2L-) but they may also show FANCD2S+/FANCD2L+ phenotype when a downstream group is involved or on situations of somatic mosaicism. Seventy seven (91,6%) out of the 84 patients analyzed were positive on DEB and had phenotype FANCD2S+/FANCD2L- on Western Blot; 2(2,4%) were DEB positive and had phenotype FANCD2S-/FANCD2L- on Western Blot; 5 (5,95%) were DEB+ but had phenotype FANCD2S+/FANCD2L+ on Western Blot. All of the normal controls showed agreeable negative results with both methods. According to these results the Western Blot for FANCD2 showed 94% (79/84) sensitivity and 100% (98/98) specificity. From a comparative analysis between the percent of somatic reversion observed on DEB and the phenotypes observed on the Western Blot a significant statistic difference were detected ( $p=0,006$ ) between the percent of reversion observed on patients with the phenotype FANCD2S+ /FANCD2L+ (M=68%) and patients with the phenotype FANCD2S+ /FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L- (M=16%). The specific analysis of the FA/BRCA pathway that results in monoubiquitination of the FANCD2 protein (Western Blot) combined with clinical and chromosome breakage data allowed a comprehensive diagnosis of FA patients. It was possible to previously classify patients according to the level at which the FA/BRCA pathway is disrupted. However further studies are necessary to confirm some of these findings such as the study of the mosaicism on patients FANCD2S+/FANCD2L+, as well as the subtyping and mutation screening of this patients once this phenotype also suggest a possible subtype with mutations on genes that encodes a protein that functions downstream of FANCD2.

**Keywords:** Fanconi anemia; FANCD2 Western Blotting; chromosomal breakage test.

## 1 INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara, porém uma das anemias aplásticas constitucionais mais freqüentes. O padrão de herança é autossômico recessivo na maioria dos casos, sendo raramente ligado ao X. É caracterizada clinicamente por malformações congênitas, falência progressiva da medula óssea, fragilidade cromossômica e suscetibilidade aumentada ao câncer (SHIMAMURA, 2006).

Pacientes com AF apresentam uma grande heterogeneidade clínica; alguns pacientes têm manifestações fenotípicas mais expressivas, com anormalidades esqueléticas graves, aparecimento precoce das disfunções da medula óssea e câncer, entretanto cerca de 20 % dos indivíduos doentes possuem aparência normal ao exame clínico (JOENJE e PATEL, 2001; PASQUINI e ZANIS-NETO, 2004).

Uma grande heterogeneidade genética também é observada na AF, treze grupos de complementação ou subtipos genéticos já foram identificados, sendo que a maioria dos genes correspondentes já é conhecida.

A variabilidade fenotípica da AF dificulta o diagnóstico clínico dessa doença, sendo necessária a complementação diagnóstica por métodos laboratoriais (FAIVRE et al., 2000).

Ao longo dos anos várias descobertas contribuíram para a caracterização da AF. Entre as mais importantes estão a instabilidade cromossômica espontânea e a hipersensibilidade das células da pacientes AF ao efeito indutor de quebras cromossômicas dos agentes clastogênicos, tais como mitomicina C (MMC) e diepoxibutano (DEB). Com base nestas características marcantes foram desenvolvidos testes de quebras cromossômicas, como o Teste de Sensibilidade ao DEB que é um método citogenético, ainda hoje utilizado como método de referência para diagnóstico da AF (AUERBACH, 1993).

Investigações a respeito da patogênese molecular subjacente à AF apontam na sua maioria para o defeito que estas células apresentam nos processos de reparo do DNA. Esses processos ocorrem normalmente durante o ciclo celular ou em resposta

aos danos causados ao DNA. Mutações deletérias ocorridas nos genes que codificam as proteínas da AF geram disfunções nos mecanismo de reparo e resultam em muitas das características clínicas e celulares observadas na AF (MONTES DE OCA et al., 2005).

Em decorrência dos avanços no conhecimento da patogênese molecular da AF foi desenvolvido um método complementar ao diagnóstico, descrito por Shimamura et al. (2002). Neste método são feitos ensaios para a detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 por técnicas de *Western blot* a partir de linfócitos do sangue periférico.

O Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UFPR tem uma casuística importante de pacientes com anemia de Fanconi e uma experiência de mais de 25 anos no atendimento clínico e laboratorial destes pacientes, tendo realizado mais de 180 transplantes em pacientes AF ao longo destes anos. Sendo assim foi considerada de importância a realização de estudos que possibilitem uma melhor caracterização destes pacientes. O presente estudo apresenta uma análise da via de interação das proteínas da AF no processo de reparo do DNA por meio da detecção da proteína FANCD2 e de sua forma monoubiquitinada, utilizando-se o método de *Western Blot*. O objetivo principal foi investigar a contribuição dada por esta análise na elucidação do diagnóstico da AF.

O diagnóstico rápido e preciso desta doença é de extrema importância uma vez que afeta significativamente o monitoramento do paciente, as decisões no tratamento bem como o aconselhamento genético às famílias. Pacientes com fenótipos mais graves, que desenvolvem aplasia medular e câncer, devem ser rapidamente diagnosticados para que sejam freqüentemente monitorados e recebam intervenções terapêuticas precoces (SHIMAMURA et al., 2002; WAGNER et al., 2004).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO DA ANEMIA DE FANCONI

QUADRO 1 - MARCOS HISTÓRICOS DA ANEMIA DE FANCONI

| ANO  | MARCOS HISTÓRICOS  |
|------|--|
| 1927 | A Anemia de Fanconi foi descrita pelo pediatra suíço GUIDO FANCONI. Em 1967, este mesmo autor apresentou seus aspectos clínicos.   |
| 1964 | Schroeder et al. descreveram a presença de quebras cromossômicas espontâneas nas culturas de linfócitos de pacientes com AF.   |
| 1976 | Schroeder et al. estabeleceram o padrão autossômico recessivo de herança e ainda sugeriram a existência da heterogeneidade genética na AF.   |
| 1979 | Dosik et al. demonstraram que as alterações mais freqüentes em células de pacientes AF são as quebras de cromátides e figuras radiais<br>Realização do 1.º Transplante de Medula Óssea (TMO) no Brasil, pela equipe do Dr. Ricardo Pasquini, HC-UFPR.  |
| 1980 | Zakrzewski e Sperling demonstraram a existência de pelo menos dois grupos de complementação na AF.<br>Gluckman et al. relataram casos de TMO em pacientes AF e constataram a necessidade de regimes de condicionamento específicos para estes pacientes.   |
| 1981 | Auerbach et al. descreveram o teste padrão para diagnóstico laboratorial da AF, o teste do diepoxibutano (DEB). Foi realizado o primeiro TMO em pacientes AF no Brasil pela equipe do Dr. Ricardo Pasquini, HC-UFPR.   |
| 1992 | Strathdee et al. identificaram o primeiro gene da AF, o <i>FANCC</i>   |
| 1996 | Lo Ten Foe et al. e Apostolou et al. realizaram a clonagem do gene <i>FANCA</i> .  |
| 1998 | Winter et al. identificaram o gene <i>FANCG</i> .  |
| 2000 | Winter et al. (2000a) identificaram o gene <i>FANCE</i> . Nesse mesmo ano, Winter et al. (2000c) isolaram o DNA complementar do gene <i>FANCF</i> .  |
| 2001 | Timmers et al. realizaram a clonagem posicional do gene <i>FANCD2</i> .  |
| 2002 | Shimamura et al. desenvolveram um método complementar ao diagnóstico da AF, baseado na detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2.  |
| 2003 | Meetei et al. detectaram um novo grupo de complementação, o FA-L.  |
| 2004 | Meetei et al. identificaram que o gene <i>FANCB</i> que está localizado no cromossomo X, o que trouxe a característica da herança ligada ao X à AF.  |
| 2005 | Meetei et al. identificaram o grupo de complementação FA-M. Nesse mesmo ano, Levitus et al. identificaram o gene <i>FANCJ (BRIP1)</i> .  |
| 2007 | Xia et al. e Reid et al. identificaram um novo grupo de complementação, denominado FA-N, cujo gene candidato é o <i>PALB2</i> .<br>Smogorzewska et al. concluíram que a proteína FANCI corresponde a uma variante da proteína KIAA1794 e que o gene correspondente a esta proteína está localizado no cromossomo 15q25-26. |



## 2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS DA ANEMIA DE FANCONI

A anemia de Fanconi é uma doença hereditária de falha progressiva da medula óssea, caracterizada por anormalidades congênitas, hematopoese alterada, fragilidade cromossômica e suscetibilidade aumentada ao câncer (SHIMAMURA, 2006).

É consensual entre os autores a grande heterogeneidade clínica da AF; alguns pacientes apresentam um fenótipo relativamente discreto, com desenvolvimento normal do esqueleto, alterações hematológicas subclínicas e sobrevida de mais de 30 anos. Outros pacientes podem apresentar manifestações fenotípicas mais expressivas, com anormalidades esqueléticas graves, aparecimento precoce das disfunções da medula óssea e câncer, que, em geral, são as causas de óbito na primeira década de vida (JOENJE e PATEL, 2001).

A idade média do diagnóstico para o sexo masculino é de 6,5 anos e para o feminino é de 8 anos, porém pode chegar a ser feito na idade adulta. Diante dos avanços no tratamento, bem como no conhecimento da fisiopatologia desta doença, a sobrevida média destes pacientes que era de 20 anos até a década de 1990 subiu para 30 nos anos 2000 (TANIGUCHI e D'ANDREA, 2006).

A suspeita clínica da AF é sugerida em indivíduos que apresentam anormalidades físicas incluindo baixa estatura, pigmentação anormal da pele (manchas café-com-leite e hipopigmentação), malformações dos rins, coração e esqueleto (ausência e anormalidades de polegar e radio), cabeça, olhos pequenos, deficiência auditiva, hipogonadismo, fertilidade reduzida e atraso no desenvolvimento mental. Alguns pacientes não apresentam malformações congênitas e segundo Alter (2003), as anormalidades físicas não são a causa de mortalidade dos pacientes AF, levando a concluir que a ausência destas não exclui o diagnóstico da AF.

A falência progressiva da medula óssea é outra característica clínica da AF, que, em geral, ocorre na primeira década de vida, podendo variar em cada caso. Frequentemente este processo tem início com a redução dos valores hematimétricos em sangue periférico (trombocitopenia, leucopenia, anemia), sendo a medula óssea

inicialmente normocelular e tornando-se progressivamente hipoplástica (GROSS et al., 2002). Para caracterizar melhor o perfil hematológico destes pacientes, três graus do comprometimento medular podem ser definidos, como apresentado no quadro 2, grau I = sem falha medular; grau II = falha medular inicial; grau III = falha medular avançada. Estes dados são baseados em informações da literatura e são aplicáveis a prática clínica (BUTTURINI et al., 1994; GUARDIOLA et al., 2000).

QUADRO 2 - GRAUS DO COMPROMETIMENTO MEDULAR NA AF

| ESTÁGIOS                           | CRITÉRIOS   |
|------------------------------------|---|
| Grau I<br>Sem falha medular        | Plaquetas > 100.000/ $\mu$ L; neutrófilos > 1000/ $\mu$ L; hemoglobina >10 g/dL   |
| Grau II<br>Falha medular inicial   | Pelo menos um dos critérios: plaquetas <100.000/ $\mu$ L mas > 20.000/ $\mu$ L; neutrófilos < 1.000/ $\mu$ L mas > 500/ $\mu$ L; hemoglobina < 10 g/dl; sem necessidade de transfusões ou até < 20 transfusões. |
| Grau III<br>Falha medular avançada | Pelo menos um dos critérios: plaquetas < 20.000/ $\mu$ L; neutrófilos < 500/ $\mu$ L ou necessidade de > de 20 transfusões de hemácias e (ou) plaquetas.  |

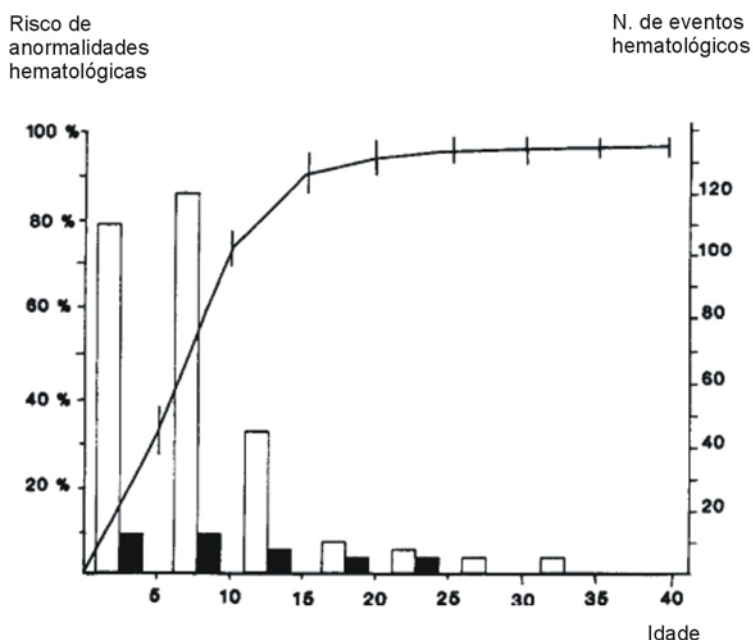
No estudo feito por Butturini et al. (1994) foram estudados 388 pacientes registrados no IFAR (*International Fanconi Anemia Registry*) com uma mediana de cinco anos de acompanhamento, sendo que 332 desses pacientes apresentaram anormalidades hematológicas. Em 274/332 pacientes as alterações hematológicas foram detectadas no momento do diagnóstico e em 58 deles essas apareceram em uma mediana de 3 anos após o diagnóstico. A mediana de idade dos pacientes ao início das alterações hematológicas foi de sete anos e o risco estatístico de desenvolver anormalidades hematológicas aos 40 anos de idade foi de 98 % (IC 95% = 93 a 99%). Os dados do estudo de Butturini et al. (1994) estão apresentados no gráfico 1.

A predisposição ao câncer é uma característica marcante da AF. Segundo Rosenberg, Greene e Alter (2003), a razão entre os casos de leucemia mielóide aguda observados e esperados de é 785 entre os pacientes AF. O risco de desenvolver tumores sólidos, particularmente carcinoma de células escamosas, envolvendo especialmente cabeça e pescoço, trato gastrintestinal e genital em mulheres, também está aumentado. A maioria dos tumores associados com AF desenvolve-se após os

13 anos de vida. As neoplasias malignas são difíceis de tratar porque os indivíduos com AF submetidos à quimioterapia e radioterapia têm maior toxicidade. Em torno dos 40 a 48 anos o risco acumulado de disfunção da medula óssea é de 90%, a ocorrência de hemopatias malignas é de 10 a 33% e das não hematológicas é de 29% (KUTLER et al., 2003).

Em função de que a variabilidade fenotípica dos pacientes AF dificulta o diagnóstico clínico, foi sugerido por Auerbach, Rogatko e Schroeder (1989), a partir de uma análise de regressão multivariada de 310 pacientes do *IFAR*, um método simplificado de classificação com base em oito parâmetros clínicos que melhor definem o paciente AF (retardo no crescimento, pigmentação anormal, anormalidade renal e urinária, microftalmia, dificuldades no aprendizado, trombocitopenia, anormalidade de rádio e polegar e outras anormalidades esqueléticas). O somatório dos pontos atribuídos a estes parâmetros clínicos, permite obter um escore que se correlaciona com a probabilidade de o paciente ser ou não clinicamente definido como AF.

GRÁFICO 1 - ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS



FONTE: Butturini et al. (1994)

NOTA: A linha indica o risco estatístico de desenvolver anormalidades hematológicas por idade nos 388 pacientes com AF estudados (as marcas na linha representam o intervalo de 95% de confiança). O histograma indica a distribuição por idade das alterações hematológicas registradas em intervalos de cinco anos (□ probandos; ■ irmãos).

## 2.3 INCIDÊNCIA DA ANEMIA DE FANCONI

A incidência da AF é de aproximadamente um em cada cem mil indivíduos nascidos vivos na maioria das populações já estudadas. A frequência geral de portadores na população dos Estados Unidos, da Europa e do Japão está estimada em aproximadamente um em trezentos (D'ANDREA e GROMPE, 2003 e ROSENBERG, GREENE e ALTER, 2003). Ainda não foram realizados estudos da incidência ou da frequência de portadores da AF no Brasil.

## 2.4 HETEROGENEIDADE GENÉTICA DA ANEMIA DE FANCONI

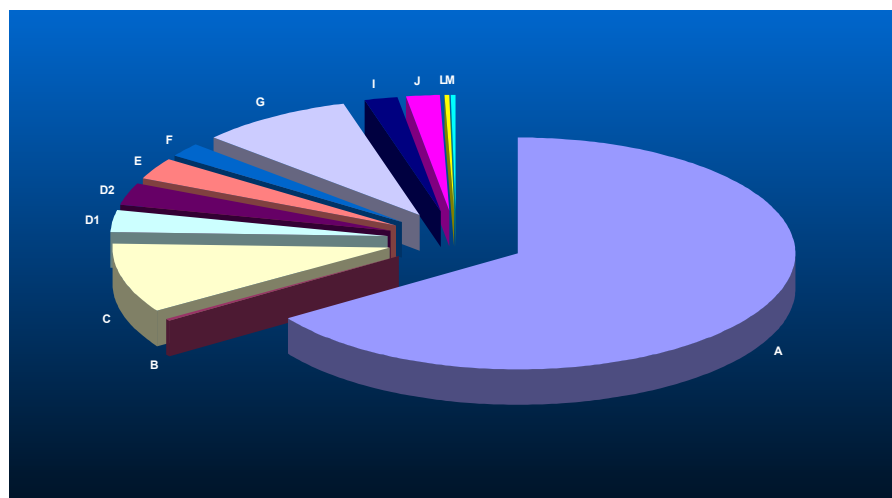
A AF é uma doença recessiva com ambos os padrões de herança, autossômica na maioria dos casos e raramente ligada ao X (*FANCB*). É uma doença bastante heterogênea, não apenas em nível clínico. A heterogeneidade genética da AF também pode ser evidenciada em estudos de hibridização celular e de complementação com a definição dos subtipos genéticos da AF.

Foi demonstrada a existência de pelo menos treze grupos de complementação ou subtipos genéticos (FA-A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M e N) sendo que todos os genes correspondentes já foram identificados: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1(BRCA2)*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG (XRCC9)*, *FANCI (KIAA1794)*, *FANCJ (BACH1/BRIP1)*, *FANCL (PHF9)*, *FANCM (FAAP250)*, *FANCN (PALB2)*. Uma grande variedade de métodos tem sido utilizada na investigação destes genes. *FANCA*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* foram identificados por clonagem do DNAc e complementação funcional; *FANCD2* e *FANCJ(BACH1/BRIP1)* por análise de ligação e clonagem posicional, *FANCD1/BRCA2* e *FANCJ(BACH1/BRIP1)* pela estratégia de gene candidato; *FANCL*, *FANCB* e *FANCM* em estudos de associação protéica e de purificação bioquímica e *FANCN* e *FANCI* por seqüenciamento do DNA genômico e do DNAc (JOENJE, PALS e ZWAAN, 2004; GURTAN et al., 2006; XIA et al., 2007; SMOGORZEWSKA et al., 2007).

Segundo dados internacionais, a maioria dos pacientes AF pertence aos grupos de complementação FA-A, FA-C e FA-G com uma distribuição aproximada de 65% no grupo FA-A e 8-10% em cada um dos grupos FA-C e FA-G. Contudo, a frequência dos grupos de complementação da AF é variável entre diferentes grupos étnicos. Alguns grupos apresentam uma ocorrência mais elevada de uma mutação específica, o que influencia significativamente a prevalência de diferentes subtipos em cada população (D'ANDREA e GROMPE, 2003; SHIMAMURA, 2006).

A classificação dos pacientes registrados no Programa Europeu de Pesquisa em Anemia de Fanconi possibilitou estimar a prevalência relativa dos doze grupos de complementação melhor caracterizados até o momento, como representado no gráfico 2, que foi construído com base nos estudos feitos por Levitus et al. (2004) e Shimamura (2006).

GRÁFICO 2 - PREVALÊNCIA DOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO NA AF



FONTE: Adaptado de Levitus et al. (2004) e Shimamura (2006)

NOTA: Resultados baseados no registro de pacientes no Programa Europeu de Pesquisa em Anemia de Fanconi (1994-2003). As porcentagens estimadas por grupo de complementação foram FA-A 66%; FA-B raro; FA-C 10%; FA-D1 3%; FA-D2 3%; FA-E 3%; FA-F 2%; FA-G 9%; FA-I 2%; FA-J 2%; FA-L raro, FA-M raro.

As informações a respeito da relevância do conhecimento do grupo de complementação ou de mutações específicas no prognóstico dos pacientes ainda são muito limitadas. Os riscos associados a cada subtipo da AF, especialmente os

mais freqüentes (FA-A, C e G), têm sido investigados por meio de alguns estudos de correlações entre o genótipo e o fenótipo. Aparentemente a definição da mutação específica que o paciente apresenta parece ter uma maior relevância no acompanhamento clínico do que somente a definição do grupo de complementação (KUTLER et al., 2003).

De maneira geral, pacientes do subtipo FA-G têm citopenia mais grave e alta incidência de leucemia. As anormalidades somáticas são menos freqüentes em indivíduos do grupo FA-C com um aparecimento tardio da anemia aplástica, contudo indivíduos deste mesmo grupo com mutações IVS4 A>T ou deleções do exon 14 parecem apresentar um maior número de anormalidades congênitas, anemia aplástica severa e mortalidade mais freqüente. Pacientes do grupo FA-A, homocigotos para mutação que resulta em um alelo nulo (não expresso), têm incidência mais elevada de leucemia do que aqueles deste mesmo grupo cujas mutações produzem a proteína FANCA com alterações. Essa análise feita por Faivre et al. (2000) indica que pacientes com mutações em *FANCG* e outros com algumas mutações específicas em *FANCA* são grupos de alto risco, com necessidade de monitoramento freqüente e intervenção terapêutica precoce.

Um outro estudo realizado por Wagner et al. (2004) sugere que pacientes com mutações bialélicas em *BRCA2* (ambos os alelos apresentam mutações deletérias, em homocigose ou em heterocigose composta) mostram um alto risco de desenvolver leucemia aguda durante os primeiros cinco anos de vida. Segundo estes autores, este tipo de mutação requer exames freqüentes para investigar alterações da medula óssea. A possibilidade de um transplante de células tronco hematopoéticas, anterior ao desenvolvimento da mielodisplasia ou da leucemia aguda, deve ser considerado. De forma semelhante, os pacientes com mutações bialélicas em *FANCN* (*PALB2*) podem representar um subtipo com um fenótipo clínico de alta complexidade (REID et al., 2007). Sendo assim, estes autores concluíram que testes para detectar um possível envolvimento do gene *BRCA2* e *FANCN* devem ser

considerados sempre que não tenha sido possível incluir o paciente em um dos principais grupos de complementação freqüentemente pesquisados.

## 2.5 GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO OU SUBTIPOS DA AF: GENES, SEUS PRODUTOS, FUNÇÕES E MUTAÇÕES.

### 2.5.1 Grupo de Complementação FA-A

O gene *FANCA* foi identificado por Lo Ten Foe et al. (1996) por ensaios de complementação e posteriormente por clonagem posicional e estudos de expressão. É constituído de 43 exons e codifica uma proteína de 1.455 aminoácidos. Esta proteína *FANCA*, localizada predominantemente no citoplasma, desempenha também funções no núcleo em associação direta com a proteína *FANCG*, por meio de sua porção N-terminal, e indiretamente com as proteínas *FANCC* e *FANCF*. Grompe e D'Andrea (2001) salientam a importante interação das proteínas AF do grupo principal, incluindo *FANCA*, com a proteína *BRCA1* em um modelo para o reparo de ligações cruzadas intercadeias do DNA.

Com base nos dados do IFAR (*International Fanconi Anemia Registry*), Levrant et al. (2005) revisaram o espectro de variações na seqüência do *FANCA* e demonstraram que o grupo de complementação FA-A representa aproximadamente 65% de todos os indivíduos afetados. O *FANCA* é um gene altamente polimórfico e hipermutável com mais de 100 mutações diferentes identificadas, sendo muitas delas pequenas inserções/deleções que implicam na produção de uma proteína alterada. Contudo, existem as grandes deleções que representam 40% das mutações encontradas neste gene e resultam na ausência total de expressão da proteína (mutações nulas).

Na população brasileira, uma mutação no exon 38 do gene *FANCA*, constituída pela deleção dos nucleotídeos das posições 3788 à 3790 (3788-3790del), foi encontrada em uma freqüência de 30% dos pacientes AF estudados (MAGDALENA et al., 2005). Em populações da África do Sul, deleções dos exons 11 à 17 e dos exons 12 à 31 são relativamente freqüentes (JOENJE e PATEL, 2001).

### 2.5.2 Grupo de Complementação FA-B

Inicialmente alguns achados preliminares incluíam pacientes dos subtipos FA-B e FA-D1 entre aqueles que apresentavam mutações bialélicas em *BRCA2*. A hipótese sugerida era de que o gene *FANCB* seria uma variante alélica decorrente de uma mutação hipomórfica do gene *BRCA2*, que resultaria em uma menor quantidade do produto deste gene (HOWLETT et al., 2002).

Posteriormente Meetei et al. (2004) identificaram alterações no polipeptídeo FAAP95 entre os pacientes do grupo de complementação FA-B. FAAPs são polipeptídeos associados à anemia de Fanconi e estão entre os componentes ainda não identificados do complexo principal de proteínas AF. Com o uso de técnicas de espectrometria de massa, *imunoblot* e imunoprecipitação, estes autores constataram que o FAAP95 é um componente estável e funcional do complexo principal de proteínas AF com uma possível interação direta com FANCL e aparentemente necessário para estabilizar essa proteína no complexo principal da AF.

O gene que codifica a proteína FAAP95, também denominada FANCB, está localizado no cromossomo X (Xp22.31), afetando assim o sexo masculino em maior proporção. Esta nova característica da AF, de herança recessiva ligada ao X, tem importantes conseqüências para o aconselhamento genético das famílias, porém este é um subtipo bastante raro, apenas quatro famílias com mutações em *FANCB* foram identificadas até o presente (MEETEI et al., 2004).

### 2.5.3 Grupo de Complementação FA-C

O gene *FANCC* foi clonado por complementação funcional por Strathdee et al. (1992) e codifica uma proteína de 558 aminoácidos (63kDa), com uma localização predominantemente citoplasmática, porém possui um domínio trans-membrana que possibilita sua entrada no núcleo da célula (HOATLIN et al., 1998).

A proteína FANCC, além da participação nos mecanismos de reparo do DNA, desempenha um papel multifuncional e possivelmente dispõe de domínios funcionais



estruturalmente separados. Alguns atuam na tolerância aos agentes indutores de ligações cruzadas do DNA em conjunto com as demais proteínas AF no núcleo celular, outros desempenham importante papel no controle do ciclo celular, no transporte de proteínas, na sobrevivência das células, na transdução de sinais e na regulação da detoxificação no citoplasma da célula (BOGLIOLO et al., 2002).

Alguns desses mecanismos que envolvem a proteína FANCC e possivelmente outras proteínas AF, independente de suas funções na via de interação AF/BRCA, serão abordados a seguir.

Em células estimuladas por citocinas ou na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a FANCC e a FANCD2 formam um complexo de alto peso molecular com moléculas STAT (STATs 1, 3 e 5), que são quinases transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição. A formação deste complexo é necessária para a fosforilação dos STATs, que são assim translocados para o núcleo a fim de comandar respostas que afetam a sobrevivência das células. Mutações em *FANCC* impedem a associação aos STATs e conseqüentemente a fosforilação dos mesmos levando ao descontrole da sobrevivência da célula (FAGERLIE et al., 2001; BAGBY e ALTER, 2006).

A proteína FANCC, em conjunto com proteínas de choque térmico (Hsp), apresenta funções anti-apoptóticas. A Hsp70 liga-se à FANCC e modula a atividade da quinase-proteica dependente de RNA de dupla fita (PKR). A PKR induz a fosforilação do fator iniciador da tradução (eIF-2 $\alpha$ ), resultando na inibição da tradução e conseqüente indução da apoptose. Tanto a PKR quanto a eIF-2 $\alpha$  são excessivamente ativas em células com mutações em *FANCC* em função da falha na associação da FANCC com Hsp70 (FAGERLIE et al., 2001; BAGBY e ALTER, 2006).

As proteínas AF, em especial a FANCC, também fazem parte de mecanismos que protegem as células dos danos causados pelo estresse oxidativo, o qual é decorrente de alta tensão de oxigênio, radiação gama, radiação UV ou drogas que geram o radical hidroxila reativo ( $OH^\cdot$ ). Esses fatores mutagênicos geram lesões nos cromossomos e quebras de dupla fita do DNA. A redução do oxigênio leva à produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que precisa ser removido pela enzima superóxido dismutase (SOD),

a qual, por sua vez, gera o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), cuja toxicidade requer detoxificação pela catalase (BOGLIOLO et al., 2002).

Vários são os processos que envolvem o metabolismo do oxigênio e a detoxificação de suas espécies reativas (ROS). A proteína FANCC tem sua participação conhecida no metabolismo do  $O_2$  dependente de citocromo P450 e na interação com a glutathione S transferase P1 (GSTP1). O citocromo P450 é uma superfamília de hemoproteínas que catalisam a oxidação de um grande número de substâncias endógenas e xenobióticas. Para que o metabolismo dependente de citocromo P450 ocorra é preciso a participação de redutases que fazem a transferência de elétrons do NADPH para P450. Em células FA-C a detoxificação é anormal, indicando um papel da FANCC como um regulador negativo da atividade redutase. Uma atividade elevada das redutases pode levar à produção de ROS, afetando a sobrevivência das células.

A FANCC parece também aumentar a atividade da enzima GSTP1, envolvida na detoxificação de xenobióticos e produtos do estresse oxidativo, em células expostas à indutores de apoptose. A FANCC previne a formação de pontes disulfeto de inativação na GSTP1, atuando nos mecanismos reguladores da GSTP1. Muitos estudos estão buscando uma melhor compreensão do papel das proteínas AF nos danos oxidativos causados ao DNA (CUMMING et al., 2001; BAGBY e ALTER, 2006).

Análises do gene *FANCC* mostram um pequeno número de mutações e, em geral, com origens ancestrais específicas. A primeira variante alélica identificada foi 1916C>T. É uma mutação de ponto que resulta em substituição de uma leucina por uma prolina na posição 554. Outra mutação descrita foi a IVS4 + 4 A> T, encontrada em alta frequência (80%) em uma população de judeus Ashkenazi. Estas duas mutações estão associadas a um fenótipo bastante grave da doença. As mutações 1897C>T, 322delG, 808C>T são mais frequentes em indivíduos com origem ancestral do norte da Europa e estão associadas a um fenótipo mais brando (WHITNEY et al., 1994).

#### 2.5.4 Grupo de Complementação FA-D1

Whitney et al. (1995) e Jackobs et al. (1997) identificaram que mutações deletérias no gene que caracteriza a linhagem celular PD20 seria correspondente ao grupo FA-D, em função da suposta incapacidade desta linhagem complementar a linhagem HSC62, considerada de referência para o grupo FA-D. Contudo, Timmers et al. (2001) concluíram que os genes mutados em HSC62 e em PD20 são diferentes e caracterizam dois grupos distintos de complementação. O primeiro é o FA-D1, cuja linhagem de referência é a HSC62, e o segundo é o FA-D2, que corresponde à linhagem PD20.

Howlett et al. (2002) identificaram a inativação bialélica do gene *BRCA2* em células de pacientes AF do subtipo FA-D1, enquanto pacientes com tumores de ovário e de mama apresentavam mutação monoalélica deste mesmo gene. Esta observação permitiu inferir que o gene *FANCD1* seria o mesmo gene *BRCA2* associados aos tumores. A principal função da proteína BRCA2 é a regulação do reparo do DNA por recombinação homóloga (HR) mediante o controle da recombinase RAD51. A BRCA2 também participa na estabilização das forquilhas de replicação e na regulação da citocinese dentre outras funções (TANIGUCHI e D'ANDREA, 2006).

Pacientes AF com mutações bialélicas em *BRCA2* apresentam um alto risco de desenvolver leucemia aguda durante os cinco primeiros anos de vida. Além disso, os heterozigotos compostos têm elevado risco de desenvolver tumores sólidos. A presença destes tipos de mutações requer um monitoramento mais freqüente que permita intervenções terapêuticas precoces (WAGNER et al., 2004).

#### 2.5.5 Grupo de complementação FA-D2

O gene *FANCD2* identificado por Timmers et al. (2001), por clonagem posicional, foi o primeiro gene da AF que teve um gene homólogo encontrado em não vertebrados. Este gene consiste de 44 exons que codificam uma proteína nuclear de 1451 aminoácidos, a qual apresenta duas isoformas, resultantes de modificações

que ocorrem após a tradução, a FANCD2-S (*short* ou *small*) com 155 kDa e a FANCD2-L (*large* ou *long*) com 162 kDa. A isoforma longa resulta da adição de uma molécula de ubiquitina na lisina 561 (GARCIA-HIGUERA et al., 2001).

A FANCD2 é também fosforilada pela ATM na serina 222. O gene *ATM* codifica esta quinase-proteica que, quando induzida por radiação ionizante, fosforila e ativa proteínas envolvidas nos pontos de checagem do ciclo celular, como a NSB1, a BRCA1 e a FANCD2 (TANIGUCHI et al., 2002; D'ANDREA e GROMPE, 2003).

Dentre as mutações no gene *FANCD2* estão a deleção do exon 17 e a transição de A→G no nucleotídeo 376, a qual resulta na substituição de uma serina por uma glicina no resíduo 126 (TIMMERS et al., 2001).

#### 2.5.6 Grupo de Complementação FA-E

O gene *FANCE* foi identificado pelo método de clonagem por complementação, possui 10 exons que codificam uma proteína com 536 aminoácidos e de localização nuclear. Um estudo realizado por Winter et al. (2000a) identificou três tipos diferentes de mutações em dois pacientes analisados.

Pace et al. (2002) demonstraram que a FANCE é parte do complexo nuclear de proteínas AF e que ela se liga a ambas as proteínas, FANCC e FANCD2. A FANCE é necessária para que a FANCC permaneça no interior do núcleo e ainda estabelece uma ponte entre o complexo principal de proteínas AF e a FANCD2. Devido a sua capacidade de ligar-se a FANCD2, ela tem sido descrita como o fator de recrutamento de substrato do complexo principal da AF (GURTAN e D'ANDREA, 2006).

#### 2.5.7 Grupo de Complementação FA-F

O gene *FANCF* foi identificado por Winter et al. (2000b) por métodos de clonagem e complementação. Foi descoberto que este gene não tem introns e codifica um polipeptídeo homólogo à proteína de ligação ao RNA em procariontes

(ROM), o que sugere que a molécula FANCF pode ter um domínio de ligação a ácidos nucléicos. A FANCF tem uma localização predominantemente nuclear, e parece exercer um papel importante na estabilização das associações entre as demais proteínas que constituem o complexo principal da AF (MEDHURST et al., 2006).

Foram identificadas algumas variantes alélicas do *FANCF* que resultam em ausência de expressão desta proteína; ausência esta que abrange, por exemplo, desde a deleção dos nucleotídeos 230-252 até a mutação 484-485del, que resulta da deleção de somente dois pares de bases, entre outras (WINTER et al., 2000c).

#### 2.5.8 Grupo de Complementação FA-G

Liu et al. (1997) identificaram por complementação funcional que o gene humano *XRCC9* apresentava a capacidade de complementar células mutantes de hamster (linhagem UV40) sensíveis aos agentes indutores de ligações cruzadas do DNA, à radiação ionizante e à radiação UV. No ano seguinte, Winter et al. (1998) comprovaram então que o gene *FANCG* era idêntico ao gene humano *XRCC9* que possivelmente atua no reparo do DNA pós-replicação, ou no controle dos pontos de checagem do ciclo celular.

Postula-se que após a replicação, na saída da fase S do ciclo celular, a *FANCG* possa ser fosforilada por quinases do próprio ciclo celular, e que esta promova a remoção do complexo de proteínas AF que esteve ligado à cromatina, para reparo do DNA, durante a replicação (GURTAN e D'ANDREA, 2006).

O gene *FANCG* é formado por 14 exons que codificam uma proteína de 622 aminoácidos, cujo peso molecular é 68 kDa e os domínios funcionais ainda não são conhecidos. Contudo, sabe-se que *FANCG* é necessária para a ligação entre *FANCA* e *FANCC* e que as três fazem parte do complexo principal de proteínas AF. Sabe-se ainda que *FANCG* pode ter função adicional no processo de reparo do DNA, via uma interação independente com *BRCA2*, que ocorre em resposta a um dano relevante no DNA. Esta interação entre *FANCG* e *BRCA2* demonstra uma ligação direta entre o

mecanismo AF e uma proteína com importante papel no mecanismo de reparo por recombinação homóloga. Um passo importante seria estabelecer a relação entre a monoubiquitinação da FANCD2 e o recrutamento da BRCA2 no reparo de ligações cruzadas do DNA (HUSSAIN et al., 2003).

Auerbach et al. (2003) estudaram a distribuição do gene *FANCG* com base nos registros do IFAR. Foi encontrado que as mutações mais comuns são a IVS8-2 A>G, observada entre brasileiros, IVS11+1G>C em franceses, 1794-1803del10 em europeus e IVS3+1G>C em japoneses e coreanos, o que sugere um possível efeito fundador destas mutações nestes grupos.

#### 2.5.9 Grupo de Complementação FA-H

A única linhagem celular que havia sido definida como FA-H foi redefinida como FA-A. Esta linhagem não havia sido incluída no grupo FA-A, nos estudos de complementação iniciais, porque apresentava uma reversão fenotípica que impossibilitou a detecção da correção por complementaridade na fusão híbrida. Estudos adicionais mostraram que esta linhagem apresentava uma heterozigose composta, com duas novas mutações, uma envolvendo o exon 29 e a outra uma deleção dos exons 17 ao 31 do gene *FANCA* (JOENJE et al., 2000).

Na intenção de evitar as armadilhas da reversão, as futuras inclusões dos pacientes AF em novos grupos de complementação seguirão critérios mais rígidos como: a exclusão de pelo menos dois pacientes de todos os grupos de complementação conhecidos; a falha em complementarem um ao outro no estudo de fusão híbrida, ou ainda, a identificação do novo gene complementar, se uma única linhagem celular estiver disponível (JOENJE et al., 2000).

### 2.5.10 Grupo de Complementação FA-I

Os grupos de complementação FA-I e FA-J foram descritos por Levitus et al. (2004). Nesse estudo, oito pacientes AF não consangüíneos foram excluídos dos subtipos já conhecidos com base em ensaios de complementação. Linhagens celulares de quatro desses oito pacientes não mostraram complementaridade entre si, e passaram a constituir um novo grupo designado FA-I. As outras quatro linhagens complementaram esse grupo, mas não complementaram umas as outras levando à identificação de um segundo novo grupo de complementação denominado FA-J.

Em estudos adicionais ambas as linhagens foram capazes de estabelecer a formação do complexo principal de proteínas AF; porém, em células FA-I a proteína FANCD2 não pode ser monoubiquitinada, indicando um defeito à montante na via AF/BRCA. Até este momento era possível presumir que a FANCI exercia suas funções na monoubiquitinação da FANCD2 de forma indireta, possivelmente a jusante da FANCL e a montante da FANCD2 (LEVITUS et al., 2004; GODTHELP et al., 2006).

Recentemente Smogorzewska et al. (2007) identificaram o gene *FANCI* que está mutado em linhagens de células do grupo FA-I. A região codificadora do gene *FANCI* foi amplificada a partir de uma biblioteca de DNAc de linfócitos humanos e corresponde a uma variante do gene *KIAA1794* localizado no cromossomo 15q25-26. A proteína correspondente tem 1328 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 150 kDa. Estes autores identificaram ainda que o gene *FANCI* (*KIAA1794*) apresenta regiões homólogas com o gene *FANCD2* e que seu produto também é monoubiquitinado. A FANCI liga-se a FANCD2 e ambas as proteínas ubiquitinadas formam um complexo a jusante na via de interação AF/BRCA, necessário para que ocorra o reparo de ligações cruzadas do DNA, especialmente por recombinação homóloga. Estes achados são bastante recentes e requerem mais estudos para a completa elucidação.

### 2.5.11 Grupo de Complementação FA-J

No estudo realizado por Levitus et al. (2004) as células classificadas no grupo FA-J foram capazes de monoubiquitinar a proteína FANCD2. Isso sugere, de acordo com o mecanismo proposto para AF, que o defeito envolvendo este grupo de complementação pode estar localizado a jusante da monoubiquitinação da FANCD2.

A proteína FANCI, codificada pelo gene *BRIP1*, foi descrita como sendo um membro da família das RecQ DEAH helicases. Essas enzimas processam arranjos irregulares do DNA, tais como junções *holliday*, formadas durante a recombinação homóloga, ou as estruturas estendidas a partir de forquilhas de replicação. A FANCI, também denominada BRIP1, é semelhante a uma RecQ helicase que desespiraliza o DNA na direção 5'→3' e pode estar associada com o reparo do DNA. Além disso, estas proteínas têm uma ligação direta com a recombinação homóloga mediante a interação com BRCA1 (LEVITUS et al., 2005).

### 2.5.12 Grupo de Complementação FA-L

Na constante busca de um melhor entendimento do mecanismo de atuação das proteínas AF em resposta aos danos causados ao DNA, um ponto fundamental era que as proteínas envolvidas na monoubiquitinação da FANCD2 não apresentavam um sítio específico com atividade de ubiquitina ligase. Em estudos com linhagens celulares derivadas de pacientes AF foi possível detectar um componente do complexo principal, chamado PHF9 (*PHD finger protein 9*) que possui atividade de E3 ubiquitina ligase. Com esta descoberta concluiu-se que a PHF9 representa um novo grupo de complementação denominado FA-L.

O gene *PHF9*, também chamado *FANCL*, codifica um produto com três potenciais repetições de WD40 e um domínio PHD. As repetições WD40 são conhecidas pela função de mediar interações proteína-proteína e os domínios PHD são variantes de domínios do tipo RING, conhecidos por possuírem atividade E3 ubiquitina ligase. O domínio PHD apresenta padrões de seqüências de aminoácidos



característicos de domínios do tipo *finger* e uma região conservada que codifica um triptofano entre as cisteínas dos resíduos de números seis e sete. Essas características permitem distinguir o PHD dos domínios que não têm atividade ligase. O PHF9 tem este domínio com a região conservada do triptofano que é fundamental para que a E2 (ubiquitina conjugase) seja recrutada e possa ligar-se, sugerindo que PHF9 possa ter atividade ubiquitina ligase e que as repetições WD40 são necessárias para a estabilidade das proteínas do complexo principal (MEETEI et al., 2003; GURTAN et al., 2006).

### 2.5.13 Grupo de Complementação FA-M

A proteína FAAP250 foi identificada como um novo componente do complexo principal de proteínas AF que, quando resultante de uma mutação deletéria, caracteriza o grupo de complementação FA-M e por consequência o gene que codifica a proteína FAAP250 é dito *FANCM*.

A FAAP250 ou FANCM tem seqüências similares às proteínas de reparo do DNA conhecidas como a proteína Hef de arqueobactéria e a proteína ERCC4 humana. A proteína Hef possui atividade helicase e endonuclease e é capaz de remover as forquilhas de tripla hélice de DNA instaladas durante a replicação. A proteína ERCC4 é uma endonuclease essencial para a excisão de nucleotídeos durante o reparo do DNA em humanos. A FAAP250 e a ERCC4 são as únicas proteínas humanas que possuem domínios helicase e endonuclease, sugerindo que elas possam ter um ancestral em comum, possivelmente a proteína Hef das arqueobactérias. A proteína FANCM, também chamada FAAP250, tem o domínio helicase conservado, contudo o domínio endonuclease não é funcional, ao contrário da ERCC4 que manteve a atividade endonuclease e tem seu domínio helicase degenerado. Este achado reforça a possibilidade de uma origem comum destas duas proteínas, cada qual mantendo um dos domínios funcionais da proteína ancestral (MEETEI et al., 2005).

O domínio helicase da FANCM é da família SF2, que usa a energia da hidrólise do ATP para translocar-se sobre o DNA. Esta capacidade da FANCM em deslocar-se sobre a dupla fita de DNA possibilita a dissociação das seqüências de DNA de tripla hélice. A FANCM atua como uma "locomotiva" que transporta o complexo de proteínas AF ao longo do DNA. Supostamente este deslocamento é que permite ao complexo detectar os danos causados ao DNA. Além disso, a FANCM é hiperfosforilada em resposta a estes danos, sugerindo que ela possa atuar na transdução de sinais que regulam a atividade do complexo de proteínas AF (MEETEI et al., 2005).

#### 2.5.14 O Gene FANCN

Foi identificado recentemente um novo grupo de complementação, denominado FA-N. Os indivíduos incluídos neste grupo apresentam a monoubiquitinação da proteína FANCD2 normal, porém não apresentam nenhuma mutação patogênica nos genes *FANCD1/BRCA2* ou *FANCI* (XIA et al., 2007).

O gene candidato para codificar a proteína defeituosa correspondente ao subtipo FA-N é o gene *PALB2*. Seu produto PALB2 foi recentemente identificado como uma proteína que interage com BRCA2 no núcleo. A PALB2 atua a jusante da monoubiquitinação da FANCD2, em associação à BRCA2, promovendo sua localização e estabilidade em estruturas nucleares fundamentais, o que facilita as funções da BRCA2 no reparo do DNA (REID et al., 2007).

Algumas evidências levaram a concluir que a perda da função da PALB2 pode ser uma das causas da AF. No entanto, em análises realizadas em amostras de pacientes, a proteína BRCA2 não apresentou redução em sua quantidade total, mas ela estava deslocada e totalmente ausente do núcleo, conseqüentemente a formação do foco nuclear induzida por RAD51 foi prejudicada nestas células. A introdução de uma seqüência normal da PALB2 em células destes pacientes normaliza a associação da BRCA2 à cromatina, a formação do foco nuclear induzida por RAD51 e

a sensibilidade à MMC. Além destes achados também foram encontradas mutações deletérias no gene *PALB2* destes pacientes (REID et al., 2007; XIA et al., 2007).

De forma semelhante aos pacientes com mutações bialélicas em *BRCA2* (*FANCD1*), a AF causada por mutações em *PALB2* pode representar uma variante extrema desta doença com respeito à complexidade do fenótipo clínico, especialmente em relação ao tempo para o estabelecimento da anemia e ao alto risco de câncer na infância. Uma vez que a *PALB2* é crítica para a atividade de *BRCA2* no reparo do DNA e na supressão de tumores, ela poderia também, em princípio, ser considerada uma proteína supressora de tumores (REID et al., 2007).

Observou-se que familiares de pacientes pertencentes ao grupo FA-N apresentam um risco 2,3 vezes maior de desenvolver tumores, em especial os de mama, quando comparados à população em geral. No entanto, estudos adicionais são necessários para conhecer a influência das mutações do gene *PALB2* no câncer esporádico ou familiar em populações não AF (RAHMAN et al., 2006).

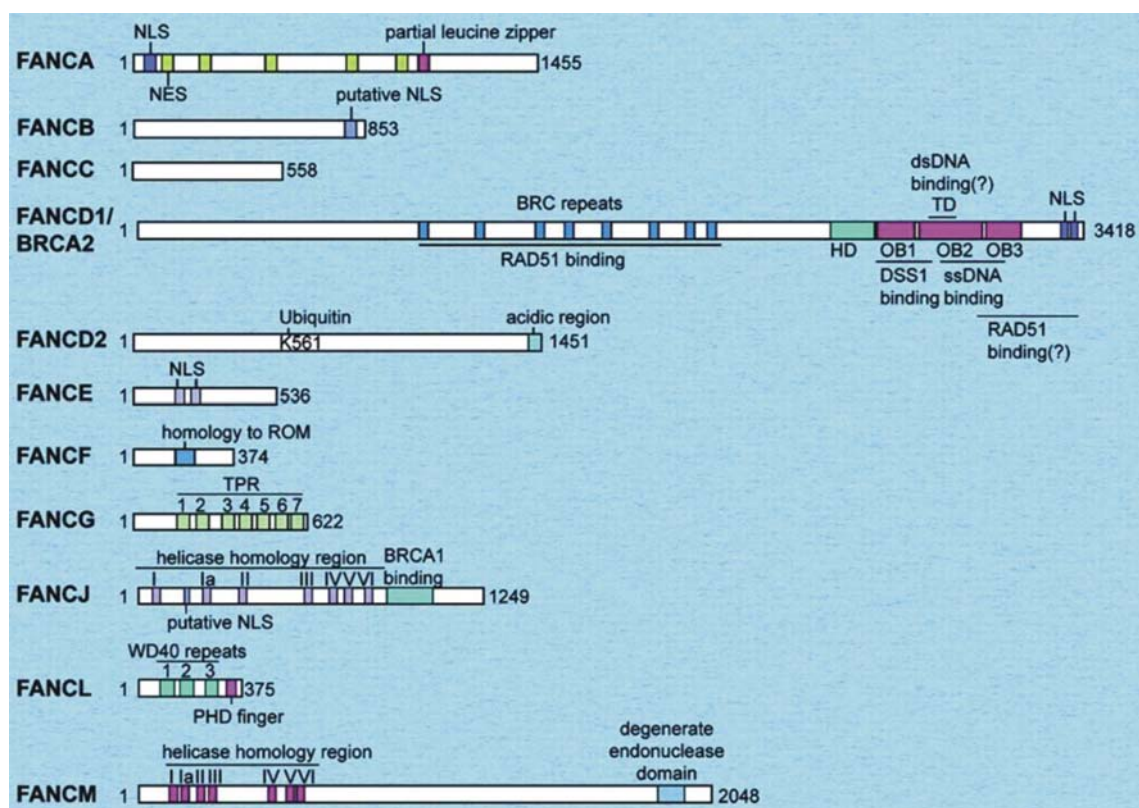
Um resumo de todos os grupos de complementação, bem como os genes correspondentes, sua localização nos cromossomos e o peso molecular de seus produtos estão descritos na tabela 1. A representação esquemática de onze das proteínas AF cujos genes são mais conhecidos encontra-se na figura 1.

TABELA 1 - GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO (SUBTIPOS GENÉTICOS) DA ANEMIA DE FANCONI

| SUBTIPOS DA AF | GENES DA AF                  | LOCALIZAÇÃO NOS CROMOSSOMOS | PRODUTOS DOS GENES AF | pMM DAS PROTEÍNAS AF (kDa) | DOMÍNIOS E FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS AF  |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|--|
| FA-A           | <i>FANCA</i>                 | 16q24.3                     | FANCA                 | 163                        | Formação do complexo principal da AF   |
| FA-B           | <i>FANCB (FAAP95)</i>        | Xp22.31                     | FANCB (FAAP95)        | 95                         | Formação do complexo principal da AF   |
| FA-C           | <i>FANCC</i>                 | 9q22.3                      | FANCC                 | 63                         | Formação do complexo principal da AF<br>Funções citoplasmáticas                      |
| FA-D1          | <i>FANCD1(BRCA2)</i>         | 13q12-13                    | FANCD1/BRCA2          | 380                        | Repetições BRC – recrutamento da RAD51   |
| FA-D2          | <i>FANCD2</i>                | 3p25.3                      | FANCD2                | 155, 162                   | FANCD2 monoubiquitinada – associação a BRCA2, BRCA1 e complexo MRE11                 |
| FA-E           | <i>FANCE</i>                 | 6p21-22                     | FANCE                 | 60                         | Formação do complexo principal da AF Recrutamento da FANCD2                          |
| FA-F           | <i>FANCF</i>                 | 11p15                       | FANCF                 | 42                         | Formação do complexo principal<br>Homologia com ROM - ligação a ácidos nucléicos     |
| FA-G           | <i>FANCG (XRCC9)</i>         | 9p13                        | FANCG                 | 68                         | Formação do complexo principal da AF<br>Remoção do complexo AF após a replicação     |
| FA-I           | <i>FANCI (KIAA1794)</i>      | 15q25-26                    | FANCI                 | 150                        | FANCI monoubiquitinada – associada a FANCD2, forma complexo a jusante na via AF/BRCA |
| FA-J           | <i>FANCJ (BRIP1/ BACH1)</i>  | 17q22 –24                   | FANCJ/BRIP1           | 130                        | Helicase – desespiraliza o DNA no sentido 5'→3'<br>Associação à BRCA1                |
| FA-L           | <i>FANCL (PHF9)</i>          | 2p16.1                      | FANCL/PHF9            | 43                         | Repetições WD40 – estabilização do complexo AF<br>PHD – ubiquitina ligase            |
| FA-M           | <i>FANCM (Hef / FAAP250)</i> | 14q21.3                     | FANCM/FAAP250         | 250                        | Formação do complexo principal AF<br>Helicase, DNA translocase                       |
| FA-N           | <i>FANCN (PALB2)</i>         | 16p12.1                     | FANCN / PALB2         | 140                        | Associação/estabilização da BRCA2  |

FONTE: Adaptado de Gurtan e D'Andrea (2006); Taniguchi e D'Andrea (2006)

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PROTEÍNAS AF



FONTE: Taniguchi e D'Andrea (2006)

NOTA: Esquema do tamanho relativo das proteínas representadas em escala, sendo que a FANCF e a FANCL são as menores e a FANCM e FANCD1/BRCA2 são as maiores. Os domínios funcionais conhecidos das proteínas AF também estão representados, bem como a função enzimática da FANCI (helicase), da FANCM (DNA translocase) e da FANCL (E3 ubiquitina ligase). A FANCD2 e a FANCD1/BRCA2 apresentam sítios de ligação direta ao DNA. NLS = seqüência de localização nuclear; NES = seqüência de exportação nuclear.

## 2.6 INSTABILIDADE GENÔMICA E NEOPLASIAS MALIGNAS

O paciente com anemia de Fanconi apresenta defeitos no reparo do DNA que geram uma grande instabilidade genômica condizente com as anormalidades citogenéticas complexas observadas nos pacientes AF com câncer. A integridade e estabilidade do material genético são constantemente ameaçadas por fatores endógenos e exógenos tais como substâncias químicas mutagênicas e radiação. Para reduzir os efeitos deletérios da exposição a agentes indutores de danos ao DNA, as células dispõem de uma complexa rede de mecanismos de manutenção da sua estabilidade (BOGLIOLO et al., 2002).

Os genes que participam destes processos são membros da família dos genes sentinela (*caretaker-gatekeeper genes*) que incluem os genes envolvidos na

Anemia de Fanconi (AF), no Xeroderma Pigmentoso (XP), na Ataxia Telangiectasia (ATM), o *BRCA1*, o *BRCA2*, entre outros que atuam em diferentes vias de reparo. Mutações em qualquer um destes genes predis põem ao câncer (LEVRAN et al., 1997).

A via de interação das proteínas da anemia de Fanconi é considerada o ponto central entre os mecanismos de manutenção da estabilidade e de supressão de tumores. As proteínas AF desempenham um papel fundamental no reparo do DNA, na estabilidade de telômeros, na regulação da transcrição, na detoxificação de espécies reativas do oxigênio, no controle do ciclo celular e na apoptose (SHIMAMURA, 2006).

Muitos estudos têm sido realizados para demonstrar o importante papel da instabilidade genômica na tumorigênese, especialmente aqueles que envolvem as vias de interação das proteínas AF. O entendimento do papel dessas proteínas é de fundamental importância não apenas para encontrar uma possibilidade real de cura para estes pacientes, mas também para o entendimento de outras doenças, uma vez que defeitos na interação destas proteínas levam à instabilidade do material genético e conseqüentemente às neoplasias malignas (BOGLIOLO et al., 2002; SHIMAMURA, 2006).

## 2.7 REPARO DO DNA

Os danos causados ao DNA, por agentes genotóxicos como, a radiação ionizante ou agentes indutores de ligação cruzada e também durante o processo normal da replicação do DNA, requerem o estabelecimento de sistemas de vigilância e defesa a fim de reparar os danos e evitar o estabelecimento de mutações (SOBECK et al., 2006).

Primeiramente a célula ativa mecanismos de checagem de ponto que prolongam as fases do ciclo celular, fornecendo tempo para que o DNA seja reparado. A seguir são acionados mecanismos de reparo do DNA que corrigem quebras na dupla fita. Os agentes genotóxicos ativam um grande número de genes de pontos de

checagem e de reparo do DNA e os produtos destes genes cooperam em uma complexa rede de sinalização intracelular (GREGORY, TANIGUCHI e D'ANDREA, 2003).

As ligações cruzadas intercadeias estão entre as lesões mais tóxicas causadas ao DNA porque impedem a separação das duplas fitas prejudicando a replicação e a transcrição. O papel preciso das proteínas AF na resposta às ligações cruzadas ainda não é conhecido, mas sabe-se que ocorre um atraso na fase S do ciclo celular, fase na qual o mecanismo AF/BRCA é ativado pela monoubiquitinação da proteína FANCD2 (GODTHELP et al., 2006).

Diversos mecanismos são propostos para explicar o papel das proteínas AF no reparo do DNA durante a fase S como: a recombinação intracromossomal, a junção de terminações não homólogas (NHEJ), a excisão de nucleotídeos e a recombinação homóloga. Os mais relevantes destes mecanismos serão considerados a seguir (D'ANDREA e GROMPE, 2003; RISINGER e GRODEN, 2004).

### 2.7.1 Recombinação Homóloga

A recombinação homóloga (HR) acontece em todos os organismos e pode ocorrer entre quaisquer duas moléculas de DNA de dupla fita com regiões de seqüência de nucleotídeos similares, não necessariamente idênticas, podendo gerar moléculas de DNA com novas seqüências nucleotídicas. Este mecanismo ainda não foi completamente entendido, porém, com base em estudos realizados em bactérias, várias etapas puderam ser descritas (ALBERTS et al., 1999). A figura 2 ilustra algumas das etapas conhecidas da HR.

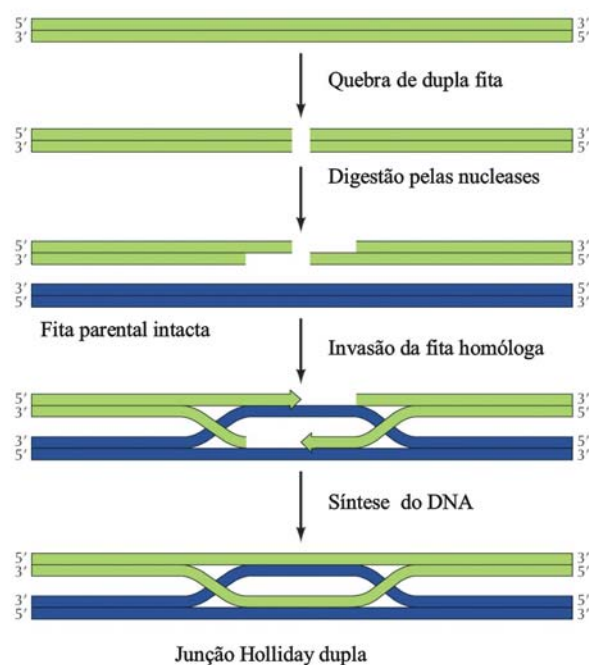
A HR é um processo de reparo do DNA livre de erros porque a seqüência nucleotídica não é alterada no sítio de troca. Os eventos de troca e religamento ocorrem de maneira precisa, sendo que nenhum nucleotídeo é perdido ou ganho durante a recombinação (D'ANDREA e GROMPE, 2003).

Este mecanismo é de grande importância no reparo de quebras de dupla fita e de outros tipos de danos causados ao DNA. A molécula central no mecanismo de

recombinação homóloga é a proteína RAD51 que forma filamentos de nucleoproteína no DNA e promove a troca entre seqüências homólogas (GODTHELP et al., 2006).

Os focos de reparo são estabelecidos no local onde o DNA foi danificado e provavelmente representam centros localizados de reparo destas lesões. Muitas proteínas estão envolvidas no mecanismo de HR como a BRCA2/FANCD1, que se liga diretamente a RAD51. Dentre outras, que participam de maneira direta ou indireta, estão a RAD52, a RAD54, a proteína de replicação A (RPA) e a BRCA1 (NAKANISHI et al., 2005; GODTHELP et al., 2006).

FIGURA 2 - RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA



THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.32 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

FONTE: Adaptado de Cooper e Hausman (2006)

NOTA: Duas moléculas de DNA de dupla fita que apresentam regiões semelhantes se alinham, suas seqüências homólogas ficam pareadas e ocorre a permuta genética (*cross over*), reação na qual ambas as fitas das duplas hélices são quebradas e as pontas quebradas são unidas às da molécula de DNA oposta, formando duas hélices duplas intactas. As incisões nas fitas de DNA são seladas para que a recombinação ocorra e as duas moléculas de DNA ficam ligadas fisicamente. Este passo é conhecido como "troca de fitas cruzadas ou junção *holliday*". Para a regeneração de duas moléculas independentes de DNA, as junções precisam ser quebradas e as duas fitas cruzadas separadas por enzimas de recombinação.



### 2.7.2 Junção de Terminações Não Homólogas (NHEJ)

É um mecanismo muito simples e direto de reparo de ligações cruzadas do DNA que envolve o corte e a ligação dos fragmentos. É considerado um mecanismo com tendência a erros porque as terminações livres são religadas sem o uso de um molde, e, conseqüentemente alguns nucleotídeos podem ser perdidos ou translocados. Em geral, o processo tem início com a quebra de duas duplas fitas e o religamento das cromátides a cada lado das ligações cruzadas intercadeias, causando uma pequena deleção. As células de pacientes AF apresentam defeitos neste tipo de reparo de junções não homólogas, sendo observados um maior número e maiores deleções, quando comparado a células normais (D'ANDREA e GROMPE, 2003).

### 2.7.3 Ubiquitinação

Uma característica importante da resposta aos danos do DNA é o direcionamento das proteínas envolvidas nos processos de checagem de ponto e reparo para o foco intranuclear. Estes focos são sítios de retardamento para replicação e (ou) reparo do DNA. Recentes estudos indicam que o direcionamento das proteínas para o foco de reparo do DNA requer modificações pós-translacionais como a adição de uma molécula de ubiquitina (monoubiquitinação). Uma vez que estas proteínas marcadas atingem o foco nuclear, ocorre a transdução de sinais que levam ao prolongamento do ciclo celular para a replicação e (ou) reparo de danos do DNA. Falhas no direcionamento destas proteínas para o foco de reparo do DNA resultam em acúmulo de material danificado, instabilidade do genoma e em câncer (GREGORY, TANIGUCHI e D'ANDREA, 2003).

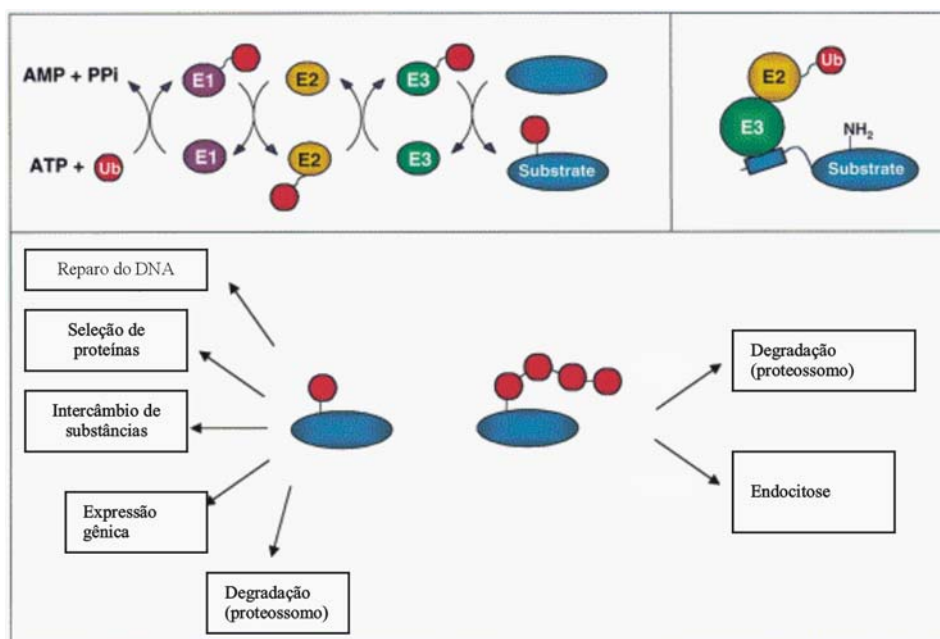
A ubiquitinação é a ligação de moléculas de ubiquitina a um substrato alvo que pode ter muitas funções, tendo sido primeiramente descrita pelo seu envolvimento no processo de degradação mediada pelos proteossomos, geralmente associados a uma poliubiquitinação. Hoje já se sabe que a ubiquitinação é necessária para regular

uma variedade de processos que incluem o intercâmbio de substâncias na célula, a expressão gênica, a seleção protéica, a endocitose e o reparo do DNA.

O processo de ubiquitinação é conduzido por uma cascata de três enzimas: E1, E2, E3. A enzima E1 ativa uma molécula de ubiquitina através da hidrólise de ATP e depois transfere, por meio de uma ligação tioéster, esta molécula de ubiquitina para uma enzima E2 que tem atividade de ubiquitina conjugase. A enzima E3 tem atividade de ubiquitina ligase e é capaz de intermediar a transferência da molécula de ubiquitina para o substrato, além de conferir especificidade a esta ligação (figura 3). Existem classes distintas de enzima E3, cada qual com um mecanismo diferente de transferência da ubiquitina. Uma E3 com domínio HECT une-se a ubiquitina via uma ligação tioéster e depois transfere a molécula diretamente para o substrato. A classe RING-E3 ligase une-se simultaneamente a E2 e ao substrato permitindo a transferência direta da ubiquitina da E2 para o substrato. Neste caso a ligação E3/E2 é intermediada pelo domínio RING, enquanto a interação E3/substrato é mediada por um domínio diferente que faz o reconhecimento do substrato e que varia de acordo com cada ligase envolvida (PICKART, 2001; GURTAN et al., 2006).

No mecanismo proposto para interação das proteínas AF, a FANCL desempenha a função de E3 ubiquitina ligase. O domínio PHD da FANCL é do tipo RING, recruta e interage com o componente E2 (referido como FA-E2, porém ainda não completamente identificado) que interage com o domínio PHD da FANCL. Uma interação direta da FANCL com FANCD2 parece não ocorrer, todavia a FANCE tem sido apontada como fator de recrutamento do substrato (FANCD2) que intermedeia a sua ligação com a E3 ligase (FANCL) (GURTAN e D'ANDREA, 2006; GURTAN et al., 2006).

FIGURA 3 - UBIQUITINAÇÃO MEDIADA POR E1, E2 E E3 CONFERE ESPECIFICIDADE E ATIVA DIFERENTES PROCESSOS



FONTE: Adaptado de Pickart (2001)

NOTA: **Acima e a esquerda** - Ubiquitinação - cascata de reação das enzimas: E1, E2, E3. A enzima E1 ativa a molécula de ubiquitina através da hidrólise de ATP e transfere (ligação tioéster) esta molécula para uma enzima E2 (ubiquitina conjugase). A E3 (ubiquitina ligase) transfere a ubiquitina para o substrato correspondente. **Acima e a direita** - Especificidade da conjugação: a E3 liga-se ao substrato correspondente e a E2 específica por meio de diferentes sítios. O substrato é reconhecido pela E3 por meio de um sinal de ubiquitinação (retângulo azul). **Abaixo** - Funções da ubiquitina. **Esquerda** - algumas das funções da monoubiquitinação. **Direita** - algumas das funções conhecidas das cadeias de poliubiquitinação.

## 2.8 BASES MOLECULARES DA ANEMIA DE FANCONI

Investigações a respeito da patogênese molecular subjacente à anemia de Fanconi apontam na sua maioria para o defeito que estas células apresentam nos processos de reparo do DNA. Apesar de as funções exatas das proteínas AF ainda não serem totalmente conhecidas, um modelo molecular denominado AF/BRCA tem sido proposto (WANG e D'ANDREA, 2004).

Nesse modelo, um grupo de proteínas AF interage e constitui um complexo nuclear necessário para a ativação do seu alvo, a proteína central do mecanismo, a FANCD2. Esta proteína é monoubiquitinada durante a fase S do ciclo celular em resposta a vários tipos de danos causados ao DNA, incluindo ligações cruzadas intercadeias, quebras de dupla fita e formação de forquilhas de replicação (SOBECK et al., 2006).

A monoubiquitinação da FANCD2 é necessária para que esta se associe à cromatina e à proteína BRCA1 que atua na translocação da FANCD2 monoubiquitinada para o foco de reparo do DNA. Neste local atuam também outras proteínas reparadoras como BRCA2/FANCD1, FANCN, RAD51, MRE11-RAD50-NBS1, proteína de replicação A (RPA) e outras (WANG e D'ANDREA, 2004).

FANCD2 é também fosforilada em resposta a diferentes tipos de danos ao DNA, em especial as quebras de dupla fita induzida por radiação ionizante (IR). Supõe-se que a fosforilação da FANCD2 é parte de um mecanismo controlado por uma das quinases de pontos de checagem do ciclo celular, mais especificamente ATM (Ataxia Telangiectasia Mutadas). A ATM é uma quinase-proteica ativada por radiação ionizante que fosforila e ativa proteínas envolvidas nos pontos de checagem da fase S, incluindo a p53, a NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome*) e a BRCA1 (TANIGUCHI et al., 2002; D'ANDREA e GROMPE, 2003).

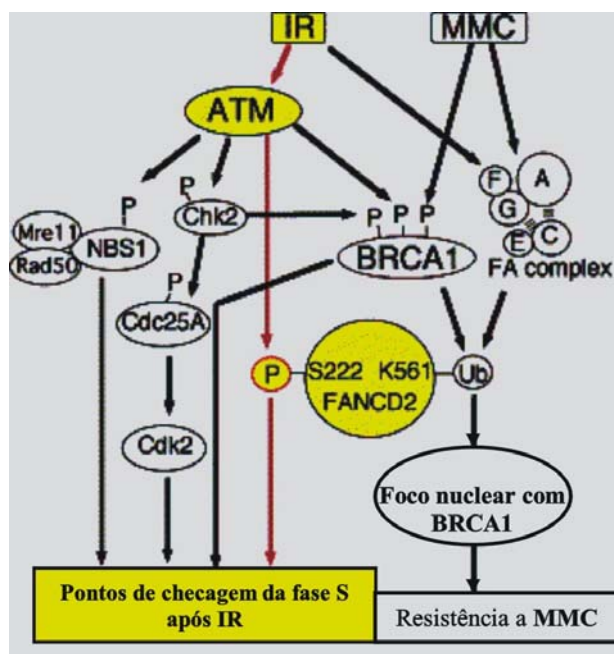
Ainda não está completamente estabelecido o mecanismo pelo qual a ATM quinase fosforila a FANCD2, mas existem alguns modelos possíveis nos quais algumas proteínas como NSB1 e BRCA1 são inicialmente fosforiladas pela ATM. A NSB1 fosforilada une-se à MRE11 e à RAD50 e assim ativadas induzem a fosforilação da FANCD2 na serina 222, formando um complexo de proteínas de checagem de ponto. Este complexo poderia então atuar como um sensor de danos causados ao DNA e inibir a replicação do DNA danificado por radiação ionizante (WANG e D'ANDREA, 2004; RISINGER e GRODEN, 2004).

NBS1 e o complexo MRE11/RAD50 também estão presentes no foco nuclear de reparo do DNA, associando-se a FANCD2 monoubiquitinada em resposta a agentes indutores de ligações cruzadas do DNA. Isto indica que a NSB1 está na interseção de dois mecanismos de ativação e interage com FANCD2 em cada um deles (TANIGUCHI et al., 2002; D'ANDREA e GROMPE, 2003).

É recorrente na literatura que a proteína FANCD2 parece estar envolvida em duas diferentes funções (figura 4); a) em resposta a danos causados ao DNA por ligações cruzadas, a FANCD2 é monoubiquitinada na lisina K561, levando a sua

interação com BRCA2 na cromatina e atuando no reparo do DNA; b) e em resposta à radiação ionizante, a FANCD2 é fosforilada pela ATM na Serina 222, levando à ativação de pontos de checagem da fase S do ciclo celular (WANG e D'ANDREA, 2004).

FIGURA 4 - ASSOCIAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF COM ATM E BRCA EM RESPOSTA À RADIAÇÃO IONIZANTE E MMC (MITOMICINA C)



FONTE: Adaptado de Gregory, Taniguchi e D'Andrea (2003)

NOTA: A FANCD2 atua na interseção de duas vias de sinalização. A radiação ionizante (IR) ativa ATM e resulta na fosforilação da FANCD2 (na serina 222) e de diversas outras proteínas que cooperam na resposta aos pontos de checagem do ciclo celular. Além disso, MMC ativa a formação do complexo de proteínas AF e a consequente monoubiquitinação da FANCD2 que em associação a BRCA1 e outras proteínas atuam no reparo do DNA. Mutações em FANCD2 resultam em sensibilidade a IR e a MMC e em características clínicas e celulares observadas na AF e AT (Ataxia Telangiectasia).

Alterações na proteína FANCD2 em decorrência de mutações no gene correspondente, assim como mutações em qualquer um dos genes codificadores das proteínas formadoras do complexo AF (*FANCA, B, C, E, F, G, L e M*), impedem a monoubiquitinação da proteína FANCD2 e consequentemente prejudicam o sistema de reparo dos danos causados ao DNA, que ocorrem espontaneamente durante o processo de replicação ou por indução exógena. Defeitos no reparo do DNA geram

muitas das características fenotípicas observadas na AF, tais como: sensibilidade aumentada a agentes de ligações cruzadas do DNA, ao oxigênio e à radiação ionizante; prolongamento das fases S e G2 do ciclo celular; superprodução de  $TNF\alpha$  entre outras (D'ANDREA e GROMPE, 2003).

### 2.8.1 Formação do Complexo

O modelo proposto para o mecanismo AF/BRCA tem início com a formação do complexo nuclear, chamado complexo principal de proteínas AF, que na presença de ligações cruzadas do DNA é ativado mediante fosforilação pela ATR quinase em suas múltiplas subunidades. O complexo principal da AF parece ser parte de um complexo maior chamado BRAFT composto por BLM, RPA, AF e Topoisomerase  $\alpha$  III (TANIGUCHI e D'ANDREA, 2006).

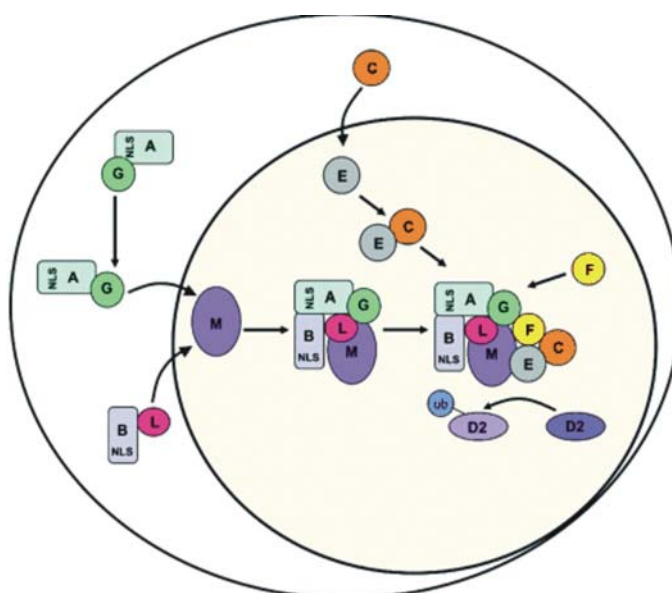
O complexo principal da AF possui oito proteínas conhecidas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM), sendo que mutações nos genes que as codificam caracterizam oito grupos de complementação da AF distintos. Uma nona subunidade dita "proteína 100 associada à AF" (FAAP100) foi identificada bioquimicamente, porém nenhum paciente com alterações nesta proteína foi observado até o presente. O complexo é possivelmente formado por múltiplas subunidades com função de ubiquitina ligase, responsáveis pela monoubiquitinação da FANCD2 (GURTAN e D'ANDREA, 2006).

Já se sabe que alguns membros do complexo principal AF apresentam domínios de interação proteína-proteína, necessários para a sua estabilidade, bem como para sua localização nuclear. Estas interações levam à formação de subcomplexos de proteínas que podem ter funções específicas no mecanismo AF/BRCA. Contudo, muito pouco se sabe sobre a ordem com que a associação entre as proteínas ocorre na cascata de eventos do mecanismo (GURTAN e D'ANDREA, 2006).

Em um recente estudo realizado por Medhurst et al. (2006), está proposto um modelo para a associação entre as proteínas AF que tem início no citoplasma com a formação dos dois primeiros subcomplexos FANCA/FANCG e FANCB/FANCL.

Ambos são importados para dentro do núcleo de modo independente e formam um complexo em torno da FANCM. A proteína FANCG exerce a função de estabilizar a ligação entre FANCA e FANCL unindo os dois subcomplexos. De forma independente, FANCC associa-se com FANCE no interior do núcleo e estabelece um novo subcomplexo. O complexo principal se completa com a união entre FANCC/FANCE e os subcomplexos já reunidos em torno de FANCM. A última proteína a ligar-se é FANCF, que parece ter a função de estabilizar a associação das proteínas que agora constituem o complexo principal de proteínas AF. O complexo assim formado permite a associação da E3 ubiquitina ligase (FANCL) ao seu substrato, a FANCD2 (figura 5).

FIGURA 5 - MODELO PARA FORMAÇÃO DO COMPLEXO PRINCIPAL DA AF



FONTE: Medhurst et al. (2006)

NOTA: O modelo proposto para a associação entre as proteínas AF que tem início no citoplasma com a formação dos dois primeiros subcomplexos FANCA/FANCG e FANCB/FANCL. Ambos são importados para dentro do núcleo de modo independente e formam um complexo em torno da FANCM. A proteína FANCG exerce a função de estabilizar a ligação entre FANCA e FANCL unindo os dois subcomplexos. De forma independente, FANCC associa-se com FANCE no interior do núcleo e estabelece um novo subcomplexo. O complexo principal se completa com a união entre FANCC/FANCE e os subcomplexos já reunidos em torno de FANCM. A última proteína a ligar-se é FANCF, que parece ter a função de estabilizar a associação das proteínas que agora constituem o complexo principal de proteínas AF. O complexo assim formado permite a associação da E3 ubiquitina ligase (FANCL) ao seu substrato, a FANCD2.

Muitas das proteínas AF já têm sua função definida na via de interação AF/BRCA (item 2.5). A FANCL possui repetições WD40 necessárias para interação com as outras subunidades do complexo e o domínio PHD que representa a subunidade catalítica E3 ligase do complexo principal. A FANCE atua como fator de recrutamento da FANCD2. A FANCM tem um papel definido como uma DNA helicase pela sua capacidade de translocar-se sobre a dupla fita de DNA em busca de arranjos irregulares (GURTAN e D'ANDREA, 2006; GURTAN et al., 2006; MEETEI et al., 2005).

A necessidade de diferentes proteínas associadas para estabelecer o complexo principal de proteínas AF indica a complexidade dos processos que envolvem o reparo de ligações cruzadas do DNA.

### 2.8.2 Monoubiquitinação da FANCD2 e Ações a Jusante do Complexo Principal

A maioria das proteínas da AF atua no processo de reparo do DNA a montante da monoubiquitinação da proteína FANCD2. Como já descrito anteriormente, oito delas participam da formação do Complexo Principal (FANCA, B, C, E, F, G, L, M). A proteína FANCI, possivelmente, exerce suas funções entre o complexo de proteínas AF e a monoubiquitinação da FANCD2 (GODTHELP et al., 2006).

As proteínas FANCD1/BRCA2, FANCI e FANCN são as únicas conhecidas até o momento que atuam a jusante da proteína central FANCD2, pois pacientes pertencentes a estes grupos de complementação são capazes de monoubiquitar a FANCD2. Elas são partes integrantes do mecanismo AF/BRCA, atuando em conjunto com a FANCD2 monoubiquitinada e outras proteínas reparadoras do DNA, em especial RAD51, conectando o mecanismo AF/BRCA diretamente ao processo de recombinação homóloga (LEVITUS et al., 2005; GODTHELP et al., 2006).

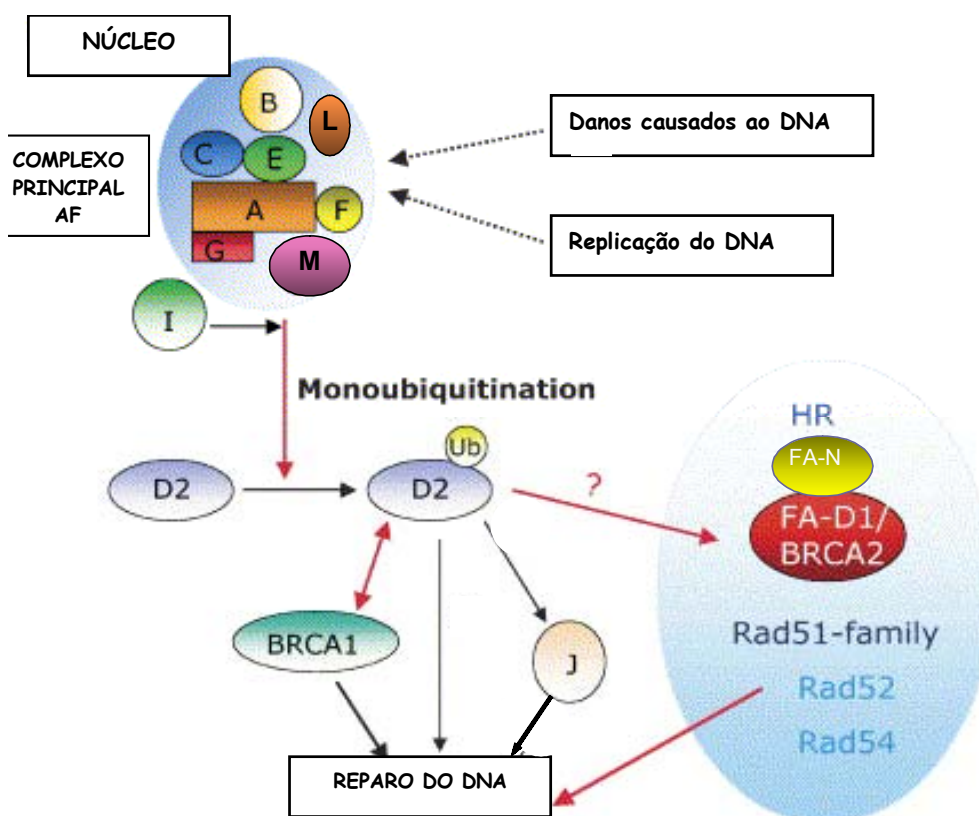
O complexo principal uma vez estabelecido induz à monoubiquitinação da proteína central FANCD2, que passa da isoforma curta, FANCD2-S, para a longa designada de FANCD2-L. A monoubiquitinação da FANCD2 é altamente regulada, sendo que falhas na formação do complexo de proteínas AF impede a monoubiquitinação.



A interação da FANCD2 monoubiquitinada com BRCA2 na cromatina sugere que o mecanismo AF/BRCA pode funcionar na modulação da atividade da BRCA2 no reparo do DNA (figura 6) (WANG e D'ANDREA, 2004; GODTHEL et al., 2006).

A proteína FANCN atua na localização e estabilização da BRCA2 no núcleo. Defeitos na proteína FANCN impedem a formação do foco nuclear induzido por RAD51 (REID et al., 2007).

FIGURA 6 - INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF NO MECANISMO DE REPARO DO DNA

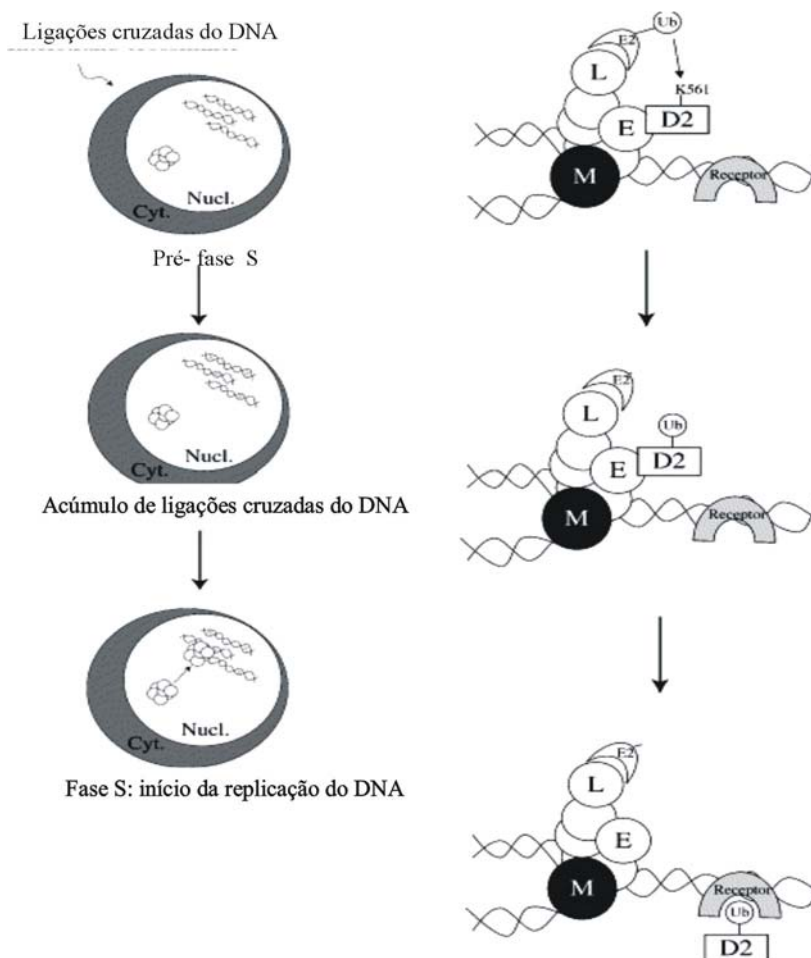


FONTE: Adaptado de Godthel et al. (2006)

NOTA: Em resposta aos danos causados ao DNA ou durante a replicação do DNA o complexo principal de proteínas AF (FANCA, B, C, E, F, G, L, M) é ativado, resultando na monoubiquitinação da FANCD2. A FANCD2 monoubiquitinada desloca-se para o foco de reparo e interage com BRCA1 e Rad51. A FANCI aparentemente atua entre a formação do complexo principal e a FANCD2 enquanto a FANCD1/BRCA2, a FANCN e a FANCI atuam a jusante da FANCD2. A BRCA2 atua no reparo homólogo (HR) em associação a Rad51; Ub = ubiquitina.

Gurtan e D'Andrea (2006) apresentaram na figura 7 um resumo da interação das proteínas AF em resposta aos danos causados por ligações cruzadas do DNA que ocorre durante a fase S do ciclo celular.

FIGURA 7 - MODELO DE ATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF NO REPARO DE LIGAÇÕES CRUZADAS INTERCADEIAS DO DNA



FONTE: Adaptado de Gurtan e D'Andrea. (2006)

NOTA: Com o início da replicação, o complexo principal se forma e liga-se à cromatina por meio do domínio helicase da FANCD1. Quando a maquinaria de replicação encontra uma ligação cruzada, a forquilha de replicação é paralisada e o complexo principal e a proteína FANCD2 são fosforilados por quinases, potencialmente ATM. Neste ponto a proteína FANCD1 liga-se ao substrato (FANCD2), ao mesmo tempo em que a subunidade E3 ligase (FANCD1) recruta uma E2 para o complexo e monoubiquitina a FANCD2. A FANCD2 modificada é retida na cromatina, pela ligação a um receptor para ubiquitina e interage com outras proteínas reparadoras como BRCA1, FANCD1/BRCA2 (estabilizada por FANCD1) e o complexo MRN. A replicação seguida de reparo continua até que todo o genoma tenha sido replicado. Na saída da fase S a proteína FANCD1 é fosforilada por quinases do ciclo celular, o que resulta no desligamento do complexo da cromatina.

## 2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA DE FANCONI

A presença de características clínicas clássicas contribuem para o diagnóstico. Contudo, a anemia de Fanconi pode ocorrer sem defeitos congênitos e até mesmo manifestar-se somente na idade adulta. Níveis aumentados de hemoglobina fetal e

macrocitose são comumente observados, mas a ausência destes achados não exclui o diagnóstico (BAGBY e ALTER, 2006).

Possivelmente a melhor alternativa para estes casos seria considerar a hipótese deste diagnóstico em todas as crianças e adultos jovens com hipoplasia ou anemia aplástica ou citopenia, macrocitose sem causa conhecida, síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia mielóide aguda (LMA) e anormalidades físicas características. Estes pacientes devem submeter-se aos testes de diagnóstico laboratorial, que possam confirmar ou descartar o diagnóstico da AF (BAGBY et al., 2004).

### 2.9.1 Testes de Quebras Cromossômicas

O método padrão para o diagnóstico da AF é o teste de quebras cromossômicas que foi desenvolvido por Auerbach, Adler e Chaganti (1981) com base na hipersensibilidade das células de AF ao efeito antiproliferativo e indutor de quebras cromossômicas dos agentes de ligações cruzadas do DNA, tais como mitomicina C (MMC) e diepoxibutano (DEB).

A MMC parece apresentar uma menor especificidade uma vez que induz a formação de monoadductos em maior proporção do que ligações cruzadas nos processos que geram quebras cromossômicas. Sabendo-se que células AF têm sensibilidade à indução de ligações cruzadas, a especificidade deste reagente parece ficar prejudicada (AUERBACH, 1993).

Os testes de sensibilidade ao DEB ou à MMC são métodos citogenéticos que consistem em um cultivo de células, usualmente linfócitos do sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou fibroblastos da pele na presença de baixas doses de DEB ou MMC. Após o cultivo, é feita a quantificação de quebras cromossômicas ocorridas nas células AF, incluindo formações radiais que são características desta doença. Os resultados são apresentados em número de aberrações por células assim como em porcentagem de células com aberrações (AUERBACH, 1993). Estes testes apresentam uma alta sensibilidade, alta especificidade e tem boa

reprodutibilidade. Porém, são bastante laboriosos, consomem muito tempo e requerem uma equipe altamente especializada (SHIMAMURA et al., 2002; NAKANISHI et al., 2002).

### 2.9.2 *Western Blot* para FANCD2

O método de *Western Blot* descrito por Shimamura et al. (2002) permite a detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 com linfócitos do sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina em cultura primária. A ausência da isoforma monoubiquitinada da proteína FANCD2 (FANCD2-L) em decorrência de alterações nas proteínas formadoras do complexo principal da AF (FANCA, B, C, E, F, G, L e M) ou na própria proteína FANCD2, leva a uma falha no mecanismo de reparo do DNA e conseqüentemente à expressão fenotípica de muitas das características observadas na AF.

Em outras doenças hereditárias com falha da função da medula óssea e (ou) síndromes de instabilidade cromossômica, a monoubiquitinação da FANCD2 está preservada e a isoforma FANCD2L é normalmente expressa nestes pacientes quando realizado o teste de *Western Blot*. A ausência da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 correlaciona-se com o diagnóstico de AF por ser uma característica específica desta doença (GARCIA-HIGUERA et al., 2001; SHIMAMURA et al., 2002).

Esse novo teste, segundo estudos apresentados por Soulier et al. (2005), quando associado à clínica do paciente e aos testes de quebras cromossômicas, permite uma melhor caracterização dos pacientes AF. Também facilita a detecção da reversão somática no sangue periférico e a definição dos casos de mosaïcismo pela análise de fibroblastos da pele. Contudo, esse método ainda é utilizado somente em nível de pesquisa.

O *Western Blot* para FANCD2 foi também proposto como um método de triagem para o estudo de grupos de complementação ou subtipos genéticos da AF. A identificação específica das alterações ocorridas na seqüência do DNA de um paciente AF, partindo-se somente do seu diagnóstico baseado em teste de quebras

cromossômicas, requer o sequenciamento completo do genoma ou a pesquisa de mutações por DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) que são metodologias de alto custo, consomem muito tempo e estão disponíveis somente em centros especializados (BAGBY e ALTER, 2006).

Em pacientes com clínica de AF, o teste de quebras cromossômicas positivo e o emprego do *Western blot* para FANCD2 possibilitam identificar que etapa da via de interação das proteínas AF/BRCA se encontra alterada (SHIMAMURA et al., 2002; BAGBY e ALTER, 2006).

### 2.9.3 Ensaios de Complementação/Subtipificação

Os métodos atualmente empregados na determinação dos grupos de complementação ou subtipos genéticos utilizam linfócitos do sangue periférico, linhagens EBV ou fibroblastos da pele. As células são transduzidas com vetores retrovirais que expressam diferentes seqüências de DNAC normais, uma para cada grupo de complementação conhecido, as quais complementam a deficiência genética apresentada pela célula em estudo (PULSIPHER et al., 1998).

O método de *Western Blot* pode ser utilizado para detectar a correção da mutação do gene defeituoso pelo DNAC transduzido. O processo de transdução restabelece a capacidade de monoubiquitinação da proteína FANCD2, que é detectada no *Western Blot*, permitindo desta maneira uma subtipificação mais precisa da AF do que com o uso de testes para detectar a normalização do número de quebras cromossômicas (SHIMAMURA et al., 2002).

A subtipificação em grupos que correspondem à deficiência genética que cada paciente apresenta é ainda hoje uma metodologia complexa para uso na rotina clínica. Estão sendo produzidos anticorpos monoclonais dirigidos contra as proteínas dos diferentes subtipos da AF e o método de *Western Blot* poderá ser uma alternativa para o uso destes monoclonais na pré-classificação dos pacientes com diagnóstico de AF.

#### 2.9.4 Citometria de Fluxo

Um outro método diagnóstico sugerido por Seyschab et al. (1993) é a detecção do prolongamento da fase G2 do ciclo celular. Neste teste, fibroblastos da pele ou linfócitos do sangue periférico são expostos à MMC e analisados por citometria de fluxo a fim de detectar a porcentagem de células presentes na fase G2 do ciclo celular. Um grande número de células na fase G2 leva à suspeita de diagnóstico de AF, entretanto a presença de leucemias pode interferir no resultado.

#### 2.9.5 Pesquisa de Mutações

A identificação de mutações específicas na AF é bastante complexa em função do grande número de genes associados a esta doença, além dos diferentes tipos de mutações encontrados em cada um deles. Essa investigação pode requerer métodos simples como a amplificação pela PCR (reação em cadeia da polimerase), mas, em geral são necessários métodos de maior complexidade como seqüenciamento do DNA, SSCP, detecção de grandes deleções por técnicas de MLPA (*multiplex ligation probe amplification*), DHPLC e outros.

Os estudos referentes à pesquisa de mutações devem ser tomados com muita cautela não só pelo elevado custo e complexidade dos procedimentos, mas também pelas limitações dos experimentos utilizados (SHIMAMURA, 2006). Novos genes candidatos ainda estão sendo investigados e a detecção de uma alteração na seqüência de DNA de um paciente, sem a confirmação por meio de testes funcionais, pode significar simplesmente a presença de uma variante alélica rara. Além disso, a ausência de mutações nos genes já conhecidos não exclui o diagnóstico da AF nos pacientes com características clínicas bem definidas.

Levando-se em conta o fato de que 65 a 70% dos casos de AF são em decorrência de mutações no gene *FANCA* e que em torno de 40 % das mutações deste gene são grandes deleções, Joenje, Pals e Zwaan (2004) propuseram uma estratégia

para o diagnóstico molecular desta doença. Todavia, dependendo das circunstâncias a estratégia pode diferir em cada caso:

1. Se existirem informações sobre a origem ancestral do paciente um teste direto para pesquisa de mutações relativamente comuns na sua população de origem deve ser realizado porque pode facilitar a precisa classificação deste paciente.
2. Na ausência de qualquer indício uma triagem sistemática das mutações deve ser iniciada pela pesquisa de deleções em *FANCA*, utilizando-se métodos como MLPA.
3. Se negativo no MLPA, recomenda-se a técnica de DHPLC seguida do sequenciamento direto dos fragmentos aberrantes para a triagem de mutações em *FANCA*, *C*, *E*, *F*, *G* simultaneamente e posteriormente genes correspondentes a grupos mais raros devem ser pesquisados com *FANCI*, *J*, *L* e *M*. Pequenas variações de seqüências como microdeleções e microinserções devem ser testadas quanto à patogenicidade em ensaios de complementação.
4. Se os resultados ainda forem negativos, o gene *FANCD2* deve ser seqüenciado em nível do DNA complementar (DNAc) devido aos pseudogenes que complicam a interpretação das seqüências obtidas. De maneira semelhante, pequenas alterações nas seqüências devem ser testadas quanto à patogenicidade em testes de complementação.
5. Se persistir negativo, os gene *BRCA2* e *FANCN* devem ser pesquisados por desnaturação e eletroforese em gel de gradiente (DGGE) e por sequenciamento. Da mesma forma, pequenas alterações devem ser testadas quanto à patogenicidade em testes de complementação.

Joenje, Pals e Zwaan (2004) sugerem ainda que se os resultados finais forem inconclusivos as células devem ser testadas quanto a sua capacidade de monoubiquitinar a proteína *FANCD2*, pois, se negativo, possivelmente este paciente

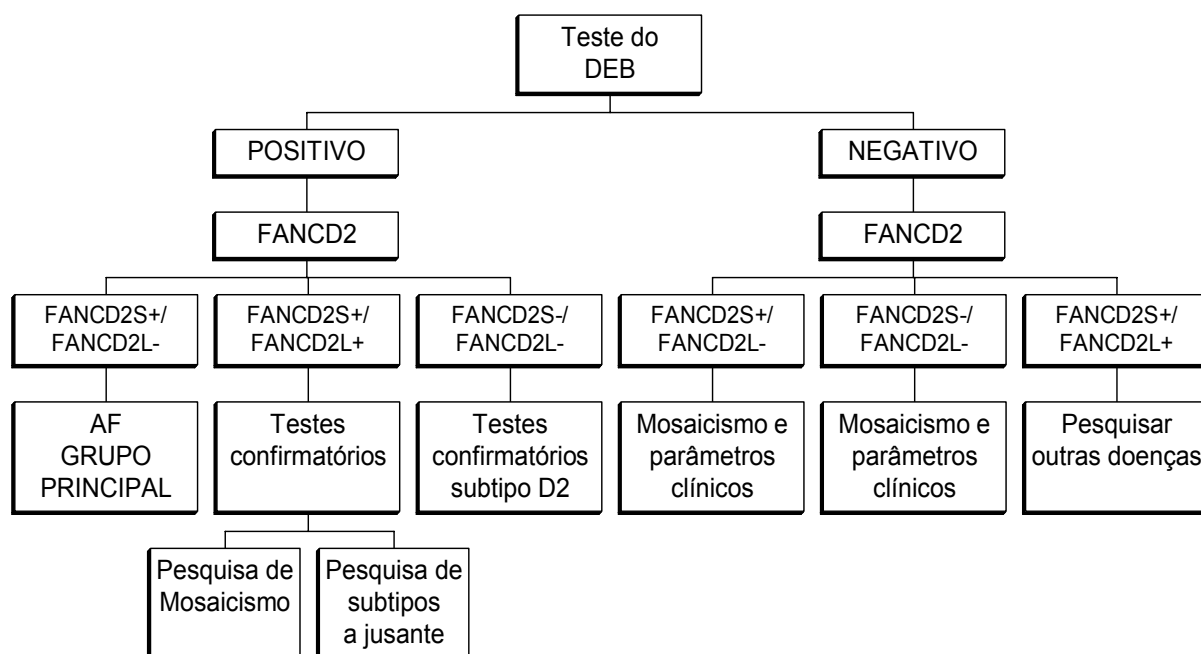
apresente mutações em gene ainda não foi identificado cujos produtos atuam após a formação do complexo principal, porém anteriormente a monoubiquitinação da FANCD2, e se positivo o paciente pode pertencer a grupos ainda não identificados que atuam a jusante da monoubiquitinação da FANCD2. Nesta fase a identificação dos possíveis genes envolvidos deve ser dirigida para estudos de complementação em nível de pesquisa.

Bagby e Alter (2006) propõem o uso do *Western Blot* para FANCD2 como um método de triagem das células anterior ao início da pesquisa de mutações. Uma vez que a possível proteína ou grupo de proteínas envolvidas nas alterações do mecanismo AF sejam detectadas, estratégias para o sequenciamento dirigido ao possível grupo envolvido podem ser estabelecidas.

Os testes moleculares são atualmente recomendados para casos de diagnóstico pré-natal, detecção de portadores em estudo de famílias e em grupos étnicos com frequência elevada de mutações específicas possivelmente em decorrência de um efeito fundador.

Uma estratégia para complementação diagnóstica da AF adaptada de Soulier et al. (2005) encontra-se no fluxograma 1.

FLUXOGRAMA 1 - COMPLEMENTAÇÃO DIAGNÓSTICA DA AF





## 2.10 MOSAICISMO

O mosaicismismo genético pode ser definido pela presença de duas populações de células geneticamente distintas em um único indivíduo que diferem uma da outra pela seqüência do DNA, mas que são originadas de um único zigoto. Existem diferentes tipos de mosaicismismo. Na anemia de Fanconi é observada a presença do mosaicismismo resultante da reversão de mutações deletérias hereditárias, conferindo ao alelo mutado funções normais (HIRSCHHORN, 2003).

Segundo dados da literatura, em torno de 15 a 25% dos pacientes AF apresentam evidências de mosaicismismo que ocorre espontaneamente (LO TEN FOE et al., 1997; GREGORY et al., 2001).

Os mecanismos capazes de gerar a reversão nas células AF ainda não foram completamente elucidados. O mais conhecido envolve recombinação mitótica intragênica ou conversão gênica em pacientes heterozigotos compostos, em que um alelo serve para restabelecer a seqüência do outro. Entretanto, outros mecanismos também têm sido descritos como aqueles que resultam em alterações secundárias compensatórias na seqüência do DNA, como é o caso de mutações onde ocorre alteração no quadro de leitura durante a transcrição. Deleções de uma única base, uma micro-inserção ou outros eventos genéticos levam a correção da seqüência alterada de forma compensatória (WAISFISZ et al., 1999).

Em casos de mosaicismismo, observa-se no teste de quebras cromossômicas a presença de duas subpopulações de linfócitos, uma delas é sensível aos agentes indutores de ligações cruzadas do DNA, enquanto a outra apresenta um comportamento normal e corresponde a mais de 50% das células analisadas (LO TEN FOE et al., 1997; GREGORY et al., 2001). No teste de *Western Blot* a ausência da banda correspondente à FANCD2 monoubiquitinada na subpopulação de linfócitos que carrega a mutação deletéria é mascarada pela presença da banda resultante da monoubiquitinação da FANCD2 na subpopulação linfocitária que recuperou o fenótipo normal após a reversão.

Portanto, na presença do mosaicismos encontram-se as duas bandas que correspondem a ambas as isoformas da FANCD2.

Sendo assim, o mosaicismos somático pode trazer complicações para o diagnóstico dos pacientes AF tornando os resultados dos estudos de quebras cromossômicas ambíguos ou até falso-negativos. Um paciente que apresente quadro clínico sugestivo e teste em sangue periférico negativo, é recomendável confirmar o diagnóstico utilizando um tecido alternativo, sendo em geral utilizados fibroblastos da pele (SOULIER et al., 2005).

As consequências clínicas do mosaicismos somático na anemia de Fanconi ainda são pouco conhecidas e sua presença pode até ser uma das causas da variabilidade dos distúrbios hematológicos observada entre os pacientes. Em células revertidas, eventos genéticos adquiridos ao longo do tempo produzem um gene AF funcional que confere resistência a agentes genotóxicos. É possível que uma vantagem no crescimento das células revertidas sobre as células mutadas favoreça uma reposição progressiva das células defeituosas da medula óssea (SOULIER et al., 2005). Apesar de a presença do mosaicismos sugerir um fenótipo hematológico mais brando, os indivíduos que o apresentam frequentemente desenvolvem falha progressiva da medula óssea ou leucemia (GREGORY et al., 2001).

Alguns pesquisadores consideram a possibilidade do mosaicismos somático predispor às complicações após o transplante de células tronco hematopoéticas (TMO) em pacientes AF, tal como a falha de pega ou a rejeição do enxerto. Devido à alta sensibilidade dos pacientes AF aos agentes alquilantes, estes devem receber preferencialmente um tratamento menos ablativo durante o condicionamento pré-transplante, com doses reduzidas de ciclofosfamida como proposto por Zanis-Neto et al. (2005). Segundo D'Andrea e Grompe (1997) e MacMillan et al. (2000) se o paciente apresentar mosaicismos somático, o regime de condicionamento ideal para os demais pacientes AF pode promover uma imunossupressão inadequada da população de células revertidas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a via de interação das proteínas AF/BRCA por meio da detecção da proteína FANCD2 e de sua forma monoubiquitinada, pelo método de *Western Blot*, em pacientes brasileiros com anemia de Fanconi e avaliar a contribuição dada por esta análise na elucidação do diagnóstico dessa doença.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a proteína FANCD2 e sua forma monoubiquitinada, por meio do método de *Western Blot*, em pacientes com anemia de Fanconi e em controles saudáveis.
- Pesquisar a proteína BRCA2 nos pacientes cujos subtipos não possam ser atribuídos ao gene *FANCD2* ou a outros genes cujos produtos atuam a montante da monoubiquitinação da FANCD2.
- Comparar os fenótipos FANCD2 obtidos pelo método de *Western Blot* com o índice de quebras cromossômicas e a porcentagem de reversão somática observados no teste de sensibilidade ao DEB.
- Comparar os fenótipos FANCD2 identificados pelo método de *Western Blot* com os valores hematimétricos dos pacientes com AF.
- Determinar a sensibilidade e especificidade do método de *Western Blot* para FANCD2 utilizando como referência o teste de sensibilidade ao DEB, que é o método padrão para o diagnóstico laboratorial da AF.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

#### 4.1.1 Pacientes

Foram incluídos neste estudo 84 pacientes brasileiros com suspeita clínica de anemia de Fanconi, confirmada pelo teste citogenético de quebras cromossômicas (Teste do DEB), cujas amostras foram coletadas no período de julho de 2004 a novembro de 2006. Todos os pacientes foram provenientes do Ambulatório de Anemia de Fanconi do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR). Este ambulatório realiza mais de 300 atendimentos por ano e tem mais de 80 pacientes atualmente em acompanhamento. A sistematização no atendimento aos pacientes com AF é parte de um programa realizado em colaboração com o *St Jude Children's Research Hospital - International Outreach Program*, firmado em um acordo interinstitucional entre o HC/UFPR e o *St Jude Children's Research Hospital* desde 2001.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo 1); todos os pacientes foram informados quanto aos objetivos do mesmo e as amostras de sangue foram coletadas após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

Dos 84 pacientes selecionados para o estudo, 75 eram probandos e 9 eram irmãos. Dentre esses, 49 (58,3%) eram do sexo feminino e 35 (41,7%) eram do sexo masculino. Quanto a idade, os pacientes apresentaram uma faixa etária de 2 a 34 anos (mediana = 11 anos) no momento de realização deste estudo, de 3 meses a 30 anos (mediana = 7 anos) no diagnóstico e de 1 a 24 anos (mediana = 8,5 anos) no início da citopenia. A classificação étnica dos pacientes foi feita de acordo com a cor da pele, traços fisionômicos e ascendência, sendo a amostra constituída de 59 (70,2%) pacientes euro-brasileiros e de 25 (29,8%) pacientes mulatos.

A situação hematológica dos pacientes no momento da coleta dos exames foi definida de acordo com os estágios do comprometimento medular, classificados em: grau I = sem falha medular (13 pacientes); grau II = falha medular inicial (38 pacientes); grau III = falha medular avançada (33 pacientes), conforme o quadro 2 apresentado na revisão bibliográfica. A extensão das malformações foi definida, de acordo com o número de sítios anatômicos envolvidos, em: ausentes (nenhum sítio envolvido), limitadas (<3 sítios) e extensas (3 ou mais sítios, sendo que um deles deve envolver um órgão interno). Esta mesma classificação foi usada em estudos anteriores (GUARDIOLA et al., 2000; SOULIER et al., 2005). As malformações foram extensas em 28 pacientes, limitadas em 46 pacientes e ausentes nos demais 10 pacientes. Quanto ao número de transfusões recebidas os pacientes foram subdivididos entre aqueles que não foram transfundidos (NT=36), os que receberam um número menor do que 20 transfusões de hemácias e (ou) plaquetas (<20=31) e os que receberam um número maior do que 20 transfusões (>20=17).

As características dos 84 pacientes incluídos neste estudo estão sumarizadas na tabela 2 e os dados individualizados dos pacientes encontra-se no Apêndice 1.

#### 4.1.2 Controles

Foram estudadas amostras de sangue periférico de 98 indivíduos voluntários saudáveis selecionados entre funcionários do Hospital de Clínicas da UFPR e doadores de sangue do Banco de Sangue dessa mesma instituição. Todos os voluntários foram informados quanto aos objetivos deste estudo e as amostras de sangue coletadas após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3).

Estas amostras foram pareadas com as dos pacientes quanto ao sexo e grupo étnico. Entre os indivíduos do grupo controle, 58 (59,2%) eram do sexo feminino, 40 (40,8%) eram do sexo masculino, com uma faixa etária entre 17 a 58 anos (mediana = 37 anos). Com relação ao grupo étnico eram 73 (74,5%) controles euro-brasileiros e 25 (25,5%) controles mulatos.

As amostras do grupo controle não foram pareadas com as dos pacientes quanto à idade porque os pacientes são na maioria crianças e o diagnóstico desta doença é feito em média entre os 7 e 8 anos. Diante da impossibilidade de obtermos uma amostra controle com a mesma faixa etária, acreditamos que este parâmetro pudesse ser desconsiderado em razão das características do teste estudado, pois avalia uma alteração em um mecanismo comandado por fatores genéticos herdados ao nascer, de forma recessiva que, em geral, manifesta-se nos primeiros anos de vida. Sendo assim, indivíduos adultos saudáveis da população que ainda não tenham manifestado a doença muito raramente poderiam ser assintomáticos, ao passo que crianças saudáveis de pouca idade poderiam, eventualmente, manifestar a doença em uma fase mais tardia. As informações dos controles relativas à idade, sexo e grupo étnico encontram-se no Apêndice 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

| CARACTERÍSTICA                 | NÚMERO |
|--------------------------------|--------|
| N = 84                         |        |
| Probandos                      | 75     |
| Irmãos                         | 9      |
| Idade (em anos)                |        |
| Mediana no estudo              | 11     |
| Mediana no diagnóstico         | 7      |
| Mediana no início da citopenia | 8,5    |
| Sexo                           |        |
| Feminino                       | 49     |
| Masculino                      | 35     |
| Grupo Étnico                   |        |
| Euro-brasileiros               | 59     |
| Mulatos                        | 25     |
| Malformações                   |        |
| Ausentes                       | 10     |
| Limitadas                      | 46     |
| Extensas                       | 28     |
| Situação Hematológica          |        |
| Grau I                         | 13     |
| Grau II                        | 38     |
| Grau III                       | 33     |
| N.º de Transfusões             |        |
| NT                             | 36     |
| < 20                           | 31     |
| > 20                           | 17     |
| Grupo de Complementação        |        |
| FA-A                           | 27     |
| FA-G                           | 03     |
| FA-C                           | 01     |
| FA-E                           | 01     |
| NI                             | 02     |
| NR                             | 50     |

NOTA: NT= não transfundido; NI= não identificada mutação entre os grupos pesquisados; NR = não realizado. As amostras foram coletadas previamente à realização do transplante de células tronco hematopoéticas, naqueles pacientes em que este procedimento foi indicado.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 *Western Blot* para FANCD2

O protocolo utilizado neste estudo foi o descrito por Garcia-Higuera et al. (2001) e adaptado por Shimamura et al. (2002).

Todos os 84 pacientes e 98 controles saudáveis foram analisados por esta metodologia. Para cada conjunto de amostras estudado, foram incluídos um controle positivo para a presença de ambas as isoformas da FANCD2 (linhagem HeLa) e uma amostra de sangue periférico de um indivíduo saudável para avaliar as condições da cultura primária.

### **Isolamento de linfócitos e cultura primária**

A partir do sangue periférico coletado em heparina ou ACD foram isoladas as células mononucleares utilizando-se para tanto um gradiente com densidade de 1.077 do tipo Ficoll-Paque Plus<sup>®</sup> (GE Healthcare - Little Chalfont, Reino Unido). As células mononucleares assim isoladas foram cultivadas em uma concentração de 1,0 a 2,0 x 10<sup>6</sup> células/mL, por 72 horas em uma cultura primária incubada a 37°C com uma tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura utilizado foi o RPMI suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF), 1% de solução de antibióticos (penicilina/estreptomicina), 2mM de L-glutamina. Para estímulo da proliferação, foi utilizada fitohemaglutinina P (PHA-P) em uma concentração de 50µg/mL.

Após 72 horas as células foram coletadas com auxílio de uma espátula apropriada (*cell scraper*) e lavadas em tampão salina/fosfato (PBS) por centrifugação a 1.500 rpm, por 10 min, a 4°C. As células foram ressuspensas em PBS e novamente contadas em câmara de Neubauer.

## **Preparo dos lisados de proteínas**

Os cultivos celulares procedentes de cada amostra foram lisados em tampão RIPA modificado (M-RIPA = 50mM de tris HCl, 1% de NP-40, 0,1% de desoxicolato de sódio, 150 mM de NaCl, 10mM de pirofosfato de sódio, 4mM de EDTA) acrescido de inibidores de proteases (1µg/ml de pepstatina e leupeptina, 2µg/ml de aprotinina e 1 mM de fenilmetilsulfonilfluorida [PMSF]) e inibidores de fosfatases (1mM de ortovanadato de sódio e 10mM de fluoreto de sódio), obtendo-se assim uma solução de lise chamada RIPA+PI. A proporção de uso entre o tampão RIPA+PI e o número de células variou de 10 a 50µl de RIPA+PI para cada 10<sup>6</sup> células.

Após a lise, o sobrenadante foi mantido em gelo até a determinação da concentração de proteínas totais em um espectrofotômetro. Para tanto, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), que consiste na adição de um corante ácido do tipo azul de Coomassie à solução de proteínas e na mensuração da absorbância em um espectrofotômetro a 595nm. As medidas obtidas são comparadas com os valores de uma curva padrão.

Lisados contendo 100 µg de proteína total foram preparados em tampão Laemmli (50mM de tris [pH 6,8], 86mM de 2 mercaptoetanol, 2% de SDS) aquecidos a 96°C por 5 min e submetidos à eletroforese ou armazenados em freezer a -80°C.

## **Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose**

A separação das proteínas foi feita por meio de uma eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida a 7% (SDS/PAGE). As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em tampão de transferência (25mM de tris base, 200mM de glicina, 20% de metanol). Após aproximadamente três horas de transferência, foi realizada a coloração com Ponceau S, que é uma coloração reversível com a finalidade de controle da transferência, que permitiu detectar se houve degradação da proteína que está sendo transferida ou não. Os sítios inespecíficos de ligação da



membrana foram bloqueados com solução de 5% de caseína em TBS-T (50mM de tris-HCl, 150mM de NaCl, 0,1% de tween 20) durante 15 a 18 h a 4 °C.

### **Deteção da proteína FANCD2 e de sua forma monoubiquitinada**

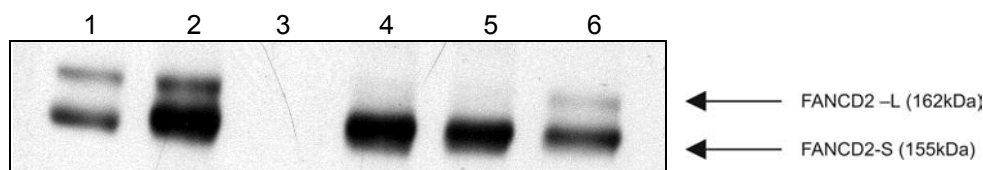
As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas separadas de acordo com seus pesos moleculares por SDS/PAGE foram incubadas com o anticorpo monoclonal de camundongo, dirigido contra a porção N-terminal da proteína FANCD2 humana (F117 Santa Cruz - Califórnia, EUA). A diluição para uso deste anticorpo foi 1:200, que permitiu a detecção da presença ou ausência da proteína FANCD2 em suas duas isoformas, a FANCD2S (155kDa), que não é ubiquitinada, e a FANCD2L, que é monoubiquitinada (162 kDa).

Essas membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário marcado com peroxidase (Horseradish Peroxidase – HRP). Esse anticorpo monoclonal de cabra anticamundongo (BioRad - Califórnia, EUA) foi utilizado em uma diluição de 1:10.000.

O sistema de detecção utilizado neste estudo (kit ECL - RPN2109<sup>®</sup> GE Healthcare – Little Chalfont, Reino Unido) baseou-se na oxidação da diacilhidrazida (luminol) pela peroxidase, catalisada pelo peróxido de hidrogênio em condições alcalinas. Essa reação química que resultou na dissipação de energia por uma substância em seu estado de excitação, na forma de luz, é denominada quimioluminescência. A luz emitida foi detectada por meio de uma curta exposição de filmes de auto-radiografia sensíveis à luz azul e captada em um comprimento de onda de 428nm. A sensibilização dos filmes de auto-radiografia permitiu a visualização da presença ou ausência das bandas referentes a ambas as isoformas da proteína FANCD2 (figura 8).

### **Interpretação dos resultados**

O padrão de bandas das isoformas da proteína FANCD2 permite classificar os pacientes em três fenótipos, de acordo com a fase do mecanismo AF/BRCA que se encontra alterado. As interpretações dos resultados estão descritos na tabela 3.

FIGURA 8 - EXEMPLO DE RESULTADO DO TESTE DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2

FONTE: Banco de dados do Laboratório de Imunogenética do HC- UFPR

NOTA: Filas 1,2: controles com fenótipo FANCD2S+/ FANCD2L+; fila 3: paciente com o fenótipo FANCD2S-/FANCD2L-, filas 4 e 5: pacientes com fenótipo FANCD2S+/ FANCD2L-; fila 6: paciente com fenótipo FANCD2S+/ FANCD2L+.

TABELA 3 - INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO *WESTERN BLOT* PARA FANCD2

| RESULTADOS   | INTERPRETAÇÃO   |
|--|---|
| FANCD2S+ / FANCD2L-                                  | Mutações nos genes que atuam a montante na via AF/BRCA<br>Genes do complexo principal da AF ( <i>FANCA, B, C, E, F, G, L, M</i> )<br>Gene <i>FANCI</i>  |
| FANCD2S- / FANCD2L-<br>(ausência de ambas as bandas) | Mutações no gene <i>FANCD2</i> , que codifica a proteína central do mecanismo AF/BRCA   |
| FANCD2S+ / FANCD2L+                                  | Uma das seguintes situações:<br>Mutações nos genes cujos produtos atuam a jusante da via AF/BRCA como <i>FANCD1/BRCA2</i> e <i>FANCI</i> e <i>FANCN</i> ou outros genes ainda não identificados<br>Presença de Mosaicismo<br>Resultado negativo para AF |

#### 4.2.2 *Western Blot* para BRCA2

Para a pesquisa da proteína BRCA2, também chamada FANCD1 na AF, seguiu-se o mesmo protocolo descrito para FANCD2, diferindo apenas quanto aos anticorpos primário e secundário. Foi utilizado o anticorpo (Ab-2) de coelho anti-BRCA2 humano (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha), seguido do anticorpo secundário de cabra anticoelho (BioRad – Califórnia, EUA). Optou-se pelo anticorpo secundário marcado com peroxidase, o que permitiu o uso do mesmo sistema de revelação utilizado no *Western Blot* para FANCD2.

Este teste foi realizado em especial naqueles pacientes que apresentaram o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ devido à atuação da proteína BRCA2 se dar à jusante da monoubiquitinação da proteína FANCD2 (HOWLETT et al., 2002). Entretanto, a pesquisa também foi feita em alguns pacientes com os fenótipos FANCD2S+/FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L- e na linhagem HeLa como controles positivo para a presença

de bandas da proteína BRCA2. Linfócitos do sangue periférico de um indivíduo saudável estimulados com PHA foram utilizados para controle da cultura primária.

#### 4.2.3 Teste de Sensibilidade ao Diepoxibutano (Teste do DEB)

O teste do DEB faz parte da rotina para diagnóstico laboratorial dos pacientes encaminhados ao Ambulatório de Anemia de Fanconi do Hospital de Clínicas da UFPR e é realizado pela equipe do setor de citogenética desta mesma instituição. Os 84 pacientes e os 98 controles saudáveis foram submetidos ao teste do DEB. A metodologia adotada na realização destes testes foi descrita por Auerbach, Adler e Chaganti (1981) com modificações introduzidas também por Auerbach, Rogatko e Schroeder (1989).

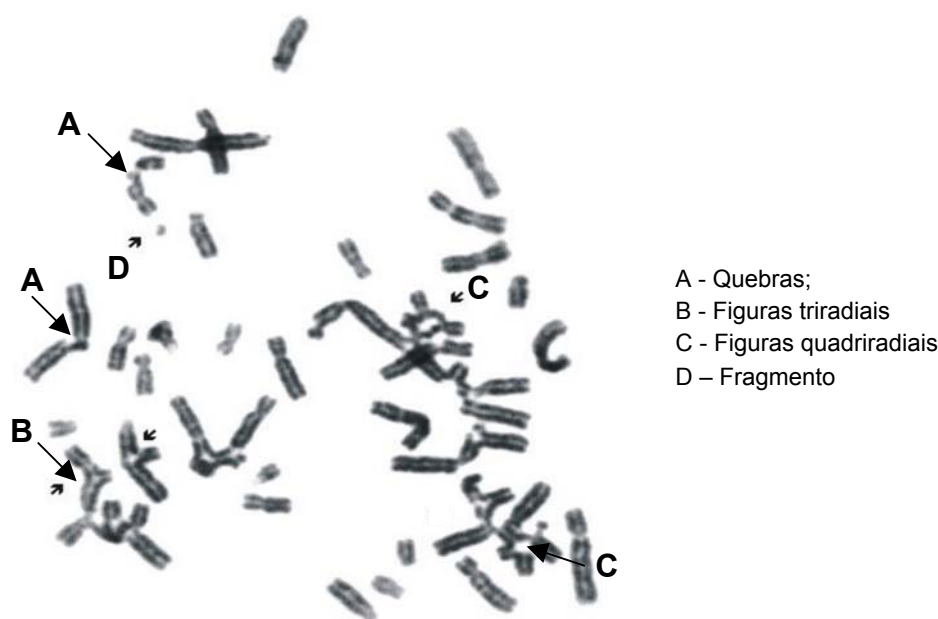
Este teste possibilita a quantificação do número e tipo de aberrações estruturais apresentadas pelos cromossomos, incluindo especialmente quebras de cromátides, figuras radiais, fragmentos e falhas (figura 9). Esta análise foi feita em pelo menos 25 metáfases, mas em casos com número reduzido de metáfases todas as que eram possíveis foram analisadas.

#### **Interpretação dos resultados**

Os resultados do teste são expressos por meio de um índice de quebras cromossômicas, calculado com base no número total de aberrações cromossômicas observadas divididas pelo número de metáfases analisadas. As falhas foram excluídas do cálculo do índice e as figuras foram consideradas como duas quebras. Os valores de referência para estes índices foram estabelecidos com base nos dados acumulados ao longo dos anos pelo Setor de Citogenética do Hospital de Clínicas da UFPR e são comparáveis aos dados do IFAR publicados por Auerbach, Rogatko e Schroeder (1989).

- Positivo para AF: 1,06 a 23,9
- Negativo para AF: 0,00 a 0,36

FIGURA 9 - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM CÉLULAS AF EXPOSTAS AO DEB



FONTE: Banco de dados do Laboratório de Citogenética - Hospital de Clínicas – UFPR

### Porcentagem de reversão somática

Foi também considerado o número de células que apresentaram quebras cromossômicas em relação ao total de metáfases analisadas, o que permitiu estimar a porcentagem de reversão somática apresentada pelos pacientes. Esta porcentagem representa o número de metáfases sem alterações analisadas no teste do DEB.

#### 4.2.4 Métodos Estatísticos

A qualidade do teste de *Western Blot* como um teste diagnóstico foi avaliada pela estimativa das medidas de sensibilidade e especificidade considerando o teste do DEB como padrão ouro. Foi calculado o intervalo 95% de confiança para a proporção de casos inconclusivos pelo teste de *Western Blot* em pacientes com AF.

Para a comparação entre os fenótipos observados no *Western Blot* para FANCD2 e os resultados do teste do DEB, bem como os parâmetros do hemograma, testou-se a hipótese nula de que os resultados de cada variável (índice de quebras cromossômica e porcentagem de reversão somática, número de eritrócitos, hemoglobina,

hematócrito, volume corpuscular médio, número de leucócitos, número de neutrófilos e número de plaquetas) seriam iguais entre o grupo de pacientes com fenótipo FANCD2S<sup>+</sup>/FANCD2L<sup>+</sup> e o grupo com fenótipos FANCD2S<sup>+</sup>/FANCD2L<sup>-</sup> ou FANCD2S<sup>-</sup>/FANCD2L<sup>-</sup> *versus* a hipótese alternativa de resultados diferentes entre os dois grupos. Para avaliação destas hipóteses considerou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para grupos independentes. Nesse estudo a significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ . Os cálculos foram realizados por meio do software Statistica 5.1 (SOARES e SIQUEIRA, 2002).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 INVESTIGAÇÃO DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA FANCD2 EM PACIENTES AF E CONTROLES SAUDÁVEIS PELO MÉTODO DE *WESTERN BLOT*

Os resultados da identificação fenotípica da proteína FANCD2 e de sua forma monoubiquitinada nos 84 pacientes com anemia de Fanconi e nos 98 controles saudáveis estão apresentados na tabela 4.

Dos 84 pacientes analisados, 77 deles (91,7%) apresentaram o fenótipo FANCD2S<sup>+</sup>/FANCD2L<sup>-</sup> e teste do DEB positivo; 2 (2,4%) o fenótipo FANCD2S<sup>-</sup>/FANCD2L<sup>-</sup> e DEB positivo e 5 (5,9%) o fenótipo FANCD2S<sup>+</sup>/FANCD2L<sup>+</sup> e DEB positivo. Em todos os 98 controles foram observados o fenótipo FANCD2S<sup>+</sup>/FANCD2L<sup>+</sup> e teste do DEB negativo.

TABELA 4 - FENÓTIPOS DA FANCD2 OBTIDOS PELO MÉTODO DE *WESTERN BLOT* EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI E CONTROLES SAUDÁVEIS

| TESTE DO DEB | FENÓTIPOS<br>FANCD2S <sup>(1)</sup> /FANCD2L <sup>(2)</sup> | PACIENTES<br>(n=84) |      | CONTROLES<br>(n=98) |     |
|--------------|---|---------------------|------|---------------------|-----|
|              |   | n                   | %    | N                   | %   |
| Positivo     | FANCD2S <sup>+</sup> /FANCD2L <sup>-</sup>                  | 77                  | 91,7 | -                   | -   |
| Positivo     | FANCD2S <sup>-</sup> /FANCD2L <sup>-</sup>                  | 02                  | 2,4  | -                   | -   |
| Positivo     | FANCD2S <sup>+</sup> /FANCD2L <sup>+</sup>                  | 05                  | 5,9  | -                   | -   |
| Negativo     | FANCD2S <sup>+</sup> /FANCD2L <sup>+</sup>                  | -                   | -    | 98                  | 100 |

(1) FANCD2S = banda correspondente à fração S (*Short* ou *Small*) da proteína FANCD2.

(2) FANCD2L = banda correspondente à fração L (*Long* ou *Large*) da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2.

### 5.2 PESQUISA DA PROTEÍNA BRCA2 PELO MÉTODO DE *WESTERN BLOT*

A proteína BRCA2 foi pesquisada nos cinco pacientes com o fenótipo FANCD2S<sup>+</sup>/FANCD2L<sup>+</sup>. Esses pacientes não apresentaram alterações na expressão da proteína BRCA2, ou seja, a banda que corresponde à proteína BRCA2 estava presente. Vinte e sete pacientes com os fenótipos FANCD2S<sup>+</sup>/FANCD2L<sup>-</sup> e FANCD2S<sup>-</sup>/FANCD2L<sup>-</sup> foram também analisados quanto à presença da BRCA2. Este grupo de

pacientes foi utilizado como controle positivo para a presença da banda referente à BRCA2. Todos eles apresentaram expressão normal desta proteína.

Em função de que estes cinco pacientes apresentaram resultados inconclusivos no *Western blot*, pois a disfunção da via AF/BRCA não pode ser atribuída a proteínas que atuam a montante da monoubiquitinação da FANCD2 ou a própria FANCD2, alguns aspectos clínicos foram analisados para melhor caracterizá-los (tabela 5).

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM O FENÓTIPO FANCD2S+/FANCD2L+ NO TESTE DE *WESTERN BLOT*

| CARACTERÍSTICA                      | PACIENTES |      |      |                    |     |
|-------------------------------------|-----------|------|------|--------------------|-----|
|                                     | P 8       | P53  | P60  | P73 <sup>(1)</sup> | P93 |
| Idade ao diagnóstico (anos)         | 13        | 8    | 6    | 15                 | 15  |
| Idade do início da Citopenia (anos) | 12        | 8    | 6    | NA                 | 15  |
| Situação hematológica               | III       | III  | III  | I                  | III |
| Malformações                        | L         | E    | L    | AU                 | AU  |
| N.º de transfusões                  | >20       | <20  | <20  | NT                 | <20 |
| Índice de quebras                   | 5,44      | 3,5  | 1,25 | 0,84               | 1,2 |
| Porcentagem de reversão             | 4         | 73,4 | 68   | 76                 | 60  |

NOTA: Os cinco pacientes com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ eram probandos; a situação hematológica destes pacientes foi definida entre os graus I, II ou III e a extensão das malformações definida em extensas (E) e limitadas (L) ou ausentes (AU), de acordo com o descrito em material e métodos; NA= não aplicável; NT= não transfundido.

(1) Paciente P73= paciente com índice de quebras cromossômicas inferior a 1,06 (0,84), porém classificado como FA-A em um estudo de complementação realizado na Universidade de Rockefeller (EUA) e com história familiar de AF.

### 5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS FENÓTIPOS DA FANCD2 OBTIDOS NO *WESTERN BLOT* E OS RESULTADOS OBSERVADOS NO TESTE DO DEB

Todos os 84 pacientes incluídos neste estudo foram previamente submetidos ao teste do DEB e apresentaram índices de quebras cromossômicas com valores compatíveis com o diagnóstico de AF. Este mesmo teste permitiu também avaliar a proporção de células que apresentavam quebras cromossômicas em relação ao número total de células analisadas. Desta forma foi estimada a porcentagem de reversão somática observada nas células do sangue periférico dos pacientes analisados. Observou-se que quatro dos cinco pacientes com o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ apresentaram uma porcentagem de reversão superior a 50% (pacientes P53, P60, P73, P93 – tabela 5), com mediana de 68%. Já os demais pacientes, 77 com fenótipo

FANCD2S+/FANCD2L- e 2 com fenótipo FANCD2S-/FANCD2L-, apresentaram porcentagem de reversão variando de 0 a 48% (Mediana = 16%).

Com o intuito de comparar as variáveis apresentadas pelo Teste do DEB (índice de quebras cromossômicas e a porcentagem de reversão somática) com a presença (FANCD2S+/FANCD2L+) ou ausência (FANCD2S+/FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L-) da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 foi aplicado o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

Houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as porcentagens de reversão entre os pacientes com presença ou com ausência da forma monoubiquitinada da FANCD2 ( $p=0,006$ ). Contudo, quando os fenótipos FANCD2 foram comparados quanto aos índices de quebras, a diferença não mostrou significância estatística ( $p=0,139$ ). Os resultados obtidos nesta análise encontram-se na tabela 6 e no gráfico 3.

Os índices de quebras cromossômicas e as porcentagens de reversão de todas as amostras dos pacientes incluídos neste estudo encontram-se no Apêndice 3.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE DO DEB E OS FENÓTIPOS DA FANCD2 EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI

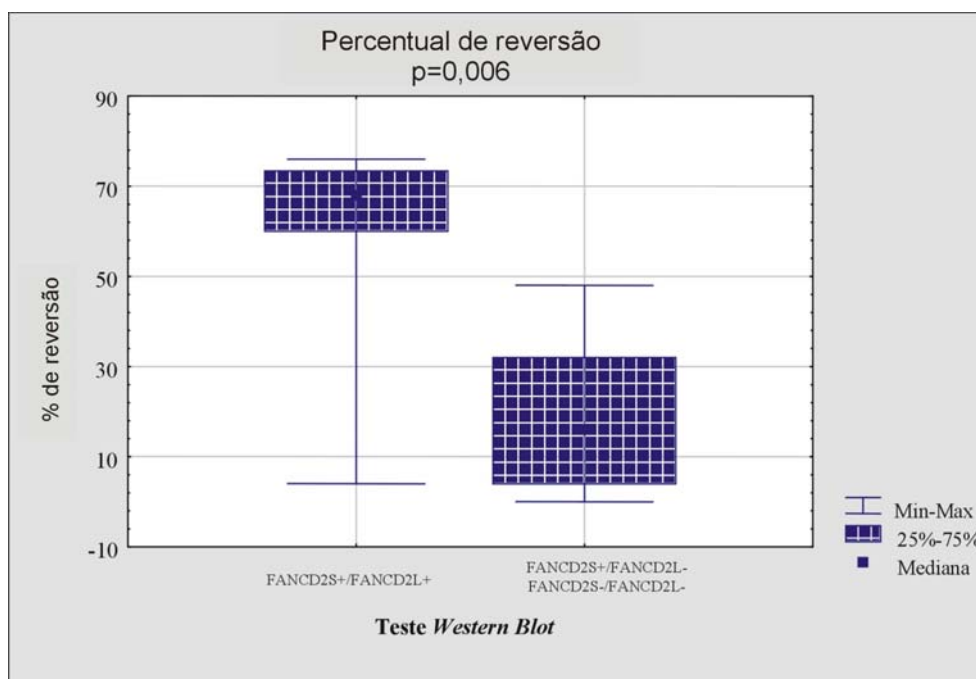
| VARIÁVEIS DO TESTE DO DEB     | FENÓTIPOS FANCD2S <sup>(1)</sup> /FANCD2L <sup>(2)</sup> | n  | MEDIANA | MÉDIA | DESVIO PADRÃO | VALOR DE p |
|-------------------------------|--|----|---------|-------|---------------|------------|
| Índice de quebra cromossômica | FANCD2S+/FANCD2L+  | 5  | 1,25    | 2,45  | 1,98          | 0,139      |
|                               | FANCD2S+/FANCD2L-<br>e<br>FANCD2S-/FANCD2L-              | 79 | 3,04    | 3,89  | 3,19          |            |
| % de reversão                 | FANCD2S+/FANCD2L+  | 5  | 68,00   | 56,28 | 29,86         | 0,006      |
|                               | FANCD2S+/FANCD2L-<br>e<br>FANCD2S-/FANCD2L-              | 79 | 16,00   | 17,28 | 15,00         |            |

(1) FANCD2S = banda correspondente à fração S (*Short* ou *Small*) da proteína FANCD2.

(2) FANCD2L = banda correspondente à fração L (*Long* ou *Large*) da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2.



GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS FENÓTIPOS OBSERVADOS NO *WESTERN BLOT* E A PORCENTAGEM DE CÉLULAS REVERTIDAS EM PACIENTES COM AF



#### 5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS FENÓTIPOS DA FANCD2 E OS VALORES HEMATIMÉTRICOS EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI

Foram obtidos os resultados do hemograma dos 84 pacientes envolvidos neste estudo, tendo sido selecionados hemogramas do mesmo período da coleta da amostra para o teste do *Western Blot* para FANCD2. Os pacientes não receberam transfusões no período anterior à coleta de sangue periférico para a realização destes exames.

As variáveis analisadas foram o número de eritrócitos, a quantidade de hemoglobina (Hb), o hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM), o número de leucócitos, o número de neutrófilos e o número de plaquetas.

A comparação desses parâmetros hematológicos entre o grupo de pacientes com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ e o grupo de pacientes incluindo os fenótipos FANCD2S+/FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L- foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados da análise (tabela 7) mostraram não haver diferença

estatisticamente significante desses valores hematimétricos entre os dois grupos ( $p > 0,05$ ). O resultados do *Western Blot*, do teste do DEB e os valores hematimétricos de todas os pacientes deste estudo encontram-se no Apêndice 4.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE VALORES HEMATIMÉTRICOS E FENÓTIPOS FANCD2 DOS PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI

| VARIÁVEIS   | FANCD2S+/FANCD2L+<br>n= 5<br>MEDIANA (min-max) | FANCD2S+/FANCD2L-<br>FANCD2S-/FANCD2L-<br>n= 79<br>MEDIANA (min-max) | VALOR DE p |
|---|--|--|------------|
| N. <sup>o</sup> eritrócitos x 10 <sup>6</sup> /μL | 2,63 (2,07 - 4,21)                             | 2,86 (0,91 - 5,27)   | 0,846      |
| Hemoglobina g/DL                                  | 8,50 (7,20 - 12,60)                            | 9,20 (2,30 - 15,30)  | 0,717      |
| Hematócrito %                                     | 25,30 (21,50 - 38,10)                          | 27,45 (7,40 - 47,50)   | 0,703      |
| VCM fL  | 90,40 (87,70 - 106,20)                         | 96,30 (78,14 - 118,59)   | 0,473      |
| N. <sup>o</sup> leucócitos x 10 <sup>3</sup> /μL  | 3,03 (1,21 - 4,13)                             | 3,36 (1,07 - 9,99)   | 0,496      |
| N. <sup>o</sup> neutrófilos x 10 <sup>3</sup> /μL | 0,45 (0,04 - 1,98)                             | 1,11 (0,10 - 6,69)   | 0,117      |
| Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /μL                   | 45,00 (10,00 - 183,00)                         | 35,00 (6,00 - 326,00)  | 0,769      |

## 5.5 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO DE WESTERN BLOT PARA FANCD2

Dos 182 indivíduos analisados neste estudo (84 pacientes AF e 98 controles normais), 79 (43,4%) apresentaram o teste do DEB (método de referência) positivo e concordante com os resultados do método em estudo (*Western Blot* para FANCD2), ou seja, detecção dos fenótipos FANCD2S+/FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L-. Cinco dos 182 indivíduos (2,7%) tiveram resultado positivo no teste do DEB, porém apresentaram o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ no método de *Western Blot*. Em 98 dos 182 indivíduos estudados não foram detectadas quebras cromossômicas com índices significativos (teste do DEB negativo) e de forma concordante no método de *Western Blot* foi detectada a presença de ambas as bandas (FANCD2S+/FANCD2L+), todos estes 98 correspondem aos indivíduos saudáveis do grupo controle. Não foi observado nenhum resultado negativo no método de referência e com ausência de uma ou ambas as bandas no método de *Western Blot* (fenótipos FANCD2S+/FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L-).

Com base nesses dados foi possível calcular a sensibilidade e a especificidade do método de *Western Blot* para FANCD2 utilizando como referência o método padrão ouro para diagnóstico da AF (teste do DEB). Os valores encontrados mostraram sensibilidade de 94% (79/84) e especificidade de 100% (98/98). Estes resultados estão apresentados na tabela 8. O resultados do *Western Blot* e do teste do DEB das amostras dos controles saudáveis encontram-se no Apêndice 2 e dos pacientes no Apêndice 3.

### Intervalo de confiança

Neste estudo, foi observado que 5,9% (5/84) dos casos estudados pelo *Western Blot* não foram conclusivos e o intervalo de confiança de 95% foi de 0,89% a 11,01%, determinando que existe 95% de chance de que entre estes valores esteja o verdadeiro percentual de pacientes que têm anemia de Fanconi identificada pelo teste DEB e têm resultado inconclusivo pelo teste *Western Blot*. Os 5,9% de casos inconclusivos correspondem à estimativa de erro do teste *Western Blot*, ou seja, a classificação de um caso como sendo inconclusivo, tendo ele anemia de Fanconi.

TABELA 8 - DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO DE *WESTERN BLOT* EM PACIENTES COM ANEMIA DE FANCONI E EM CONTROLES SAUDÁVEIS

| MÉTODO  | TESTE DO DEB<br>POSITIVO<br>n (%) | TESTE DO DEB<br>NEGATIVO<br>n (%) | TOTAL<br>n=182 |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| <i>WESTERN BLOT</i><br>FANCD2S+/FANCD2L-<br>FANCD2S-/FANCD2L- | 79 (43,4)                         | 0 (0,0)                           | 79 (43,4)      |
| <i>WESTERN BLOT</i><br>FANCD2S+/FANCD2L+                      | 05 (2,7)                          | 98 (53,9)                         | 103 (56,6)     |
| TOTAL   | 84 (46,1)                         | 98 (53,9)                         | 182 (100,0)    |

NOTA: sensibilidade 94% (79/84); especificidade 100% (98/98)

## 6 DISCUSSÃO

A metodologia de *Western Blot* para a detecção da isoforma monoubiquitinada da proteína FANCD2 foi apresentada por Shimamura et al. (2002) como um novo método para auxílio diagnóstico e subtipificação da AF. Foi constatado que a ausência da isoforma monoubiquitinada da FANCD2 correlaciona-se com o diagnóstico de anemia de Fanconi.

Em um outro estudo realizado por Soulier et al. (2005) foi possível concluir que a análise direta do mecanismo molecular que leva a monoubiquitinação da FANCD2 trouxe informações importantes para o diagnóstico e a caracterização desta doença, em combinação com investigações clínicas e o teste do DEB. O *Western Blot* para FANCD2, segundo estes autores, facilita o encaminhamento para análise em fibroblastos da pele para confirmação dos casos de reversão somática e possibilita uma prévia classificação dos pacientes AF quanto à etapa da via de interação das proteínas AF/BRCA que se encontra comprometida.

A implantação da metodologia de *Western Blot* para FANCD2 foi um dos requisitos para a realização deste estudo, uma vez que o objetivo principal desta pesquisa foi analisar a via de interação das proteínas AF/BRCA por meio da detecção da proteína FANCD2 e de sua forma monoubiquitinada.

Dos 84 pacientes analisados, 77 (91,7%) apresentaram o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L- e teste do DEB positivo, que corresponde a indivíduos cujos defeitos na via de monoubiquitinação localizam-se a montante da proteína central (FANCD2) e incluem todos os subtipos pertencentes ao complexo principal de proteínas AF, que são FA-A, FA-B, FA-C, FA-E, FA-F, FA-G, FA-L e FA-M. A ausência da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2, que caracteriza este fenótipo, é uma consequência de mutações deletérias presentes em um dos genes que codificam uma das proteínas do complexo principal. Alterações em qualquer uma dessas proteínas interrompem a cascata de reações que leva à monoubiquitinação da proteína FANCD2 e conseqüentemente impede a sua interação com as demais proteínas reparadoras do DNA (GURTAN e

D'ANDREA, 2006). A identificação de alterações no mecanismo AF/BRCA a montante da monoubiquitinação da FANCD2 na maioria dos pacientes estudados (91,7%) é de fácil compreensão uma vez que os grupos de complementação do complexo principal somam juntos em torno de 90% dos casos desta doença, segundo dados da literatura (LEVITUS et al., 2004). Ao investigar os fenótipos FANCD2 em pacientes AF, Soulier et al. (2005) observaram que 79,2% (42/53) apresentavam o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L- em sangue periférico, porém, após a análise em fibroblastos da pele dos pacientes com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+, esta porcentagem subiu para 89% (47/53).

Estes pacientes com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L- e teste do DEB positivo podem ainda pertencer ao grupo de complementação FA-I, identificado recentemente e relatado em poucos casos. A proteína FANCI parece desempenhar suas funções após a formação do complexo principal, estabelecendo um novo complexo com a proteína FANCD2, sendo ambas monoubiquitinadas. Pacientes que pertencem a este grupo de complementação apresentam ausência da banda correspondente à forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 no *Western Blot*, porque a FANCI ubiquitinada é necessária para que a FANCD2 seja também ubiquitinada, e o novo complexo FANCI<sup>Ub</sup>/FANCD2<sup>Ub</sup> se forme e o reparo do DNA ocorra (GODTHELP et al., 2006; SMOGORZEWSKA et al., 2007).

Embora mais raramente, alterações no mecanismo AF/BRCA decorrentes de mutações deletérias no gene que codifica a FANCD2 também podem ocorrer, causando disfunções nesta proteína ou impedindo a sua expressão. Neste estudo somente dois pacientes (2,4%) dos 84 analisados apresentaram o fenótipo FANCD2S-/FANCD2L- e teste do DEB positivo, que corresponde aos indivíduos com ausência não somente da banda longa (FANCD2L-), como também da banda curta (FANCD2S-) da proteína FANCD2. A frequência do fenótipo FANCD2S-/FANCD2L- neste estudo não apresentou diferença estatisticamente significativa no nível de significância de 5% ( $p=0,3748$ ) com o observado por Soulier et al. (2005), que identificaram este fenótipo em 3 dos 53 pacientes estudados.

A ausência de ambas isoformas dessa proteína no *Western Blot* sugere a existência de mutações deletérias no próprio gene *FANCD2*, com prejuízo direto do mecanismo de reparo dependente da via AF/BRCA. Entretanto, a atribuição dos pacientes FANCD2S-/FANCD2L- ao subtipo FA-D2 requer a confirmação por métodos que identifiquem a mutação deletéria no gene *FANCD2*, tal como sequenciamento de seu respectivo DNA complementar (JOENJE, PALS e ZWAAN, 2004).

Cinco dos 84 pacientes (5,9%) apresentaram o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+, ou seja, mostraram tanto a isoforma S quanto a isoforma L da FANCD2. Considerando esse fenótipo, em conjunto com o resultado positivo do teste do DEB e os dados clínicos, estes pacientes podem ser atribuídos a um dos grupos de complementação que atuam a jusante da monoubiquitinação da FANCD2. Outra possibilidade para justificar este fenótipo em pacientes DEB+ é a ocorrência de reversão somática, ou seja, a presença de mosaicismo. Existe ainda a possibilidade de estes pacientes apresentarem outras síndromes com características clínicas semelhantes à AF e também caracterizadas por números aumentados de quebras cromossômicas, como a *Nijmegen Breakage Syndrome* (NBS), conforme proposto por Nakanishi et al. (2002).

No estudo realizado por Soulier et al. (2005) foi observado o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ em 8 dos 53 pacientes analisados. Estes dados da literatura não apresentam diferença estatisticamente significativa no nível de significância de 5% ( $p=0,1315$ ) em relação aos dados obtidos no presente estudo (5/84).

Somente um destes cinco pacientes com a presença de ambas as bandas no *Western Blot* (FANCD2S+/FANCD2L+) e DEB+ mostrou uma porcentagem de reversão de 4% (P4) o que não sugere a presença de mosaicismo somático neste paciente. Uma das hipóteses para explicar este caso é a presença de mutações deletérias em genes que atuam a jusante da etapa de monoubiquitinação da FANCD2. É importante ressaltar que nos quatro pacientes DEB+, FANCD2S+/FANCD2L+ e com porcentagem de reversão sugestiva de mosaicismo devemos considerar também a possibilidade de alterações funcionais em proteínas de atuação a jusante da monoubiquitinação

da FANCD2. Até o presente, três dos genes que codificam estas proteínas já foram descritos: o *FANCD1/BRCA2*, o *FANCI* e o *FANCD2*.

Pacientes pertencentes aos grupos de complementação FA-D1/BRCA2 e FA-N apresentam uma evolução da doença mais rápida e mais grave, um alto risco de desenvolver LMA e ainda o aparecimento precoce de outras neoplasias malignas (WAGNER et al., 2004; REID et al., 2007). Algumas destas características podem ser encontradas entre alguns dos pacientes com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ e DEB+ apresentados na tabela 5, como P8, P53, P60. Aparentemente pacientes do grupo FA-J não diferem clinicamente dos demais pacientes AF, contudo um número muito pequeno destes pacientes foi estudado até o presente (GODTHELP et al., 2006).

Levando-se em consideração a disponibilidade do anticorpo antiBRCA2, estes cinco pacientes FANCD2S+/FANCD2L+ foram submetidos à pesquisa desta proteína pela mesma metodologia de *Western Blot* proposta para FANCD2. Nenhum deles apresentou alterações na expressão da proteína BRCA2 o que permite levantar a hipótese de eles pertencerem a outros grupos de complementação, tais como FA-J, FA-N ou novos grupos de atuação a jusante que ainda não foram identificados. Entretanto, recomenda-se que a exclusão destes pacientes do grupo FA-D1 deva ser corroborada por meio de análises moleculares que comprovem a ausência de mutação deletéria no gene *BRCA2*.

Considerando o mosaïcismo somático como uma outra hipótese para justificar a presença da banda L, forma monoubiquitinada da FANCD2, foi verificado que quatro dos cinco pacientes com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ (P53, P60, P73, P93) apresentaram, no teste do DEB, um índice de quebras cromossômicas compatível com o diagnóstico da AF. Porém, essas alterações estavam presentes em um número reduzido de células e a porcentagem de células sem anormalidades citogenéticas, definida como porcentagem de reversão somática, foi superior a 50% (tabela 5).

A presença do mosaïcismo na anemia de Fanconi é resultante da reversão de mutações deletérias que levam à recuperação das funções normais dos alelos em questão (HIRSCHHORN, 2003). No teste de quebras cromossômicas observa-se

a presença de duas subpopulações de linfócitos, uma delas é sensível aos agentes indutores de ligações cruzadas do DNA, enquanto a outra é resistente e corresponde a mais de 50% das células analisadas (LO TEN FOE et al., 1997; GREGORY et al., 2001). No teste de *Western Blot*, a ausência da banda correspondente à FANCD2 monoubiquitinada na subpopulação de linfócitos que carrega a mutação deletéria é mascarada pela presença da banda resultante da monoubiquitinação da FANCD2 na subpopulação linfocitária que recuperou o fenótipo normal após a reversão. Portanto, na presença do mosaicismos encontram-se as duas bandas que correspondem a ambas as isoformas da FANCD2. Sendo assim, o mosaicismos pode trazer complicações especialmente para o diagnóstico laboratorial dos pacientes, tornando os resultados dos estudos de quebras cromossômicas e do *Western blot* para FANCD2 ambíguos ou até falso-negativos.

Apesar de que os objetivos deste estudo não incluíram análises de prognóstico dos pacientes, alguns aspectos clínicos foram analisados (tabela 5). Três dos quatro pacientes que apresentaram porcentagens de reversão somática superior a 50% (P53, P60, P93), apresentavam situação hematológica grau III o que representa falha medular avançada de acordo com os parâmetros adotados neste estudo (quadro 2) e um dos quatro pacientes (P53) apresentou também malformações extensas. De acordo com a literatura, a complexidade dos defeitos celulares pode favorecer o mosaicismos somático devido ao alto grau de instabilidade genômica que é estabelecido (HOUGHTALING et al., 2003; SOULIER et al., 2005). Contudo, um destes quatro pacientes (P73) com alta porcentagem de reversão somática não apresentou aplasia medular, sendo classificado com uma situação hematológica grau I, sem necessidade de transfusões. Essa situação clínica permitiria inferir uma associação do mosaicismos somático com um melhor prognóstico no caso específico deste paciente, em função de uma sobreposição na proliferação do clone de células normais, sobre o clone de células não revertidas, assim como relatado no estudo realizado por Lo Ten Foe et al. (1997) e recentemente por Soulier et al. (2005).



No entanto, não se sabe por quanto tempo a população de células revertidas seria capaz de manter a hematopoese e o risco de neoplasias malignas permanece, pois a população de células não revertidas continua presente e até mesmo a população de células revertidas pode ter acumulado defeitos genéticos em genes relacionados ao câncer antes de sofrerem a reversão somática (GREGORY et al., 2001). Porém, o número limitado de pacientes com este fenótipo apresentado neste estudo não permite concluir a respeito da influência do mosaicismo somático no prognóstico destes pacientes com AF.

Um outro objetivo deste estudo foi o de comparar os fenótipos FANCD2 ao índice de quebras cromossômicas e a porcentagem de reversão, parâmetros estes obtidos pelo teste de sensibilidade ao DEB. Para realizar esta análise, os pacientes foram classificados em dois grupos, com base nos fenótipos conferidos pelo *Western Blot*, conforme a presença (FANCD2S+/FANCD2L+) ou a ausência (FANCD2S+/ FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L-) da isoforma monoubiquitinada da FANCD2.

Os resultados da comparação entre os dois grupos e o índice de quebras cromossômicas não mostraram diferença significativa estatisticamente ( $p = 0,139$ ). Entretanto, o índice de quebras cromossômicas não parece ser um parâmetro adequado para analisar a possibilidade de reversão somática sugerida nos pacientes AF que apresentam o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+. Este índice corresponde ao número de quebras apresentadas pelo total de células analisadas sem considerar o número de células com anormalidades citogenéticas.

A análise comparativa da porcentagem de reversão somática observada entre os pacientes que expressam a FANCD2 monoubiquitinada (pacientes P8, P53, P60, P73 e P93 cujas características foram apresentadas na tabela 5) e os que têm ausência desta isoforma L (todos os demais pacientes estudados) revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0,006$ ). Os pacientes do grupo que expressam a isoforma L mostram porcentagens mais elevadas de células revertidas (mediana = 68%) do que os pacientes que pertencem ao grupo que não a expressam (mediana = 16%). A alta porcentagem de reversão somática

(mediana 68%) nos pacientes FANCD2S+/FANCD2L+ sugere a presença de mosaïcismo somático de células hematopoéticas embora estes resultados baseiam-se em um número muito pequeno de pacientes DEB que expressam ambas as formas da FANCD2.

Para um paciente que apresente quadro clínico sugestivo de AF e um teste de quebras cromossômicas em sangue periférico inconclusivo é recomendável confirmar o diagnóstico utilizando-se um tecido alternativo como os fibroblastos da pele. Segundo Soulier et al. (2005), o método de *Western Blot* para FANCD2 pode contribuir na pesquisa do mosaïcismo pela análise comparativa dos fenótipos FANCD2 observados tanto em amostras de sangue periférico (FANCD2S+/FANCD2L+) quanto em fibroblastos da pele.

No presente estudo também foi realizada uma análise comparativa dos parâmetros do hemograma (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, leucócitos, neutrófilos e plaquetas) entre os dois grupos de pacientes AF, aqueles que expressam a forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 (FANCD2S+/FANCD2L+) e aqueles que não a expressam (FANCD2S+/FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L-). Os resultados não mostraram qualquer influência dos fenótipos observados no *Western Blot* sobre esses valores hematimétricos ( $p > 0,05$ ). No entanto, estes resultados também devem ser interpretados com cautela devido ao pequeno número de pacientes (4/84) com porcentagem de reversão acima de 50%. Outro fato a ser considerado é que os pacientes encontravam-se em diferentes fases da doença o que dificulta a comparação de dados hematimétricos. Dentre estes quatro pacientes, um foi diagnosticado tardiamente (P93), outro apresentava longa sobrevida e boa evolução clínica (P73) e dois pacientes se encontravam em uma fase mais avançada da doença (P53 e P60).

Os resultados apresentados neste estudo indicam que a investigação do mosaïcismo de células hematopoéticas pode ser importante para o acompanhamento dos pacientes com AF. No entanto, dado o pequeno número de pacientes (5/84) com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ analisados, considera-se relevante a realização de um estudo posterior que inclua um maior número de casos com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+, no qual todos estejam em fase inicial da doença e tenham amostras

coletadas com periodicidade para possibilitar o monitoramento dos parâmetros hematológicos, das alterações citogenéticas, bem como do comprometimento da via AF/BRCA por meio da detecção das isoformas da FANCD2 pelo *Western Blot*, incluindo a investigação dos fenótipos FANCD2 em fibroblastos da pele, quando necessário. Deste modo, os resultados poderão corroborar os achados do presente estudo ou eventualmente demonstrar um efeito dos fenótipos FANCD2 sobre a evolução dos valores hematimétricos e ainda definir melhor as conseqüências do mosaicismo somático no prognóstico dos pacientes com AF.

Com a finalidade de avaliar o *Western Blot* como um teste diagnóstico, neste estudo foram determinadas a sensibilidade e a especificidade deste método empregando-se como referência o teste do DEB, que é o método padrão para o diagnóstico da anemia de Fanconi. Nesta análise foram incluídas, além das 84 amostras dos pacientes, 98 amostras de controles saudáveis. A sensibilidade obtida foi de 94% e a especificidade foi de 100%. Estes dados mostram que o método de *Western Blot* para FANCD2 é altamente confiável quanto à especificidade para o diagnóstico da AF, uma vez que todos os indivíduos que não têm a doença apresentaram o padrão normal com a presença de ambas as isoformas da FANCD2 (FANCD2S+/FANCD2L+).

A sensibilidade do *Western Blot* mostrou-se menor do que a observada no teste do DEB, uma vez que em 5 dos 84 casos positivos no método de referência observou-se o padrão normal de FANCD2 (FANCD2S+/FANCD2L+). Sendo assim o método de *Western Blot* só define o diagnóstico de AF em sangue periférico quando a ausência da FANCD2 monoubiquitinada (isoforma L) for observada. Essa menor sensibilidade se deve à capacidade do teste de quebras cromossômicas detectar pequeno número de células residuais não revertidas, enquanto no *Western Blot* a presença de ambas as isoformas da FANCD2 produzidas pelas células revertidas (normais) mascara a ausência da forma monoubiquitinada nas células com genótipo de AF.

Outro aspecto que contribui para a diminuição da sensibilidade do *Western Blot* é inerente à própria limitação deste método, o qual detecta somente alterações

nas proteínas que agem nas etapas da formação do complexo principal AF até a etapa de monoubiquitinação da FANCD2. Portanto, nos pacientes DEB+ com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ deve-se investigar alterações nos genes *FANCD1*, *FANCI* e *FANCN* ou nos seus respectivos produtos. Neste estudo 5,9% dos casos estudados (5/84) pelo *Western Blot* não foram conclusivos (IC 95% = 0,89 a 11,1%). Além disso, um estudo de Shimamura et al. (2002) ressaltou a importância deste método para a confirmação diagnóstica de pacientes cujas características clínicas são típicas, mas com índices de quebras cromossômicas intermediários que não permitem um resultado conclusivo no teste do DEB.

A identificação das isoformas da FANCD2 pelo *Western Blot* e a definição dos respectivos fenótipos da FANCD2 nos pacientes incluídos neste estudo foi corroborada pela definição dos subtipos da anemia de Fanconi previamente realizada, por ensaios de complementação ou por técnicas de sequenciamento, em 34 destes 84 pacientes. Quando comparados os resultados obtidos pelo método de *Western Blot* com os subtipos da AF já conhecidos constatou-se que 26 dos 34 (76,4%) pacientes pertenciam ao subtipo FA-A e apresentavam um fenótipo concordante (FANCD2S+/FANCD2L-), que localiza o defeito a montante da etapa de monoubiquitinação da FANCD2 na via AF/BRCA, justamente onde participa o produto alélico do gene *FANCA*.

É importante mencionar que em um estudo anterior 19 destes 26 pacientes foram incluídos no grupo FA-A por apresentarem a mutação 3788-3790del, a qual apresenta uma frequência elevada nos pacientes brasileiros (MAGDALENA et al., 2005). Os outros 7 dos 26 pacientes FANCD2S+/FANCD2L- foram atribuídos ao subtipo FA-A por meio de estudos de complementação ou pesquisa de mutações, os quais foram realizados pela Dr.<sup>a</sup> Arleen Auerbach na Universidade de Rockefeller (EUA) e pelo Dr. Gerard Pals no Centro Médico Universitário VU (Holanda).

Da mesma forma, os outros cinco dos 34 pacientes tiveram seus subtipos identificados pelos mesmos pesquisadores supracitados. Destes, um paciente foi incluído no grupo FA-C (3,0%), três pacientes no grupo FA-G (8,8%) e um no grupo FA-E (3,0%). O fenótipo FANCD2S+/FANCD2L- observado nestes cinco pacientes, que

denota a ausência da forma monoubiquitinada da FANCD2, é condizente com esses subtipos cujas proteínas também participam da formação do complexo principal da AF. A frequência mais baixa dos grupos de complementação FA-C, FA-G e FA-E em contraste à frequência elevada do subtipo FA-A está em conformidade com dados publicados por outros pesquisadores (KUTLER et al., 2003; LEVITUS et al., 2004).

Não foi possível atribuir dois dos 34 (5,8%) pacientes, que apresentaram o fenótipo FANCD2S-/FANCD2L- a nenhum dos grupos de complementação mais comuns (FA-A, C, E, F e G). Portanto, eles foram classificados como "não identificados". Apesar de o grupo de complementação FA-D2 não ter sido investigado nestes pacientes, o fato de eles apresentarem o fenótipo FANCD2S-/FANCD2L- sugere que sejam incluídos no subtipo FA-D2 devido à ausência de ambas isoformas desta proteína no *Western Blot*. Contudo, esta atribuição ao grupo FA-D2 deve ser confirmada pela pesquisa direta da mutação no gene *FANCD2* por métodos moleculares.

E, finalmente, um dos 34 pacientes (3,0%) que foi subtipificado e atribuído ao grupo de complementação FA-A apresentou o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ (P73 – tabela 5). Este resultado aparentemente discordante do *Western Blot* pode ser sugestivo de um caso de mosaïcismo. Neste paciente, o teste do DEB em sangue periférico revelou a presença de quebras cromossômicas em apenas 6 das 25 células analisadas mostrando um valor de reversão somática de 76%. Apesar das poucas células comprometidas apresentarem várias alterações citogenéticas significativas, inclusive figuras radiais que são características da anemia de Fanconi, a elevada porcentagem de células revertidas produzindo níveis significativos de ambas isoformas da FANCD2 pode explicar o padrão normal observado no *Western Blot*.

Os resultados do presente estudo corroboram a importância da utilização do método de *Western Blot*, que, em associação com o teste de sensibilidade ao DEB, complementa o diagnóstico laboratorial da anemia de Fanconi. A elevada especificidade confirma sua utilidade como um método confirmatório.

Outra contribuição relevante do *Western Blot* é no esclarecimento de casos de mosaïcismo sugerido pela presença do fenótipo FANCD2 normal e de reversão somática

no teste do DEB em sangue periférico. Entretanto, a confirmação do mosaicismo requer a análise de tecidos não hematopoéticos. Soulier et al. (2005) demonstraram a maior eficiência do *Western Blot* para FANCD2 em comparação com testes de quebras cromossômicas para a análise de fibroblastos de pele.

Uma das grandes vantagens do método do *Western Blot* para FANCD2 é que ele permite identificar qual a etapa da via AF/BRCA está comprometida pela presença de um produto gênico resultante de uma mutação deletéria. Esta característica possibilita uma pré-classificação dos pacientes, ou seja, indica se o gene envolvido codifica um produto de atuação a montante da etapa de ubiquitinação da proteína FANCD2, durante a etapa de monoubiquitinação ou a jusante desta etapa. A pré-classificação é de grande valia porque direciona e restringe o número de genes a serem investigados, uma vez que os métodos para a identificação de mutações na AF são, em sua maioria, laboriosos e de alto custo, o que dificulta sua utilização para a investigação abrangente de todos os genes AF.

Considera-se de interesse a realização de estudos futuros que levem à identificação dos genes envolvidos e de suas respectivas mutações. Estas informações possibilitarão investigar se a etapa da via AF/BRCA comprometida e ou se tipos específicos de mutações deletérias exercem influência sobre o espectro de manifestações clínicas e a evolução dos pacientes brasileiros com anemia de Fanconi.

## 7 CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos pelo método de *Western Blot*, em conjunto com os resultados do DEB e os parâmetros clínicos, permitiram identificar a fase do mecanismo AF/BRCA que se encontra alterada nos pacientes analisados. Eles foram pré-classificados em três classes fenotípicas com base na presença ou ausência da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2. O fenótipo mais comumente observado foi o FANCD2S+/FANCD2L-, com uma frequência de 91,7%, representando os pacientes com ausência da forma monoubiquitinada da FANCD2. O fenótipo FANCD2S-/FANCD2L-, encontrado com frequência de 2,4%, corresponde àqueles que não expressam a FANCD2. E o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+, que mostrou uma frequência de 5,9%, está presente naqueles que expressam normalmente a proteína, inclusive a sua forma monoubiquitinada.
2. Nenhum dos pacientes com fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ (5/84), submetidos à pesquisa da BRCA2, apresentou alterações na expressão dessa proteína. Estes dados sugerem que estes pacientes podem pertencer a outros subtipos AF de atuação a jusante da fase de monoubiquitinação da FANCD2, tais como FA-J e FA-N, ou ainda que estes fenótipos sejam decorrentes da presença de mosaïcismo somático. Devido ao pequeno número de pacientes FANCD2S+/FANCD2L+, recomenda-se a corroboração deste resultado em uma amostra que inclua um número maior de pacientes com este fenótipo.
3. O grupo de pacientes que expressam ambas as isoformas da FANCD2 mostraram um número significativamente mais elevado de células revertidas (mediana = 68%) quando comparados ao grupo com ausência da FANCD2 monoubiquitinada (mediana = 16%,  $p=0,006$ ), o que sugere a presença de mosaïcismo somático de células hematopoéticas. Os resultados da reversão somática dos pacientes FANCD2S+/FANCD2L+

não permitem excluir a possibilidade de os fenótipos AF estarem sendo mascarados pelas células revertidas, e a confirmação dos resultados requer a análise em outro tecido que não o hematopoético.

4. A comparação dos parâmetros do hemograma (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, leucócitos, neutrófilos e plaquetas) entre os pacientes que expressam a forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 (FANCD2S+/ FANCD2L+) e aqueles que não expressam (FANCD2S+/ FANCD2L- e FANCD2S-/FANCD2L-) mostrou não haver qualquer influência desses fenótipos sobre os valores hematimétricos ( $p>0,05$ ). Considera-se importante a realização de um novo estudo que inclua maior número de pacientes com fenótipos FANCD2S+/FANCD2L+, em fase inicial da doença e as amostras coletadas com periodicidade para monitorar os valores hematimétricos, as alterações citogenéticas e as isoformas da FANCD2.
5. A análise do método de *Western Blot* para FANCD2 como teste diagnóstico para anemia de Fanconi, tomando-se como referência o Teste do DEB que é o padrão ouro, permitiu determinar uma sensibilidade de 94% e especificidade de 100%. A alta especificidade lhe confere confiabilidade como teste confirmatório, uma vez que todos os indivíduos sem a doença apresentam padrão normal da FANCD2 (FANCD2S+/ FANCD2L+). O *Western Blot* foi inconclusivo em 5,9% dos casos positivos no método de referência (IC = 0,89 a 11,01%). Isso se deve ao fato de que a confirmação diagnóstica pelo *Western Blot* é possível somente quando a isoforma monoubiquitinada da FANCD2 está ausente (FANCD2S+/FANCD2L- ou FANCD2S-/ FANCD2L-).



## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. Variação Genética. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999. p.282-318.
- ALTER, B. P. Cancer in Fanconi anemia. **Cancer**, v.97, p.425-440, 2003.
- APOSTOLOU, S. et al. Positional cloning of the Fanconi Anaemia Group C gene. **Nature Genetics**, v.14, p.324, 1996.
- AUERBACH, A. D. Fanconi anemia diagnosis and diepoxibutane (DEB) test. **Experimental Hematology**, v.21, p.731-733, 1993.
- AUERBACH, A. D. et al. Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. **Human Mutation**, v.21, p.158-168, 2003.
- AUERBACH, A. D.; ADLER, B.; CHAGANTI, R. S. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by cytogenetic method. **Pediatrics**, v.67, n.1, p.128-135, 1981.
- AUERBACH, A. D.; ROGATKO, A.; SCHROEDER, T. M. International Fanconi anemia Registry (IFAR): relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. **Blood**, v.73, n.2, p.391-396, 1989.
- BAGBY, G. C. et al. Marrow Failure. **Hematology/American Society Hematology Educational Program**, p.318-328, 2004.
- BAGBY, G. C.; ALTER, B. P. Fanconi anemia. **Seminars in Hematology**, v.43, n.3, p.147-156, 2006.
- BOGLIOLO, M. et al. The Fanconi anemia genome stability and tumor suppressor network. **Mutagenesis**, v.17, n.6, p.529-538, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248, 1976.
- BUTTURINI, A. et al. Hematologic Abnormalities in Fanconi Anemia: An International Fanconi Anemia Registry Study. **Blood**, v.84, n.5, p.1650-1655, 1994.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN R. E. Replication, Maintenance and Rearrangement of Genomic DNA. In: \_\_\_\_\_. **The Cell: A Molecular Approach**. Boston: ASM Press and Sinauer Associates, 2006. p.201-252.
- CUMMING, R.C. et al. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through regulation of GSTP1. **Nature Medicine**, v.7, p.814-820, 2001.
- D'ANDREA, A. D.; GROMPE, M. Molecular biology of Fanconi anemia: Implications for Diagnosis and therapy. **Blood**, v.90, n.5, p.1725-1736, 1997.

D'ANDREA, A. D.; GROMPE, M. The Fanconi anemia /BRCA pathway. **Nature Review Cancer**, v.3, p.23-34, 2003.

DOSIK, H; STEIER, W; LUBINIECKI, A. inherited aplastic anaemia with increased endoreduplications: a new syndrome of Fanconi's anaemia variant? **British Journal of Haematology**, v.41, p.77-82, 1979.

FAGERLIE, S. et al. The Fanconi anemia group C gene product: Signaling functions in hematopoietic cells. **Experimental Hematology**, v.29, p.1372-1381, 2001.

FAIVRE, L. C. et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. **Blood**, v.96, n.13, p.4064-4070, 2000.

FANCONI, G. Familiäre infantile perniziosartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). **Jahrbuch für Kinderheil Kunde**, v.117, p.257-280, 1927.

FANCONI, G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's Anemia (F.A.). Clinical aspects. **Seminars in Hematology**, v.4, p.233-240, 1967.

GARCIA-HIGUERA, I. et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. **Molecular Cell**, v.7, p.249-262, 2001

GLUCKMAN, E. et al. Bone Marrow Transplantation in Fanconi anaemia. **British Journal of Haematology**, v.45, n.4, p.557-564, 1980.

GODTHELP, B. C. et al. Inducibility of nuclear RAD51 foci after DNA damage distinguishes all Fanconi anemia complementation groups from DI/BRCA2. **Mutation Research**, v.594, p.39-48, 2006.

GREGORY, J. J. et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.5, p.2532-2537, 2001.

GREGORY, R. C.; TANIGUCHI, T.; D'ANDREA, A. D. Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. **Seminars in Cancer Biology**, v.13, p.77-82, 2003.

GROMPE, M.; D'ANDREA, A. Fanconi anemia and DNA repair. **Human Molecular Genetics**, v.10, p.2253-2259, 2001.

GROSS, M. et al. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. **Cytogenet Genome Research**, v.98, p.126-130, 2002.

GUARDIOLA, Ph. et al. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for blood and Marrow Transplantation. **Blood**, v.95, n.2, p.422- 429, 2000.

GURTAN, M. A. et al. The WD-40 repeats of FANCL are required for Fanconi anemia core complex assembly. **Journal of Biological Biochemistry**, v.281, n.16, p.10896-10905, 2006.

GURTAN, M. A.; D'ANDREA, A. D. Dedicated to the core: Understanding the Fanconi anemia complex. **DNA repair**, v.5, n.9-10, p.1119-1125, 2006.

HIRSCHHORN, R. In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. **Journal of Medical Genetics**, v.40, p.721-728, 2003.

HOATLIN, M.E. et al. The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells. **Blood**, v.91, n.4, p.1418-1425, 1998.

HOUGHTALING, S. et al. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. **Genes & Development**, v.17, p.2021-2035, 2003.

HOWLETT, N. G. et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. **Science**, v.297, p.606-609, 2002.

HUSSAIN, S. et al. Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2:FANCD1. **Human Molecular Genetics**, v.12, n.19, p.2503-2510, 2003.

JACKOBS, P. M. et al. Complementation group assignment in Fanconi anemia fibroblast cell lines from North America. **Somatic Cell Molecular Genetics**, v.23, p.1-7, 1997.

JOENJE, H. et al. Complementation Analysis in Fanconi Anemia: Assignment of the reference FA-H patient to group A. **American Journal of Human Genetics**, v.67, p.759-762, 2000.

JOENJE, H.; PALS, G.; ZWAAN, M.; Fanconi Anemia. In: \_\_\_\_\_. **Encyclopedia of Diagnostic and Proteomics**. New York: Marcel Dekker Inc., 2004. p.1-5.

JOENJE, H.; PATEL, K. J. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. **Nature Reviews Genetics**, v.2, p.446-457, 2001.

KUTLER, D. I. et al. 20-years perspective on the International Fanconi Anemia Register (IFAR). **Blood**, v.101, p.1249-1256, 2003.

LEVITUS, M. et al. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. **Blood**, v.103, p.2498-2503, 2004.

LEVITUS, M. et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. **Nature Genetics**, v.37, n.9, p.934-935, 2005.

LEVRAN, O. et al. Sequence variation in Fanconi anemia gene *FAA*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.13051-13056, 1997.

LEVRAN, O. et al. Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. **Human Mutation**, v.25, p.142-149, 2005.

LIU, N. et al. The human XRCC9 gene corrects chromosomal instability and mutagen sensitivities in CHO UV40 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.9232-9237, 1997.

LO TEN FOE, J. R. et al. Expression cloning of cDNA for the major Fanconi anaemia gene, *FAA*. **Nature Genetics**, v.14, p.320-323, 1996.

LO TEN FOE, J. R. et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. **European Journal of Human Genetics**, v.5, p.137-148, 1997.

- MacMILLAN, M. L. et al. Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of total body irradiation dose escalation trial. **British Journal of Haematology**, v.109, n.1, p.121-129, 2000.
- MAGDALENA, N. et al. Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the *FANCA* 3788-3790del mutation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.5, p.669-673, 2005.
- MEDHURST, A. L. et al. Evidence of subcomplexes in the Fanconi pathway. **Blood**, v.108, p.2072-2079, 2006.
- MEETEI, A. R. et al. A novel ubiquitin ligase is defective in Fanconi anemia. **Nature Genetics**, v.35, n.2, p.165-170, 2003.
- MEETEI, A. R. et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. **Nature Genetics**, v.36, n.11, p.1219-1224, 2004.
- MEETEI, A. R. et al. Human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. **Nature Genetics**, v.37, n.9, p.958-963, 2005.
- MONTES DE OCA, R. et al. Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, *FANCD2*, with chromatin. **Blood**, v.105, n.3, p.1003-1009, 2005.
- NAKANISHI, K. et al. Interaction of *FANCD2* and *NBS1* in the DNA damage response. **Nature Cell Biology**, v.4, p.913-920, 2002.
- NAKANISHI, K. et al. Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.4, p.1110-1115, 2005.
- PACE, P. et al. FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. **European Molecular Biology Organization Journal**, v.21, n.13, p.3414-3423, 2002.
- PASQUINI, R.; ZANIS-NETO, J. Anemia de Fanconi. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.169-179.
- PICKART, C. M. Ubiquitin enters the new millennium meeting review. **Molecular Cell**, v.8, p.499-504, 2001.
- PULSIPHER, M. et al. Subtyping analysis of Fanconi anemia by immunoblotting and retroviral gene transfer. **Molecular Medicine**, v.4, p.468-479, 1998.
- RAHMAN, N. et al. *PALB2*, which encodes a *BRCA2*-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nature Genetics**, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/naturegenetics>>. Acesso em: 25 jan. 2007.
- REID, S. et al. Biallelic mutations in *PALB2* cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. **Nature Genetics**, v.39, n.2, p.162-164, 2007.
- RISINGER, M. A.; GRODEN, J. Crosslinks and crosstalk: Human cancer syndromes and DNA repair defects. **Cancer Cell**, v.6, p.539-545, 2004.

ROSENBERG, P. S.; GREENE, M. H.; ALTER, B. P. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. **Blood**, v.101, n.3, p.822-826, 2003.

SCHROEDER, T. M. et al. Formal genetics of Fanconi's anemia. **Human Genetics**, v.32, n.3, p.257-288, 1976.

SCHROEDER, T. M.; ANSCHUTZ, F.; KNOPP, A. Spontane chromosomen-abberationem bei familiarer panmyelopathie. **Human Genetics**, v.1, p.194-196, 1964.

SEYSCHAB, H. et al. G2 phase cell cycle disturbance as manifestation of genetic cell damage. **Human Genetics**, v.92, p.61-68, 1993.

SHIMAMURA, A. et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. **Blood**, v.100, n.13, p.4649-4654, 2002.

SHIMAMURA, A. Inherited bone marrow failure syndromes: molecular features. **Hematology/American Society Hematology Educational Program**, p.63-71, 2006.

SMOGORZEWSKA, A. et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. **Cell**, v.129, p.1-13, 2007.

SOARES J. F.; SIQUEIRA, A. L. **Introdução à estatística médica**. 2.ed. Belo Horizonte: UFMG- Coopmed, 2002. 300p.

SOBECK, A. et al. Fanconi anemia proteins are required to prevent accumulation of replication-associated DNA double-strand breaks. **Molecular and Cellular Biology**, v.26, n.2, p.425-437, 2006.

SOULIER, J. et al. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. **Blood**, v.105, n.3, p.1329-1336, 2005.

STRATHDEE, C. A. et al. Cloning of cDNAs for Fanconi anaemia by functional complementation. **Nature**, v.356, p.763-767, 1992.

TANIGUCHI, T. et al. S-phase specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. **Blood**, v.100, n.7, p.2414-2420, 2002.

TANIGUCHI, T.; D'ANDREA, A. D. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. **Blood**, v.107, n.11, p.4223-4233, 2006.

TIMMERS, C. et al. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, *FANCD2*. **Molecular Cell**, v.7, p.241-248, 2001.

WAGNER, J. E. et al. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. **Blood**, v.103, n.8, p.3226-3229, 2004.

WAISFISZ, Q. et al. Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. **Nature genetics**, v.22, p.379-383, 1999.

WANG, X.; D'ANDREA, A. D. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. **DNA Repair**, v.3, p.1063-1069, 2004.

WHITNEY, M. et al. The Ashkenazi Jewish Fanconi anemia mutation: incidence among patients and carrier frequency in the at-risk population. **Human Mutation**, v.3, p.339-341, 1994.

WHITNEY, M.; THAYER, M; REIFSTECK, C. et al. Microcell mediated chromosome transfer maps the Fanconi anemia group D gene to chromosome 3p. **Nature Genetics**, v.11, n.3, p.341-343, 1995.

WINTER, J. P. et al. The Fanconi anemia group G gene *FANCG* is identical with *XRCC9*. **Nature Genetics**, v.20, p.281-283, 1998.

WINTER, J. P. et al. Isolation of cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. **American Journal of Human Genetics**, v.67, p.1306-1308, 2000(a).

WINTER, J. P. et al. The Fanconi anemia gene *FANCF* encodes a novel protein with homology to ROM. **Nature Genetics**, v.24, p.15-16, 2000(b).

WINTER, J. P. et al. The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. **Human Molecular Genetics**, v.9, p.2665-2674, 2000(c).

XIA, B. et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. **Nature Genetics**, v.39, p.159-161, 2007.

ZAKRZEWSKI, S.; SPERLING, K. Genetic Heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. **Human Genetics**, v.56, p.81, 1980.

ZANIS-NETO, J. et al. Low-dose cyclophosphamide conditioning for haematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors in patients with Fanconi anemia. **British Journal of Haematology**, v.130, p.99-106, 2005.

## APÊNDICES

**APÊNDICE 1**  
**DADOS GERAIS DOS PACIENTES**



## DADOS GERAIS DOS PACIENTES

continua

| ID  | REGISTRO HC | SEXO | GRUPO ÉTNICO | IDADE (estudo) | IDADE (diagn.) | IDADE (citopenia) | SIT. HEMAT. | EXTEN. MALFORM. | N.º DE TRANSF. | GRUPO DE COMPL.   |
|-----|-------------|------|--------------|----------------|----------------|-------------------|-------------|-----------------|----------------|-------------------|
| P1  | 18670593    | F    | Branca       | 6              | 4              | 2                 | III         | E               | <20            | NI <sup>1,2</sup> |
| P2  | 17225456    | F    | Branca       | 17             | 12             | ND                | II          | L               | NT             | NR                |
| P4  | 19387950    | F    | Branca       | 8              | 7              | NA                | I           | L               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P5  | 15097779    | F    | Branca       | 16             | 16             | ND                | II          | L               | <20            | NR                |
| P6  | 19128431    | F    | Branca       | 10             | 7              | 8                 | III         | L               | <20            | NR                |
| P7  | 18406470    | F    | Mulata       | 11             | 9              | 9                 | III         | L               | >20            | FA-C <sup>2</sup> |
| P8  | 19634779    | M    | Branco       | 13             | 13             | 12                | III         | L               | >20            | NR                |
| P9  | 19674096    | F    | Mulata       | 7              | 7              | 6                 | II          | E               | <20            | NR                |
| P10 | 18773821    | F    | Mulata       | 8              | 6              | 6                 | III         | L               | >20            | FA-A <sup>2</sup> |
| P11 | 19136094    | F    | Mulata       | 10             | 3              | 3                 | III         | E               | >20            | NR                |
| P12 | 18904349    | F    | Branca       | 18             | 15             | 16                | II          | E               | <20            | FA-A <sup>1</sup> |
| P13 | 19468135    | F    | Branca       | 11             | 8              | 11                | III         | L               | >20            | NR                |
| P14 | 19174603    | F    | Branca       | 12             | 9              | 8                 | II          | E               | <20            | NR                |
| P15 | 18697599    | F    | Branca       | 6              | 1              | 1                 | III         | E               | <20            | NR                |
| P16 | 19516377    | F    | Branca       | 14             | 14             | 12                | III         | E               | <20            | NR                |
| P17 | 19710220    | M    | Branco       | 13             | 3              | NA                | I           | L               | NT             | NR                |
| P18 | 16917303    | M    | Mulato       | 17             | 12             | 11                | III         | L               | >20            | FA-A <sup>2</sup> |
| P19 | 18304074    | F    | Branca       | 23             | 20             | ND                | II          | L               | <20            | NR                |
| P20 | 16671576    | M    | Branco       | 22             | 17             | ND                | II          | L               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P21 | 18267659    | F    | Branca       | 12             | 9              | 9                 | II          | AU              | <20            | FA-A <sup>3</sup> |
| P22 | 18878240    | F    | Branca       | 17             | 15             | ND                | II          | E               | <20            | NR                |
| P23 | 15982268    | F    | Branca       | 7              | 10m            | 1                 | II          | L               | <20            | FA-A <sup>1</sup> |
| P24 | 19025420    | F    | Mulata       | 23             | 21             | 21                | II          | L               | <20            | NR                |
| P25 | 19643778    | F    | Branca       | 2              | 2              | 2                 | III         | E               | >20            | NR                |
| P26 | 19397025    | F    | Branca       | 20             | 19             | NA                | I           | AU              | NT             | NR                |
| P27 | 18544970    | M    | Branco       | 10             | 11             | ND                | III         | L               | >20            | FA-A <sup>3</sup> |
| P28 | 19497127    | M    | Branco       | 6              | 5              | 4                 | II          | L               | NT             | NR                |
| P29 | 19138585    | F    | Branca       | 10             | 9              | 9                 | II          | E               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P30 | 18027453    | F    | Branca       | 15             | 11             | 13                | II          | L               | <20            | FA-A <sup>1</sup> |
| P31 | 17476483    | F    | Mulata       | 7              | 2              | 1                 | II          | L               | <20            | FA-E <sup>1</sup> |

## DADOS GERAIS DOS PACIENTES

continua

| ID  | REGISTRO HC | SEXO | GRUPO ÉTNICO | IDADE (estudo) | IDADE (diagn.) | IDADE (citopenia) | SIT. HEMAT. | EXTEN. MALFORM. | N.º DE TRANSF. | GRUPO DE COMPL.   |
|-----|-------------|------|--------------|----------------|----------------|-------------------|-------------|-----------------|----------------|-------------------|
| P32 | 19009106    | M    | Branco       | 7              | 6              | 8                 | III         | L               | >20            | FA-A <sup>3</sup> |
| P33 | 15816538    | M    | Mulato       | 13             | 6              | ND                | III         | L               | <20            | NR                |
| P34 | 18080443    | F    | Branca       | 29             | 25             | ND                | II          | L               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P35 | 18659271    | M    | Branco       | 3              | 1              | 3                 | II          | L               | NT             | FA-G <sup>1</sup> |
| P36 | 19885739    | M    | Branco       | 12             | 5              | 4                 | III         | E               | <20            | NR                |
| P38 | 15487755    | M    | Mulato       | 13             | 5              | 11                | II          | E               | NT             | NR                |
| P39 | 15411554    | M    | Mulato       | 25             | 12             | 12                | III         | AU              | >20            | NR                |
| P40 | 19941019    | M    | Mulato       | 11             | 10             | 10                | II          | E               | NT             | NR                |
| P42 | 19905489    | F    | Branca       | 10             | 10             | 8                 | II          | L               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P43 | 19949451    | M    | Branco       | 12             | 6              | ND                | II          | E               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P44 | 19959686    | M    | Mulato       | 12             | 12             | ND                | II          | L               | NT             | NR                |
| P45 | 19994260    | M    | Mulato       | 6              | 6              | NA                | I           | L               | NT             | NR                |
| P47 | 17192019    | F    | Mulata       | 18             | 11             | 11                | III         | E               | >20            | FA-A <sup>1</sup> |
| P48 | 20005904    | M    | Mulato       | 20             | 5              | 5                 | II          | L               | NT             | NR                |
| P50 | 18026570    | M    | Branco       | 7              | 3              | ND                | II          | E               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P52 | 20201207    | M    | Branco       | 11             | 7              | 7                 | II          | E               | NT             | NR                |
| P53 | 20182350    | F    | Branca       | 8              | 8              | 8                 | III         | E               | >20            | NR                |
| P54 | 20208244    | F    | Branca       | 11             | 11             | 11                | II          | L               | <20            | NR                |
| P55 | 20227826    | M    | Branco       | 8              | 8              | 9                 | III         | L               | <20            | NR                |
| P56 | 19388174    | M    | Branco       | 6              | 5              | NA                | I           | E               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P59 | 20036877    | M    | Branco       | 2              | 2              | NA                | I           | E               | NT             | NR                |
| P60 | 20267836    | F    | Branca       | 6              | 6              | 6                 | III         | L               | <20            | NR                |
| P61 | 19251837    | F    | Branca       | 5              | 3              | ND                | II          | L               | <20            | NR                |
| P62 | 19024393    | M    | Mulato       | 16             | 14             | 16                | III         | L               | >20            | FA-A <sup>3</sup> |
| P63 | 18309157    | F    | Branca       | 5              | 6 m            | NA                | I           | E               | NT             | NI <sup>1</sup>   |
| P64 | 20358017    | F    | Branca       | 14             | 7              | NA                | I           | L               | NT             | NR                |
| P65 | 20358041    | F    | Branca       | 12             | 11             | ND                | III         | L               | >20            | NR                |
| P66 | 19949478    | F    | Branca       | 2              | 1              | NA                | I           | AU              | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P67 | 20378514    | F    | Mulata       | 8              | 8              | 8                 | III         | E               | >20            | NR                |
| P68 | 20378425    | M    | Mulata       | 12             | 11             | 11                | III         | E               | <20            | NR                |

## DADOS GERAIS DOS PACIENTES

conclusão

| ID  | REGISTRO HC | SEXO | GRUPO ÉTNICO | IDADE (estudo) | IDADE (diagn.) | IDADE (citopenia) | SIT. HEMAT. | EXTEN. MALFORM. | N.º DE TRANSF. | GRUPO DE COMPL.   |
|-----|-------------|------|--------------|----------------|----------------|-------------------|-------------|-----------------|----------------|-------------------|
| P69 | 20390778    | F    | Branco       | 18             | 17             | 17                | II          | L               | <20            | NR                |
| P70 | 18417367    | M    | Mulata       | 34             | 30             | ND                | II          | AU              | NT             | NR                |
| P71 | 17393090    | F    | Branca       | 7              | 1              | ND                | II          | L               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P72 | 20406399    | F    | Branca       | 7              | 6              | 6                 | II          | E               | <20            | NR                |
| P73 | 15055391    | F    | Branca       | 25             | 15             | NA                | I           | AU              | NT             | FA-A <sup>1</sup> |
| P74 | 20397853    | F    | Branca       | 5              | 6              | 6                 | II          | E               | NT             | NR                |
| P76 | 20424524    | M    | Branco       | 5              | 6              | 3                 | III         | L               | <20            | NR                |
| P77 | 20424486    | M    | Mulato       | 22             | 15             | 15                | III         | AU              | >20            | NR                |
| P78 | 19497143    | M    | Mulato       | 4              | 2              | ND                | II          | L               | NT             | NR                |
| P79 | 20455390    | M    | Branco       | 5              | 5              | 1                 | III         | E               | <20            | NR                |
| P80 | 17552848    | F    | Branca       | 17             | 4              | ND                | II          | L               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P81 | 20455284    | F    | Branca       | 16             | 10             | 10                | II          | AU              | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P82 | 19205134    | F    | Mulata       | 28             | 11             | NA                | I           | L               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P83 | 16562769    | M    | Branco       | 20             | 10             | 10                | III         | E               | <20            | NR                |
| P84 | 18218151    | F    | Mulata       | 5              | 3m             | ND                | II          | L               | NT             | NR                |
| P85 | 20529520    | M    | Branco       | 5              | 5              | ND                | II          | E               | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P87 | 20522496    | F    | Branca       | 24             | 24             | 23                | III         | L               | <20            | NR                |
| P88 | 17813277    | M    | Branco       | 6              | 2              | ND                | II          | L               | NT             | FA-A <sup>1</sup> |
| P89 | 20585927    | M    | Mulato       | 5              | 5              | ND                | III         | L               | <20            | FA-G <sup>1</sup> |
| P90 | 20585935    | M    | Mulato       | 4              | 4              | NA                | I           | L               | NT             | FA-G <sup>1</sup> |
| P91 | 17704745    | F    | Branca       | 9              | 3              | NA                | I           | AU              | NT             | FA-A <sup>3</sup> |
| P92 | 20638613    | F    | Branca       | 13             | 13             | 12                | III         | L               | <20            | NR                |
| P93 | 20622695    | F    | Branca       | 15             | 15             | 15                | III         | AU              | <20            | NR                |
| P96 | 20750863    | M    | Branco       | 12             | 6              | 6                 | III         | L               | >20            | NR                |

NOTA: Situação hematológica grau I = sem falha medular; grau II - falha inicial; grau III - falha avançada; extensão das malformações; AU = ausente; L = limitada (<3 sítios) e E = extensa (3 ou mais sítios); NA = não aplicável; ND = informação não disponível; NI= não identificada mutação entre os grupos pesquisados; NR = não realizado (1) Rockefeller University, Nova Iorque – EUA; (2) VU University Medical Center, Amsterdam – Holanda; (3) Hospital de Clínicas, UFPR – Brasil.

**APÊNDICE 2**  
**DADOS E RESULTADOS DOS CONTROLES SAUDÁVEIS**

DADOS E RESULTADOS DOS CONTROLES SAUDÁVEIS ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2 E TESTE DO DEB

continua

| ID  | DATA DE NASC. | IDADES (anos) | SEXO | GRUPO ÉTNICO | RESULTADOFANCD2     | RESULTADO DEB |
|-----|---------------|---------------|------|--------------|---------------------|---------------|
| C1  | 10/05/71      | 35            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C2  | 04/05/78      | 28            | F    | Mulata       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C3  | 01/03/59      | 47            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C4  | 04/01/71      | 35            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C5  | 29/12/81      | 25            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C6  | 14/09/59      | 47            | F    | Mulata       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C7  | 14/03/70      | 36            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C8  | 21/12/71      | 35            | F    | Mulata       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C9  | 10/06/72      | 34            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C10 | 20/06/68      | 38            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C11 | 07/07/69      | 37            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C12 | 22/07/64      | 42            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C13 | 01/08/68      | 38            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C14 | 23/09/82      | 24            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C15 | 15/06/72      | 35            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C16 | 04/10/54      | 52            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C17 | 26/01/68      | 38            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C18 | 10/05/63      | 43            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C19 | 21/08/65      | 41            | F    | Mulata       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C20 | 25/01/80      | 26            | F    | Mulata       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C21 | 25/07/54      | 52            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C22 | 06/05/48      | 58            | F    | Mulata       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C23 | 01/07/89      | 17            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C24 | 16/07/82      | 24            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C25 | 30/10/61      | 45            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C26 | 09/05/56      | 50            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C27 | 08/03/80      | 26            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C28 | 30/01/78      | 28            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C29 | 28/07/52      | 54            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C30 | 24/01/78      | 28            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C31 | 16/06/67      | 39            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C32 | 09/07/48      | 58            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C33 | 24/01/71      | 35            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C34 | 10/01/66      | 40            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C35 | 19/04/68      | 38            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C36 | 12/09/69      | 37            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C37 | 30/03/71      | 35            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C38 | 21/09/68      | 38            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C39 | 28/08/87      | 19            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C40 | 19/12/56      | 50            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C41 | 23/08/71      | 35            | F    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C42 | 02/10/70      | 36            | M    | Branca       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C43 | 14/09/66      | 40            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C44 | 04/04/79      | 27            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C45 | 19/12/52      | 54            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C46 | 02/05/89      | 17            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C47 | 23/09/89      | 17            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C48 | 25/06/64      | 42            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C49 | 31/08/66      | 40            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C50 | 07/04/53      | 52            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |

DADOS E RESULTADOS DOS CONTROLES SAUDÁVEIS ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2 E TESTE DO DEB

| ID      | DATA DE NASC. | IDADES (anos) | SEXO | GRUPO ÉTNICO | RESULTADOFANCD2     | RESULTADO DEB |
|---------|---------------|---------------|------|--------------|---------------------|---------------|
| C51     | 21/07/72      | 34            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C52     | 17/11/69      | 37            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C53     | 11/03/68      | 38            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C54     | 25/08/59      | 47            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C55     | 12/03/81      | 25            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C56     | 21/11/81      | 25            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C57     | 14/07/69      | 37            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C58     | 17/05/62      | 44            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C59     | 08/08/54      | 52            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C60     | 04/10/67      | 39            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C61     | 07/06/68      | 38            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C62     | 26/09/80      | 26            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C63     | 19/04/49      | 57            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C64     | 23/10/55      | 51            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C65     | 03/10/62      | 44            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C66     | 14/08/69      | 37            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C67     | 23/12/77      | 29            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C68     | 04/02/49      | 57            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C69     | 16/01/56      | 50            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C70     | 19/11/70      | 36            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C71     | 17/01/86      | 20            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C72     | 17/09/74      | 32            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C73     | 27/10/81      | 25            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C74     | 02/06/69      | 37            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C75     | 18/06/66      | 40            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C76     | 28/10/85      | 25            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C77     | 24/09/73      | 33            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C78     | 24/09/66      | 40            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C79     | 11/10/63      | 43            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C80     | 25/03/86      | 20            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C81     | 09/10/69      | 37            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C82     | 14/06/82      | 24            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C83     | 01/02/71      | 35            | M    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C84     | 28/08/76      | 30            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C85     | 20/07/79      | 27            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C86     | 12/01/83      | 23            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C87     | 19/03/51      | 55            | F    | Branco       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C88     | 06/01/70      | 36            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C89     | 29/08/55      | 41            | F    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C90     | 10/12/61      | 45            | F    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C91     | 18/07/70      | 36            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C92     | 31/05/61      | 41            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C93     | 27/01/74      | 32            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C94     | 10/12/57      | 49            | F    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C95     | 08/09/55      | 51            | F    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C96     | 06/04/71      | 35            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C97     | 22/09/78      | 28            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| C98     | 14/02/89      | 17            | M    | Mulato       | FANCD2L+ / FANCD2S+ | Negativo      |
| n       |               | 98            |      |              |                     |               |
| Média   |               | 37            |      |              |                     |               |
| Mediana |               | 37            |      |              |                     |               |

### **APÊNDICE 3**

**RESULTADOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE  
*WESTERN BLOT* PARA FANCD2, TESTE DO DEB E ESTUDO DE GRUPOS DE  
COMPLEMENTAÇÃO/PESQUISA DE MUTAÇÕES**

RESULTADOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2, TESTE DO DEB E ESTUDO DE GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO/PESQUISA DE MUTAÇÕES

continua

| ID  | RESULTADO FANCD2      | RESULTADO DEB | ÍNDICE DE QUEBRAS | N.º CEL. C/ QUEBRAS / N.º CEL. ANALISADAS | % REVERSÃO | GRUPO DE COMPL.   | 3788-3790del | MUTAÇÕES                  | BRCA2    |
|-----|-----------------------|---------------|-------------------|---|------------|-------------------|--------------|---------------------------|----------|
| P1  | FANCD2L - / FANCD2S - | Positivo      | 6,7               | 10/10                                     | 0          | NI <sup>1,2</sup> | Negativo     |                           | Positivo |
| P2  | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,27              | 11/11                                     | 0          |                   | Negativo     |                           |          |
| P4  | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,24              | 21/25                                     | 16         | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del heterozigoto | Positivo |
| P5  | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,08              | 21/25                                     | 16         |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P6  | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,46              | 21/26                                     | 19,3       |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P7  | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 4,2               | 24/25                                     | 4          | FA-C <sup>2</sup> | Negativo     | 65G>A W22X homozigoto     |          |
| P8  | FANCD2L + / FANCD2S + | Positivo      | 5,44              | 24/25                                     | 4          |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P9  | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2                 | 15/19                                     | 21         |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P10 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 4,08              | 21/25                                     | 16         | FA-A <sup>2</sup> | Negativo     | del exon 22-28 homozigoto |          |
| P11 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,1               | 21/28                                     | 25         |                   | Negativo     |                           |          |
| P12 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,64              | 22/25                                     | 12         | FA-A <sup>1</sup> | Negativo     |                           |          |
| P13 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,84              | 21/25                                     | 16         |                   | Negativo     |                           |          |
| P14 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,96              | 15/25                                     | 40         |                   | Negativo     |                           |          |
| P15 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 4,64              | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                           |          |
| P16 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,96              | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                           |          |
| P17 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 12,76             | 25/25                                     | 0          |                   | Negativo     |                           |          |
| P18 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 11,1              | 10/10                                     | 0          | FA-A <sup>2</sup> | Negativo     | ivs29-19del19 homozigoto  |          |
| P19 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,91              | 12/12                                     | 0          |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P20 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,5               | 13/14                                     | 7,14       | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del heterozigoto | Positivo |
| P21 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,46              | 19/32                                     | 40,6       | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto   |          |
| P22 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,6               | 20/25                                     | 20         |                   | Negativo     |                           |          |
| P23 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,52              | 24/25                                     | 4          | FA-A <sup>1</sup> | Negativo     |                           | Positivo |
| P24 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,56              | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P25 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,84              | 19/25                                     | 24         |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P26 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,72              | 13/25                                     | 48         |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P27 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,56              | 21/25                                     | 16         | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del heterozigoto | Positivo |
| P28 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,36              | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                           |          |
| P29 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,8               | 14/25                                     | 44         | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto   |          |
| P30 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3                 | 43/50                                     | 14         | FA-A <sup>1</sup> | Negativo     |                           |          |



RESULTADOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2, TESTE DO DEB E ESTUDO DE GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO/PESQUISA DE MUTAÇÕES

continua

| ID  | RESULTADO FANCD2      | RESULTADO DEB | ÍNDICE DE QUEBRAS | N.º CEL. C/ QUEBRAS / N.º CEL. ANALISADAS | % REVERSÃO | GRUPO DE COMPL.   | 3788-3790del | MUTAÇÕES                  | BRCA2    |
|-----|-----------------------|---------------|-------------------|---|------------|-------------------|--------------|---------------------------|----------|
| P31 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,24              | 25/25                                     | 0          | FA-E <sup>1</sup> | Negativo     |                           |          |
| P32 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,56              | 14/23                                     | 39,2       | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto   |          |
| P33 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 4,48              | 25/25                                     | 0          |                   | Negativo     |                           |          |
| P34 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,71              | 19/28                                     | 32,2       | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto   |          |
| P35 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,72              | 30/32                                     | 6,25       | FA-G <sup>1</sup> | Negativo     |                           |          |
| P36 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,76              | 14/25                                     | 44         |                   | Negativo     |                           |          |
| P38 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,92              | 25/25                                     | 0          |                   | Negativo     |                           |          |
| P39 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,92              | 17/25                                     | 32         |                   | Negativo     |                           |          |
| P40 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 4,12              | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                           |          |
| P42 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,4               | 16/25                                     | 36         | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto   |          |
| P43 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,64              | 24/25                                     | 4          | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto   |          |
| P44 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,96              | 21/25                                     | 16         |                   | Negativo     |                           |          |
| P45 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,24              | 17/25                                     | 32         |                   | Negativo     |                           |          |
| P47 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,38              | 25/25                                     | 0          | FA-A <sup>1</sup> | Negativo     |                           |          |
| P48 | FANCD2L - / FANCD2S+  | Positivo      | 3,92              | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                           |          |
| P50 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,12              | 24/25                                     | 4          | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del heterozigoto |          |
| P52 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,37              | 9/16                                      | 43,7       |                   | Negativo     |                           |          |
| P53 | FANCD2L + / FANCD2S + | Positivo      | 3,5               | 8/30                                      | 73,4       |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P54 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,81              | 15/16                                     | 6,3        |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P55 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,66              | 10/18                                     | 44,4       |                   | Negativo     |                           |          |
| P56 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,56              | 16/16                                     | 0          | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del heterozigoto |          |
| P59 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 4,24              | 24/25                                     | 4          |                   | Negativo     |                           |          |
| P60 | FANCD2L + / FANCD2S + | Positivo      | 1,25              | 8/25)                                     | 68         |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P61 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,44              | 18/25                                     | 28         |                   | Negativo     |                           |          |
| P62 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,12              | 14/23                                     | 39,1       | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto   |          |
| P63 | FANCD2L - / FANCD2S - | Positivo      | 4,12              | 21/25                                     | 16         | NI <sup>1</sup>   | Negativo     |                           |          |
| P64 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 4,88              | 24/25                                     | 4          |                   | Negativo     |                           | Positivo |
| P65 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,04              | 15/25                                     | 40         |                   | Negativo     |                           |          |
| P66 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,84              | 17/25                                     | 32         | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto   |          |
| P67 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,42              | 20/25                                     | 20         |                   | Negativo     |                           | Positivo |

RESULTADOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2, TESTE DO DEB E ESTUDO DE GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO/PESQUISA DE MUTAÇÕES

| ID  | RESULTADO FANCD2      | RESULTADO DEB | ÍNDICE DE QUEBRAS | N.º CEL. C/ QUEBRAS / N.º CEL. ANALISADAS | % REVERSÃO | GRUPO DE COMPL.   | 3788-3790del | MUTAÇÕES                    | BRCA2    | conclusão |
|-----|-----------------------|---------------|-------------------|---|------------|-------------------|--------------|-----------------------------|----------|-----------|
| P68 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,28              | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P69 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,36              | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                             |          |           |
| P70 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,26              | 14/25                                     | 44         |                   | Negativo     |                             |          |           |
| P71 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,28              | 25/32                                     | 21,9       | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del / del exon 4+5 |          |           |
| P72 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,28              | 19/25                                     | 24         |                   | Negativo     |                             |          |           |
| P73 | FANCD2L + / FANCD2S + | Positivo      | 0,84              | 6/25                                      | 76         | FA-A <sup>1</sup> | Negativo     |                             | Positivo | 0         |
| P74 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,64              | 24/25                                     | 4          |                   | Negativo     |                             |          |           |
| P76 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,72              | 24/25                                     | 4          |                   | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P77 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,64              | 21/25                                     | 16         |                   | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P78 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,16              | 12/12                                     | 0          |                   | Negativo     |                             |          |           |
| P79 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 15,41             | 17/17                                     | 0          |                   | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P80 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,95              | 24/25                                     | 4          | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto     |          |           |
| P81 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 18,75             | 4/4                                       | 0          | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del heterozigoto   | Positivo |           |
| P82 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,75              | 16/25                                     | 36         | FA-A <sup>3</sup> | Homozigoto   | 3788-3790del homozigoto     | Positivo |           |
| P83 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 15,86             | 15/15                                     | 0          |                   | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P84 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,74              | 33/35                                     | 5,7        |                   | Negativo     |                             |          |           |
| P85 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,96              | 17/25                                     | 32         | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del heterozigoto   |          |           |
| P87 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 5,4               | 23/25                                     | 8          |                   | Negativo     |                             |          |           |
| P88 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,64              | 22/39                                     | 43,5       | FA-A <sup>1</sup> | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P89 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,48              | 18/25                                     | 28         | FA-G <sup>1</sup> | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P90 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 2,2               | 18/25                                     | 28         | FA-G <sup>1</sup> | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P91 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 1,6               | 16/25                                     | 36         | FA-A <sup>3</sup> | Heterozigoto | 3788-3790del heterozigoto   | Positivo |           |
| P92 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,24              | 21/25                                     | 16         |                   | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P93 | FANCD2L + / FANCD2S + | Positivo      | 1,2               | 25/62                                     | 60         |                   | Negativo     |                             | Positivo |           |
| P96 | FANCD2L - / FANCD2S + | Positivo      | 3,28              | 19/25                                     | 24         |                   |              |                             |          |           |

NOTA: NI - Não identificado mutações entre os grupos pesquisados.

(1) Rockefeller University, Nova Iorque - EUA

(2) VU University Medical Center, Amsterdam - Holanda

(3) Hospital de Clínicas, UFPR – Brasil

**APÊNDICE 4**  
**RESULTADOS DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DOS PACIENTES AF**  
**ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2,**  
**TESTE DO DEB**

RESULTADOS DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2 E TESTE DO DEB

continua

| ID  | RESULTADO FANCD2    | RESULTADO DEB | ÍNDICE DE QUEBRAS | N.º CEL. C/ QUEBRAS / N.º CEL. ANALISADAS | % REVERSÃO | TRANSFUSÕES | ERITRÓC. 10 <sup>6</sup> /ml | Hb g/dl | VG % | VCM fl | N.º LEUC. 10 <sup>3</sup> /ml | N.º NEUT. 10 <sup>3</sup> /ml | PLAQUETAS 10 <sup>3</sup> /ml |
|-----|---------------------|---------------|-------------------|---|------------|-------------|------------------------------|---------|------|--------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| P1  | FANCD2L -/FANCD2S - | Positivo      | 6,7               | 10/10                                     | 0          | Não         | 2,88                         | 8       | 24,7 | 85,76  | 2,55                          | 0,562                         | 16                            |
| P2  | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,27              | 11/11                                     | 0          | Não         | 3,46                         | 11,8    | 33,7 | 97,4   | 3,37                          | 1,25                          | 34                            |
| P4  | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,24              | 21/25                                     | 16         | Não         | 3,49                         | 10,8    | 30,7 | 87,96  | 5,26                          | 2,37                          | 137                           |
| P5  | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,08              | 21/25                                     | 16         | Não         | 2,53                         | 9,1     | 26   | 102,76 | 1,89                          | 0,85                          | 32                            |
| P6  | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,46              | 21/26                                     | 19,3       | Não         | 1,99                         | 6,6     | 18,5 | 92,96  | 2,31                          | 0,1386                        | 11                            |
| P7  | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 4,2               | 24/25                                     | 4          | Não         | 2,61                         | 7,5     | 21,5 | 82,37  | 2,06                          | 0,47                          | 6                             |
| P8  | FANCD2L +/FANCD2S + | Positivo      | 5,44              | 24/25                                     | 4          | Não         | 2,63                         | 8,5     | 25,5 | 96,96  | 3                             | 0,18                          | 10                            |
| P9  | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2                 | 15/19                                     | 21         | Após        | 2,03                         | 7       | 21,1 | 103,9  | 2,15                          | 0,52                          | 31                            |
| P10 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 4,08              | 21/25                                     | 16         | Após        | 1,97                         | 6,1     | 16,8 | 85,28  | 2,03                          | 0,45                          | 10                            |
| P11 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,1               | 21/28                                     | 25         | Não         | 2,46                         | 8,5     | 23   | 93,49  | 3,35                          | 0,636                         | 6                             |
| P12 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,64              | 22/25                                     | 12         | Não         | 1,56                         | 6,2     | 18,5 | 118,59 | 3,4                           | 0,54                          | 26                            |
| P13 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,84              | 21/25                                     | 16         | Não         | 3,09                         | 8,9     | 26,5 | 85,76  | 2,89                          | 0,1445                        | 22                            |
| P14 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,96              | 15/25                                     | 40         | Não         | 2,43                         | 8,5     | 25,2 | 103,7  | 5,9                           | 1,83                          | 19                            |
| P15 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 4,64              | 23/25                                     | 8          | Não         | 2,07                         | 8       | 22,7 | 109,66 | 3,82                          | 0,344                         | 28                            |
| P16 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,96              | 23/25                                     | 8          | Após        | 0,91                         | 2,3     | 7,4  | 81,32  | 2,39                          | 1,52                          | 16                            |
| P17 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 12,76             | 25/25                                     | 0          | Não         | 4                            | 12,4    | 35,4 | 88,5   | 7,93                          | 2,22                          | 144                           |
| P18 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 11,1              | 10/10                                     | 0          | Não         | 2,8                          | 9,5     | 29   | 103,56 | 3,03                          | 1,15                          | 61                            |
| P19 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,91              | 12/12                                     | 0          | Não         | 2,84                         | 4       | 33   | 117,6  | 3,57                          | 1,68                          | 92                            |
| P20 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,5               | 13/14                                     | 7,14       | Não         | 4,08                         | 13,2    | 39,6 | 97,058 | 3,01                          | 1,17                          | 46                            |
| P21 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,46              | 19/32                                     | 40,6       | Não         | 2,31                         | 7,7     | 23,8 | 103,03 | 3,51                          | 0,842                         | 37                            |
| P22 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,6               | 20/25                                     | 20         | Não         | 2,63                         | 8,8     | 26,5 | 100,76 | 4,04                          | 1,45                          | 36                            |
| P23 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,52              | 24/25                                     | 4          | Após        | 1,71                         | 6,1     | 18   | 105,26 | 3,01                          | 0,54                          | 23                            |
| P24 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,56              | 23/25                                     | 8          | Não         | 1,93                         | 6,5     | 20,6 | 106,73 | 3,94                          | 1,576                         | 198                           |
| P25 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,84              | 19/25                                     | 24         | Não         | 2,92                         | 8,8     | 26,5 | 90,74  | 5,71                          | 1,71                          | 22                            |
| P26 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,72              | 13/25                                     | 48         | Não         | 4,42                         | 12,5    | 38,6 | 87,33  | 9,42                          | 6,69                          | 267                           |
| P27 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,56              | 21/25                                     | 16         | Não         | 2,15                         | 6,15    | 16,8 | 78,14  | 1,47                          | 0,162                         | 7                             |
| P28 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,36              | 23/25                                     | 8          | Não         | 2,94                         | 10      | 29,1 | 98,98  | 3,23                          | 1,389                         | 19                            |
| P29 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,8               | 14/25                                     | 44         | Não         | 2,82                         | 10,4    | 30,6 | 108,51 | 3,25                          | 0,52                          | 24                            |
| P30 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3                 | 43/50                                     | 14         | Após        | 3,06                         | 10,7    | 31,1 | 101,63 | 3                             | 0,99                          | 87                            |

RESULTADOS DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2 E TESTE DO DEB

continua

| ID  | RESULTADO FANCD2    | RESULTADO DEB | ÍNDICE DE QUEBRAS | N.º CEL. C/ QUEBRAS / N.º CEL. ANALISADAS | % REVERSÃO | TRANSFUSÕES | ERITRÓC. 10 <sup>6</sup> /ml | Hb g/dl | VG % | VCM fl | N.º LEUC.10 <sup>3</sup> /ml | N.º NEUT.10 <sup>3</sup> /ml | PLAQUETAS 10 <sup>3</sup> /ml |
|-----|---------------------|---------------|-------------------|---|------------|-------------|------------------------------|---------|------|--------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| P31 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,24              | 25/25                                     | 0          | Não         | 3,27                         | 10,08   | 30,4 | 92,97  | 3,48                         | 1,08                         | 37                            |
| P32 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,56              | 14/23                                     | 39,2       | Não         | 2,7                          | 8,9     | 26,3 | 97,4   | 2,54                         | 0,813                        | 37                            |
| P33 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 4,48              | 25/25                                     | 0          | Após        | 2,29                         | 7,5     | 21,5 | 93,8   | 3,43                         | 1,68                         | 11                            |
| P34 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,71              | 19/28                                     | 32,2       | Não         | 2,96                         | 10,7    | 31,7 | 107,09 | 4,21                         | 2,36                         | 33                            |
| P35 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,72              | 30/32                                     | 6,25       | Não         | 3,16                         | 10,9    | 31,1 | 98,42  | 4,6                          | 0,552                        | 32                            |
| P36 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,76              | 14/25                                     | 44         | Após        | 1,56                         | 6       | 17,4 | 111,54 | 2,17                         | 0,36                         | 18                            |
| P38 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,92              | 25/25                                     | 0          | Não         | 3,5                          | 13      | 36,3 | 103,71 | 3,39                         | 1,08                         | 62                            |
| P39 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,92              | 17/25                                     | 32         | Não         | 3,77                         | 13,4    | 37,9 | 100,53 | 1,77                         | 0,708                        | 68                            |
| P40 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 4,12              | 23/25                                     | 8          | Não         | 2,09                         | 7,3     | 22,1 | 105,74 | 1,63                         | 0,41                         | 33                            |
| P42 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,4               | 16/25                                     | 36         | Após        | 1,21                         | 4,5     | 14,1 | 116,53 | 4,96                         | 2,23                         | 22                            |
| P43 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,64              | 24/25                                     | 4          | Não         | 2,57                         | 8,3     | 25,2 | 98,05  | 2,71                         | 0,49                         | 35                            |
| P44 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,96              | 21/25                                     | 16         | Não         | 3,08                         | 10,2    | 30   | 97,4   | 3,29                         | 1,28                         | 68                            |
| P45 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,24              | 17/25                                     | 32         | Não         | 3,83                         | 12      | 35,7 | 93,21  | 3,83                         | 2,51                         | 100                           |
| P47 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,38              | 25/25                                     | 0          | Não         | 2,71                         | 8,6     | 25,2 | 92,99  | 1,07                         | 0,59                         | 32                            |
| P48 | FANCD2L -/FANCD2S   | Positivo      | 3,92              | 23/25                                     | 8          | Não         | 5,27                         | 15,3    | 47,5 | 90,13  | 2,6                          | 1,01                         | 29                            |
| P50 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,12              | 24/25                                     | 4          | Não         | 3,52                         | 11,3    | 33,1 | 94     | 4,12                         | 1,11                         | 89                            |
| P52 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,37              | 9/16                                      | 43,7       | Não         | 4                            | 12,6    | 36,4 | 91     | 5,45                         | 3,43                         | 63                            |
| P53 | FANCD2L +/FANCD2S + | Positivo      | 3,5               | 8/30                                      | 73,4       | Não         | 2,07                         | 7,6     | 22   | 106,2  | 3,46                         | 0,97                         | 14                            |
| P54 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,81              | 15/16                                     | 6,3        | Não         | 2,44                         | 7,7     | 22,5 | 92,2   | 1,79                         | 0,96                         | 26                            |
| P55 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,66              | 10/18                                     | 44,4       | Não         | 3,38                         | 10,2    | 28,4 | 84     | 4,16                         | 1,12                         | 14                            |
| P56 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,56              | 16/16                                     | 0          | Não         | 3,86                         | 11,7    | 33,8 | 87,5   | 3,68                         | 1,51                         | 110                           |
| P59 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 4,24              | 24/25                                     | 4          | Não         | 4,42                         | 13,3    | 38,4 | 86,8   | 7,8                          | 4,06                         | 242                           |
| P60 | FANCD2L +/FANCD2S + | Positivo      | 1,25              | 8/25                                      | 68         | Não         | 2,45                         | 7,2     | 21,5 | 87,7   | 3,03                         | 0,454                        | 45                            |
| P61 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,44              | 18/25                                     | 28         | Não         |                              |         |      |        |                              |                              | 25                            |
| P62 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,12              | 14/23                                     | 39,1       | Não         | 2,42                         | 7,4     | 22,3 | 92,1   | 2,19                         | 0,91                         | 42                            |
| P63 | FANCD2L -/FANCD2S - | Positivo      | 4,12              | 21/25                                     | 16         | Não         | 3,89                         | 12,4    | 35,9 | 92,2   | 5,99                         | 1,737                        | 116                           |
| P64 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 4,88              | 24/25                                     | 4          | Não         | 3,61                         | 11,8    | 36,4 | 100,8  | 3,58                         | 1,825                        | 139                           |
| P65 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,04              | 15/25                                     | 40         | Não         | 2,68                         | 7,9     | 23,7 | 88,4   | 2,34                         | 0,491                        | 19                            |
| P66 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,84              | 17/25                                     | 32         | Não         | 4,43                         | 12,6    | 37,6 | 84,8   | 9,99                         | 3,096                        | 301                           |
| P67 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,42              | 20/25                                     | 20         | Não         | 2,54                         | 7,8     | 22,4 | 88,1   | 2,84                         | 1,306                        | 35                            |

RESULTADOS DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DOS PACIENTES AF ANALISADOS PELOS MÉTODOS DE *WESTERN BLOT* PARA FANCD2 E TESTE DO DEB

conclusão

| ID  | RESULTADO FANCD2    | RESULTADO DEB | ÍNDICE DE QUEBRAS | N.º CEL. C/ QUEBRAS / N.º CEL. ANALISADAS | % REVERSÃO | TRANSFUSÕES | ERITRÓC. 10 <sup>6</sup> /ml | Hb g/dl | VG % | VCM fl | N.º LEUC. 10 <sup>3</sup> /ml | N.º NEUT. 10 <sup>3</sup> /ml | PLAQUETAS 10 <sup>3</sup> /ml |
|-----|---------------------|---------------|-------------------|---|------------|-------------|------------------------------|---------|------|--------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| P68 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,28              | 23/25                                     | 8          | Não         | 1,39                         | 4,4     | 12,9 | 92,8   | 2,04                          | 0,142                         | 16                            |
| P69 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,36              | 23/25                                     | 8          | Não         | 3,17                         | 11,1    | 32   | 100,9  | 4,84                          | 2,807                         | 107                           |
| P70 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,26              | 14/25                                     | 44         | Não         | 4,5                          | 15,1    | 43,4 | 96,4   | 3,19                          | 1,914                         | 89                            |
| P71 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,28              | 25/32                                     | 21,9       | Não         | 4,08                         | 12,7    | 37,7 | 92,4   | 8,9                           | 2,136                         | 50                            |
| P72 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,28              | 19/25                                     | 24         | Não         | 3,85                         | 11      | 33,3 | 86,4   | 4,56                          | 0,912                         | 145                           |
| P73 | FANCD2L +/FANCD2S + | Positivo      | 0,84              | 6/25                                      | 76         | Não         | 4,21                         | 12,6    | 38,1 | 90,4   | 4,13                          | 1,982                         | 183                           |
| P74 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,64              | 24/25                                     | 4          | Não         | 3,4                          | 12,1    | 33,8 | 99,4   | 7,6                           | 2,73                          | 56                            |
| P76 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,72              | 24/25                                     | 4          | Não         | 2,5                          | 7,7     | 23,1 | 92,4   | 2,75                          | 0,358                         | 22                            |
| P77 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,64              | 21/25                                     | 16         | Após        | 2,41                         | 6,7     | 20   | 82,9   | 1,91                          | 0,095                         | 14                            |
| P78 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,16              | 12/12                                     | 0          | Não         | 2,9                          | 10      | 28,7 | 98,9   | 5,25                          | 1,68                          | 82                            |
| P79 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 15,41             | 17/17                                     | 0          | Não         | 1,58                         | 5,4     | 15,2 | 96,2   | 3,08                          | 1,047                         | 7                             |
| P80 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,95              | 24/25                                     | 4          | Não         | 2,94                         | 10      | 29,8 | 101,3  | 4,88                          | 2,78                          | 74                            |
| P81 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 18,75             | 4/4                                       | 0          | Não         | 1,28                         | 4,2     | 13,9 | 108,5  | 2,48                          | 1,116                         | 326                           |
| P82 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,75              | 16/25                                     | 36         | Não         | 3,55                         | 12,2    | 36,3 | 102,2  | 2,72                          | 1,36                          | 110                           |
| P83 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 15,86             | 15/15                                     | 0          | Não         | 1,58                         | 5,3     | 15,2 | 96,2   | 3,06                          | 1,101                         | 18                            |
| P84 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,74              | 33/35                                     | 5,7        | Não         | 3,91                         | 13,1    | 38,3 | 97,9   | 3,8                           | 1,254                         | 61                            |
| P85 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,96              | 17/25                                     | 32         | Não         | 2,76                         | 10,1    | 30,1 | 109    | 4,21                          | 1,01                          | 68                            |
| P87 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 5,4               | 23/25                                     | 8          | Não         | 2,45                         | 8       | 23,4 | 95,5   | 2,08                          | 0,228                         | 73                            |
| P88 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,64              | 22/39                                     | 43,5       | Não         | 4,11                         | 13,4    | 41,1 | 100    | 6,13                          | 1,839                         | 59                            |
| P89 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,48              | 18/25                                     | 28         | Após        | 1,85                         | 5,8     | 16,6 | 89,7   | 3,73                          | 0,484                         | 12                            |
| P90 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 2,2               | 18/25                                     | 28         | Não         | 3,56                         | 11,4    | 31,8 | 89,3   | 7,53                          | 1,731                         | 114                           |
| P91 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 1,6               | 16/25                                     | 36         | Não         | 3,04                         | 10,3    | 30,8 | 101,3  | 2,94                          | 1,44                          | 105                           |
| P92 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,24              | 21/25                                     | 16         | Após        | 1,69                         | 6,3     | 19,7 | 116,5  | 3,26                          | 0,717                         | 18                            |
| P93 | FANCD2L +/FANCD2S + | Positivo      | 1,2               | 25/62                                     | 60         | Após        | 2,88                         | 8,8     | 25,3 | 87,8   | 1,21                          | 0,036                         | 54                            |
| P96 | FANCD2L -/FANCD2S + | Positivo      | 3,28              | 19/25                                     | 24         | Não         | 3,13                         | 9,3     | 26,4 | 84,3   | 3,59                          | 1,077                         | 8                             |

NOTA: VG - volume globular ou hematócrito; Hb - hemoglobina; VCM - volume corpuscular médio.

## **ANEXOS**

**ANEXOS 1**  
**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**





**ANEXOS 2**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO DOS PACIENTES**

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA DE FANCONI: CORRELAÇÃO  
ENTRE O TESTE DO DIEPOXIBUTANO (DEB) E A DETECÇÃO DA FORMA  
MONOUBIQUITILADA DA PROTEÍNA FANCD2**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

1. Eu, \_\_\_\_\_ entendo que (sou)(meu filho é) portador de Anemia de Fanconi, e que estou sendo convidado a participar do projeto chamado: “pesquisa das proteínas FANCD2 para diagnóstico laboratorial da Anemia de Fanconi em pacientes brasileiros”.
2. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido em conjunto com St Jude Children's Research Hospital e que os médicos e pesquisadores estão empenhados na pesquisa da natureza, do diagnóstico e do tratamento da Anemia de Fanconi, e que os dados coletados serão pertinentes à história, genética, evolução da doença, resultado de exames laboratoriais, tratamento, complicações e implicações sociais da doença. Dados dos familiares também serão coletados.
3. Eu entendo que no transcorrer da pesquisa serão necessários consultas e exames rotineiros periodicamente, além de exames de sangue para estudo de DNA e, eventualmente, estudo da medula óssea (fazendo-se necessário aspirado e biópsia de medula óssea). Além disto, outros exames que se fizerem necessários dependendo da evolução da própria doença.
4. Eu entendo que a minha participação no projeto possibilitará a investigação das proteínas FANCD2 e BRCA2 em pacientes com Anemia de Fanconi, e que este conhecimento poderá resultar no desenvolvimento de metodologias mais adequadas para o diagnóstico laboratorial da Anemia de Fanconi, trazendo assim o benefício aos pacientes afetados por esta doença.
5. Eu entendo e concordo que a (minha)(do meu filho) imagem, através de fotografias, filmagens ou tele-conferências seja usada nesta pesquisa, uma vez que a identidade e a intimidade serão preservadas.
6. Entendo que no momento da publicação dos resultados obtidos nesta pesquisa, não aparecerá (meu)(do meu filho) nome e sim um código, justamente para preservar a identidade/intimidade de minha família.

7. Eu entendo que as informações aqui contidas devem ser lidas por mim ou pelo meu responsável, que devem ser assinaladas minhas dúvidas para solicitar esclarecimentos necessários os quais poderão ser apropriadamente discutidos com os vários profissionais nas entrevistas prévias a minha inclusão no projeto.
8. Eu entendo que não houve nenhuma tentativa de persuasão do médico entrevistador ou dos demais participantes da equipe no sentido de influenciar minha decisão, deixando-me livre para recusar ou para participar deste estudo, e que apenas foram esclarecidos detalhes técnicos necessários para que eu pudesse tomar uma decisão com conhecimento e clareza.
9. Eu li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

Curitiba, \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Assinatura do paciente \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

## ANEXOS 3

### TERMO DE CONSENTIMENTO DOS CONTROLES

#### DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA DE FANCONI: CORRELAÇÃO ENTRE O TESTE DO DIEPOXIBUTANO (DEB) E A DETECÇÃO DA FORMA MONOUBIQUITILADA DA PROTEÍNA FANCD2

##### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Eu, \_\_\_\_\_ entendo que estou sendo convidado a participar do projeto chamado: “Diagnóstico laboratorial da anemia de Fanconi: correlação entre o teste do diepoxibutano (DEB) e a detecção da forma monoubiquitilada da proteína FANCD2” como parte do grupo de indivíduos normais para controle das metodologias de diagnóstico laboratoriais em estudo.
2. Eu entendo que para a realização destes exames laboratoriais será necessária a coleta de 15 ml de sangue periférico.
3. Eu entendo que a minha participação no projeto possibilitará o estabelecimento de grupo de amostras controle na investigação da função normal das proteínas FANCD2 e que este conhecimento poderá resultar no desenvolvimento de metodologias mais adequadas para o diagnóstico laboratorial da Anemia de Fanconi, trazendo assim o benefício aos pacientes afetados por esta doença.
4. Entendo que no momento da publicação dos resultados obtidos nesta pesquisa, não aparecerá meu nome e sim um código, justamente para preservar a minha identidade.
5. Eu entendo que as informações aqui contidas devem ser lidas por mim, que devem ser assinaladas minhas dúvidas para solicitar esclarecimentos necessários, os quais poderão ser apropriadamente discutidos com os vários profissionais nas entrevistas prévias a minha inclusão no projeto.
6. Eu li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

Curitiba, \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Assinatura do doador \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_