

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LORAIN BEATRIZ ACOSTA VEIGA

**ANEMIA DE FANCONI
ANÁLISE CITOGENÉTICA**

CURITIBA

2009

LORAINÉ BEATRIZ ACOSTA VEIGA

**ANEMIA DE FANCONI
ANÁLISE CITOGENÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética.

Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilze M. S. F. Ribeiro

CURITIBA

2009

*Dedico este trabalho a minha família,
presente em todos os momentos,
obrigada pelo incentivo e amor constantes.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli pelos ensinamentos, pela orientação, pelo incentivo, amizade e pelo que tem contribuído para a minha formação profissional.

À Prof.^a Dr.^a Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro pela co-orientação, pela revisão de todos os cariótipos obtidos neste trabalho, pela sua dedicação ativa sempre presente, e disposição para ajudar a qualquer momento.

À Dr.^a Virginia Maria Cóser, hoje minha colega de doutorado, pelo incentivo inicial no estudo dos cromossomos, por todo carinho, amizade e cumplicidade ao longo destes vários anos.

Ao Serviço de Transplante de Medula Óssea, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, aos médicos, enfermeiros e assistentes sociais pela ajuda na coleta dos dados clínicos dos pacientes, em especial ao Dr. Ricardo Pasquini, por ter apoiado o tema desta tese.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da UFPR pela competência de ensino e contribuição de conhecimentos transmitidos, incentivo e apoio.

As queridas amigas e colegas de laboratório Ana Teresa, Duca, Lismeri, Aglaci, Roseli e Tamara, companheiras nas horas difíceis e alegres que compartilhamos juntas ao longo deste trabalho.

Aos meus grandes amigos (as), impossível nomeá-los aqui, pela amizade, carinho, companheirismo, e por tudo que temos compartilhado. Saibam que a amizade de vocês me torna uma pessoa melhor a cada dia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação Araucária pela concessão da bolsa, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) por subvenção de parte deste trabalho..

Aos pacientes e seus familiares, pela doação do material utilizado neste trabalho.

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença autossômica recessiva ou ligada ao X, caracterizada por uma falência progressiva da medula óssea, frequentemente malformações congênitas e predisposição a neoplasias principalmente leucemia mielóide aguda (LMA) ou síndrome mielodisplásica (SMD). A variabilidade fenotípica desta doença dificulta o diagnóstico com base nas características clínicas, sendo necessários testes citogenéticos para sua confirmação, utilizando agentes alquilantes à cultura celular, que induzem a um aumento de quebras e à formação de figuras radiais características da doença. Neste estudo descrevemos a análise citogenética em células da medula óssea de 130 pacientes portadores da AF, previamente diagnosticados pelo teste com diepoxibutano (DEB). As amostras foram coletadas no Ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UFPR, e enviadas ao Laboratório de Citogenética, onde foram analisadas. Para a obtenção dos cromossomos metafásicos foi utilizada a técnica descrita por Raimondi et al. (1999), com modificações, sendo a análise realizada através do bandeamento GTG descrito por Scheres (1972), com modificações. Dos 130 pacientes, 55 (42,31%) apresentaram alterações cromossômicas clonais (993 no total), das quais 464 (46,72%) foram numéricas e 529 (53,27%) foram estruturais, as quais foram as mais frequentes ($\chi^2_{1} = 4,26$; $P < 0,05$). Entre as numéricas, as monossomias (323) foram mais frequentes que as trissomias (141) ($\chi^2_{1} = 71,38$; $P < 0,001$). As alterações não ocorreram ao acaso em todos os cromossomos do genoma ($\chi^2_{23} = 1.160,01$; $P < 0,001$). Nove cromossomos foram preferencialmente envolvidos: 1(23%); 5(7,9%); 7(5,4%); 8(5,3%); 22(5,1%); 21(5%); 15(4,9%); 12(4,7%); 3(4,3%). Cinco pacientes desenvolveram Síndrome Mielodisplásica (SMD) e dois desenvolveram Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Nossos resultados estão de acordo com os da literatura onde se descreve cerca de 30% a 40% de alterações em pacientes AF e envolvimento preferencial dos cromossomos 1, 7 e 3, corroborando a importância da análise citogenética em células da medula óssea, pela sua aplicabilidade diagnóstica, terapêutica e prognóstica.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi. Cromossomos. Teste do DEB. Medula óssea.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is an autosomal recessive or X-linked disease, characterized by bone marrow failure, multiple congenital abnormalities and cancer susceptibility as acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) mainly to. Diagnosis based on clinical manifestations may be difficult because of the phenotypic variability. Laboratory tests might be necessary to confirm such diagnosis which are performed by using treatments with DNA cross-linking agents in the cell culture in order to induce chromosomal aberrations including gaps, breaks, acentric fragments and chromosome and chromatid exchanges. In this study, we described the cytogenetic analysis in bone marrow cells of 130 patients with AF, previously diagnosed by the diepoxibutane test (DEB). The collection of samples was performed at the Transplantation Bone Marrow Ambulatory of Clinical's Hospital from Federal University of Parana, and sent to Cytogenetic lab, where the culture preparations were performed. The technique described by Raimondi et al. (1999), with modifications, was used to obtain the chromosomes and their analysis was performed with the GTG stained method, described by Scheres (1972), also with modifications. Of the 130 patients analyzed, 55 (42.31%) were clonal chromosomal aberrations which counted for 993 aberrations found. From this 993 aberrations 464 (46.72%) were numerical and 529 (53.27%) were structural and more frequent ($\chi^2_1= 4.26$; $P<0,05$). Among the numerical abnormalities, monosomy (323) were more frequent than trisomy (114) ($\chi^2_1= 71.38$; $P<0,001$). The aberrations did not occur randomly in all the chromosomes of genome ($\chi^2_{23}= 1160.01$; $P<0,001$). Nine chromosomes were shown to be more involved in the aberrations found: 1 (23%); 5 (7.9%); 7 (5.4%); 8 (5.3%); 22 (5.1%); 21 (5%); 15 (4.9%); 12 (4.7%); 3 (4.3%). Five patients evolved to myelodysplastic syndrome (MDS) and two evolved to acute myeloid leukemia (AML). Our results are in agreement with those from the literature where 30% to 40% of FA patients have chromosomal abnormalities, involving preferably the chromosomes 1, 7 and 3, confirming the importance of cytogenetic analysis in bone marrow cells by its diagnostic, therapeutic and prognostic applicability.

Keywords: Fanconi anemia. Chromosome. DEB test. Bone marrow.

LISTA DE TABELAS

1	DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS CLONAIIS POR CROMOSSOMO.....	84
2	DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS CLONAIIS POR PACIENTES	85
3	DISTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS POR CROMOSSOMO	95
4	DISTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS POR PACIENTE	96
5	ÍNDICE DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS NO DIAGNÓSTICO E EM REPETIDAS ANÁLISES EM 32 PACIENTES	99
6	DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS NOS PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO	104
7	DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS NOS PACIENTES VIVOS	105
8	DISTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS NOS PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO	109
9	DISTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS NOS PACIENTES VIVOS.....	110

LISTA DE QUADROS

1	GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO EM AF, RESPECTIVOS GENES E LOCALIZAÇÃO	33
2	DADOS GERAIS DOS PACIENTES	71
3	CARIÓTIPOS OBTIDOS EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DOS 130 PACIENTES AF ANALISADOS	77
4	DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS CLONAIIS NOS 55 PACIENTES	80
5	DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS CLONAIIS NOS 55 PACIENTES	82

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1	FREQÜÊNCIA DOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO NA AF	35
GRÁFICO 2	FREQÜÊNCIA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS POR CROMOSSOMO	86
GRÁFICO 3	FREQÜÊNCIA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS NOS 55 PACIENTES	86
GRÁFICO 4	DISTRIBUIÇÃO DOS ÍNDICES DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS E RETA DE REGRESSÃO EM FUNÇÃO DO GRAU DA SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA	98
GRÁFICO 5	DISTRIBUIÇÃO DOS ÍNDICES DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS E RETA DE REGRESSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO (MESES) DE REPETIÇÃO DO EXAME	100
GRÁFICO 6	CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES SEM E COM ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	102
GRÁFICO 7	DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS POR CROMOSSOMO NOS PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO	104
GRÁFICO 8	DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS POR CROMOSSOMO NOS PACIENTES VIVOS	105
FIGURA 1	CROMOSSOMOS DE PACIENTE COM AF DEMONSTRANDO FRAGMENTOS (1), FIGURAS RADIAIS (2) E QUEBRAS CROMOSSÔMICAS (3).....	46
FIGURA 2	PROTEÍNAS AF E SEUS PARCEIROS NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO	53
FIGURA 3	SINALIZAÇÕES À MONTANTE DA MONOUBIQUITINAÇÃO	55
FIGURA 4	SINALIZAÇÕES À JUSANTE DA MONOUBIQUITINAÇÃO	56
FIGURA 5	METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 13: 46,XX,dup(1)(p21p32),add(6)(p22)	87
FIGURA 6	METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 27: 46,XX,trp(1)(q21q32),-20	88
FIGURA 7	METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 38: 46,XY,del(7)(q32).....	89
FIGURA 8	METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 45: 44,XY,+2,dup(3)(q11q29),-6,- 13,-15,add(19)(p13).....	90
FIGURA 9	METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 82: 46,XY,der(15)t(1;15)(q10;q10)	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	- Anemia de Fanconi
ATM	- Produto do gene da Ataxia-telangiectasia
ATP	- Adenosina trifosfato
BRCA1	- <i>Breast Cancer Susceptibility Gene 1</i>
BRCA2	- <i>Breast Cancer Susceptibility Gene 2</i>
BrdU	- <i>5-bromo-2'desoxiuridina</i>
Cdc	- Quinase dependente de ciclina
DEB	- Diepoxibutano
DHPLC	- <i>Denaturing high performance liquid chromatography</i>
DNAc	- DNA complementar
EFARG	- <i>European Fanconi Anemia Research Group</i>
FAAPs	- Fanconi Anemia Associated Polypeptides
FISH	- Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
GSTP1	- <i>Glutathione S Transferase P1</i>
GTG	- Bandeamento G com Tripsina e Giemsa
HR	- <i>Homologous repair</i>
IFAR	- <i>International Fanconi Anemia Registry</i>
IgA	- Imunoglobulina IgA
IgE	- Imunoglobulina IgE
IgG	- Imunoglobulina IgG
IgM	- Imunoglobulina IgM
LMA	- Leucemia Mielóide Aguda
MMC	- Mitomicina C
NADPH	- <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase</i>
NHEJ	- <i>Non-homologous end-joining</i>
OH [·]	- Radical hidroxila reativo
p	- Braço curto do cromossomo
PHA	- Fitohemaglutinina
q	- Braço longo do cromossomo
RAD51	- Proteína repadora do DNA com atividade nuclease
ROM	- Proteína de ligação ao DNA
ROS	- <i>Reactive oxygen species</i>
SMD	- Síndrome Mielodisplásica
SOD	- Enzima superóxido-desmutase
SV40	- Vírus símio 40
TMO	- Transplante de Medula Óssea
UV	- Ultra-violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	HISTÓRICO DA ANEMIA DE FANCONI	14
2.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS DA AF	15
2.3	TRATAMENTO	19
2.4	GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO: GENES, FUNÇÕES E MUTAÇÕES	20
2.4.1	Grupo de Complementação FA-A	22
2.4.2	Grupo de Complementação FA-B	23
2.4.3	Grupo de Complementação FA-C	24
2.4.4	Grupo de Complementação FA-D1	26
2.4.5	Grupo de Complementação FA-D2	27
2.4.6	Grupo de Complementação FA-E	27
2.4.7	Grupo de Complementação FA-F	28
2.4.8	Grupo de Complementação FA-G	28
2.4.9	Grupo de Complementação FA-H	29
2.4.10	Grupo de Complementação FA-I	30
2.4.11	Grupo de Complementação FA-J	30
2.4.12	Grupo de Complementação FA-L	31
2.4.13	Grupo de Complementação FA-M	31
2.4.14	Grupo de Complementação FA-N	32
2.5	FREQÜÊNCIA DOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO	33
2.6	ETIOPATOGENIA DA ANEMIA DE FANCONI	35
2.6.1	Reparo do DNA	36
2.6.1.1	Recombinação homóloga	37
2.6.1.2	Junção de terminações não homólogas (NHEJ)	38
2.6.1.3	Ubiquitinação	38
2.6.2	Alterações do Ciclo Celular	39
2.6.3	Apoptose	41
2.6.4	Instabilidade Cromossômica	43

2.7	DIAGNÓSTICO	44
2.7.1	Citogenético	44
2.7.2	Clínico	47
2.7.3	Ensaio de Complementação	47
2.7.4	Western Blot para FANCD2.....	48
2.7.5	Pesquisa de Mutações	48
2.7.6	Mosaicismo	49
2.8	INTEGRIDADE DO GENOMA: FUNÇÃO DA FANCD2.....	50
2.8.1	Formação do Complexo	52
2.8.2	Monoubiquitinação da FANCD2	54
2.9	ANÁLISE CITOGENÉTICA DA MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES AF	56
3	OBJETIVOS	63
4	MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	64
4.2	PROCEDIMENTOS TÉCNICOS.....	65
4.2.1	Teste de Estresse para Diagnosticar Anemia de Fanconi com DEB	65
4.2.1.1	Coleta de sangue	65
4.2.1.2	Cultura celular	65
4.2.1.3	Análise.....	66
4.2.2	Análise Citogenética de Células da Medula Óssea de Pacientes AF	67
4.2.2.1	Obtenção das amostras	67
4.2.2.2	Cultura celular	67
4.2.2.3	Bandeamento cromossômico GTG	68
4.2.2.4	Análise.....	68
4.2.2.5	Situação hematológica	69
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
5	RESULTADOS	70
5.1	TESTE DE ESTRESSE PARA DIAGNOSTICAR ANEMIA DE FANCONI COM DEB	70
5.2	ANÁLISE CITOGENÉTICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES AF	76

5.3	ÍNDICE DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS E SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA	97
5.4	ÍNDICE DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS EM ANÁLISES CONSECUTIVAS	98
5.5	PACIENTES COM E SEM ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS	100
6	DISCUSSÃO	111
7	CONCLUSÕES	131
	REFERÊNCIAS	132

1 INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara, descrita por Guido Fanconi, em 1927 (citado por FANCONI, 1967), estudando três irmãos que apresentavam anemia aplástica de evolução rápida e fatal, malformações esqueléticas, retardo de crescimento, hipogonadismo, microcefalia e manchas hiperpigmentadas na pele. O diagnóstico clínico foi o de uma anemia perniciosa, devido à morfologia dos eritrócitos. Entretanto, a análise da medula óssea revelou que, além do comprometimento morfológico da série vermelha, ela era atrófica e com poucos focos de hematopoese, sendo proposto, então, o nome de anemia perniciosiforme.

O nome Anemia de Fanconi foi introduzido por Naegeli, em 1931 (citado por FANCONI, 1967), que sugeriu que o mesmo fosse utilizado naqueles pacientes com anemia aplástica familiar associada a anormalidades físicas congênitas.

Devido à grande variabilidade fenotípica, o diagnóstico clínico da AF exige a complementação diagnóstica através de métodos laboratoriais (FAIVRE et al., 2000). Várias descobertas contribuíram para a caracterização da AF. Entre as mais importantes estão a instabilidade cromossômica espontânea e a hipersensibilidade das células dos pacientes AF ao efeito indutor de quebras cromossômicas de agentes clastogênicos, tais como a mitomicina C (MMC) e o diepoxibutano (DEB). Com base nestas características foram desenvolvidos métodos de indução de quebras cromossômicas, como o Teste de Sensibilidade ao DEB, que é o método de referência para o diagnóstico da AF (AUERBACH, 1993).

Estudos moleculares da AF indicam que, em geral, as células apresentam defeitos nos processos de reparo do DNA, que ocorrem normalmente durante o ciclo celular ou em resposta a algum dano ao DNA. Mutações que ocorrem nos genes que codificam as proteínas da AF provocam alterações no mecanismo de reparo, resultando nas características clínicas e celulares observadas na AF (MONTES DE OCA et al., 2005).

O Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) é um centro com mais de 25 anos de experiência

no atendimento clínico e laboratorial de pacientes com Anemia de Fanconi, tendo realizado mais de 180 transplantes de medula óssea nestes pacientes. O diagnóstico rápido e preciso desta doença é importante para o monitoramento dos pacientes, para as decisões terapêuticas e para o aconselhamento genético às famílias.

A importância de estudos que possibilitem uma melhor caracterização, tanto clínica como genética de pacientes AF tem sido muito considerada, pois estes pacientes mostram um risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias, principalmente leucemias e síndromes mielodisplásicas. O presente estudo apresenta uma análise das anormalidades citogenéticas encontradas na medula óssea destes pacientes, utilizando o método clássico de análise citogenética, realizado após a confirmação do diagnóstico pelo Teste de Sensibilidade ao DEB. O objetivo principal foi avaliar a presença de alterações cromossômicas clonais, suas frequências e relacioná-las com as características e evolução clínica dos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA ANEMIA DE FANCONI

A Anemia de Fanconi foi descrita pelo pediatra suíço Guido Fanconi em 1927 e em 1967 este mesmo autor apresentou as características clínicas da doença. Em 1964, Schroeder, Anschutz e Knopp descreveram a presença de quebras cromossômicas espontâneas nas culturas de linfócitos de pacientes com AF, e em 1976, estes autores estabeleceram o padrão de herança autossômico recessivo e sugeriram a existência de heterogeneidade genética na AF. Dosik, Steier e Lubiniecki, em 1979, demonstraram que as alterações mais freqüentes em células de pacientes AF são quebras de cromátides e figuras radiais. Neste ano foi realizado o primeiro transplante de medula óssea (TMO) em um paciente com Anemia Aplástica no Brasil, pela equipe do Dr. Ricardo Pasquini e Dr. Eurípedes Ferreira, no HC-UFPR. Em 1980, Zakrzewski e Sperling demonstraram a existência de pelo menos dois grupos de complementação na AF, confirmando a heterogeneidade genética da doença. Neste mesmo ano Gluckman et al. relataram casos de TMO em pacientes AF e constataram a necessidade de regimes de condicionamento específico para estes pacientes. Auerbach, Adler e Chaganti, em 1981, descreveram o teste padrão para diagnóstico laboratorial da AF, o teste do diepoxibutano (DEB). Neste mesmo ano, foi realizado o primeiro TMO em pacientes AF no Brasil, pela equipe do Dr. Ricardo Pasquini, no HC-UFPR.

Strathdee, Duncan e Buchwald, em 1992, identificaram o primeiro gene da AF, o *FANCC*. O segundo gene identificado foi o *FANCA* clonado por Lo Ten Foe et al. e Apostolou et al., em 1996. Em 1998, de Winter et al. identificaram o gene *FANCG*. Estes últimos autores identificaram em 2000 o gene *FANCE* e isolaram o DNA complementar do gene *FANCF* (DE WINTER et al., 2000a). O grupo de complementação H (JOENJE et al., 1997) foi posteriormente identificado como sendo o mesmo de *FANCA* (JOENJE et al., 2000).

Em 2001, Timmers et al. realizaram a clonagem posicional do gene *FANCD2*. Shimamura et al., em 2002, desenvolveram um método complementar para o diagnóstico da AF, baseado na detecção da forma monoubiquitinada da proteína *FANCD2*. Em 2003, Meetei et al. descreveram um novo grupo de complementação o FA-L. Estes autores em 2004 mapearam o gene *FANCB* no cromossomo X, caracterizando herança ligada ao X na AF. Em 2005, Meetei et al. identificaram o grupo de complementação FA-M. Neste ano, Levitus et al. identificaram o gene *FANCJ* (BRIP1). Em 2007, Xia et al. e Reid et al. identificaram um novo grupo de complementação, denominado FA-N, cujo gene candidato é o *PABL2*. Smogorzewska et al., em 2007, concluíram que o gene *FANCI* corresponde a uma variante do loco KIAA1794 no cromossomo 15q25-26.

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS DA AF

Clinicamente a AF é uma doença caracterizada por uma falência generalizada e progressiva da medula óssea (pancitopenia), fácies característico, diversas anormalidades anatômicas congênitas, retardo mental e de crescimento, pele com manchas de coloração café com leite, hipogonadismo e predisposição a vários tipos de neoplasias, especialmente leucemias (FANCONI, 1967; SWIFT, 1971; SCHROEDER et al., 1976; LIU et al., 1994).

As manifestações clínicas são variáveis, com sintomas relacionados a anemia, infecções associadas à neutropenia, e sangramento relacionado à trombocitopenia (ALTAY et al., 1997).

Segundo Alter (2002), aproximadamente 75% dos pacientes com AF apresentam defeitos ao nascimento: pigmentação da pele e manchas de coloração café com leite presentes em mais de 50% dos pacientes; baixa estatura (50%); anomalias do polegar ou rádio (40%); gônadas masculinas anormais (30%); microcefalia (25%); anomalias oculares (20%); defeitos estruturais renais (20%); baixo peso ao nascimento (10%); atraso no desenvolvimento (10%) e problemas de audição (10%). Além destas, outras

manifestações menos comuns incluem: microcefalia, hidrocefalia, micrognatia, face de pássaro, braquicefalia e bossa frontal (ALTER, 2002).

As alterações congênicas mais comuns descritas por Pasquini e Zanis-Neto (2004) foram:

- manchas na pele caracterizadas por hiperpigmentações, tipo "café com leite";
- malformações cardíacas e renais;
- defeitos esqueléticos como: ausência do rádio e do polegar, polegar hipoplásico ou extranumerário ou de topografia anômala, sindactilia, dedos e falanges extranumerárias, microcefalia, nanismo, ausência ou hipoplasia do primeiro metacarpiano, hipoplasia tenar, luxação congênita do quadril e espinha bífida;
- anormalidades da face ou mandibular, microdontia, microftalmia, microstomia, estrabismo, retardo mental, surdez ou malformações das orelhas e pregas epicânticas;
- alterações endócrinas como hipodesenvolvimento gonadal e espermatogênese diminuída.

Estas características são bastante variáveis nos pacientes com AF. O início das manifestações hematológicas, principalmente trombocitopenia e pancitopenia, e o grau de gravidade das mesmas varia desde o nascimento até a idade adulta (ALTER, 1993; BUTTURINI et al., 1994). As variações também são observadas na presença e no tipo de malformações congênicas (NILSON, 1960; DACIE; GILPIN, 1994; AUERBACH; ROGATKO; SCHROEDER-KURTH, 1989). Segundo D'Andrea e Grompe (1997), 33% dos pacientes com AF não possuem anormalidades congênicas. A ampla variedade de expressão clínica possivelmente se deve aos vários produtos gênicos (demonstrados pelos estudos de complementação e atualmente, na maioria, clonados) envolvidos na mesma via de reparo, porém em diferentes pontos ou mesmo atuando em diferentes vias (FAIVRE et al., 2000).

Geralmente, a doença se manifesta entre os cinco e nove anos de idade, em caucasóides, negróides, asiáticos, hispânicos, índios asiáticos e ameríndios (SWIFT, 1971), porém o diagnóstico pode chegar a ser feito somente na idade adulta. A prevalência da AF é de aproximadamente um em cada cem mil indivíduos nascidos vivos na maioria das populações já estudadas. A frequência estimada de portadores na população dos Estados Unidos, da Europa e do Japão é de um em trezentos (D'ANDREA; GROMPE, 2003). Ainda não foram realizados estudos da prevalência ou da frequência de portadores da AF no Brasil. Diante dos avanços no tratamento, bem como o conhecimento da fisiopatologia desta doença, a sobrevida média aumentou para 30 anos nos pacientes estudados entre 1991 e 2000, quando comparada com a sobrevida observada no estudo anterior, que era de 19 anos nos pacientes estudados entre 1981 e 1990 nos EUA (TANIGUCHI; D'ANDREA, 2006).

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 e anemia), sendo a medula óssea inicialmente normocelular e tornando-se progressivamente hipoplásica (GROSS et al., 2002). Três graus de comprometimento medular podem ser definidos, os quais são baseados na literatura e aplicáveis na prática clínica (BUTTURINI et al., 1994; GUARDIOLA et al., 2000):

- **Grau I** → Sem falha medular. Critérios: plaquetas acima de 100.000/ μ L; neutrófilos acima de 100/ μ L; hemoglobina acima de 10 g/dL.
- **Grau II** → Falha medular inicial. Pelo menos um dos critérios: plaquetas entre 100.000/ μ L e 20.000/ μ L; neutrófilos entre 1.000/ μ L e 500/ μ L; hemoglobina menor que 10g/dl; sem necessidade de transfusões ou até 20 transfusões.
- **Grau III** → Falha medular avançada. Pelo menos um dos critérios: plaquetas abaixo de 20.000/ μ L; neutrófilos abaixo de 500/ μ L ou necessidade de mais de 20 transfusões de hemácias e/ou plaquetas.

A predisposição ao câncer é uma característica importante da AF. Rosenberg, Greene e Alter (2003) descreveram que o risco relativo de desenvolver leucemia mielóide aguda é 785 vezes maior entre os pacientes AF. O risco de desenvolver tumores sólidos, envolvendo especialmente cabeça e pescoço, trato gastrintestinal e genital em mulheres também está aumentado.

Alter (2003) avaliou desde 1970, através de revisão da literatura de artigos publicados entre 1927 e 2001, 1300 pacientes AF. Destes pacientes, 9% desenvolveram leucemia, principalmente LMA, 7% apresentaram Síndrome Mielodisplásica, 5% tumores de tecidos sólidos e 3% carcinomas hepáticos. Os pacientes com neoplasia eram os com diagnóstico tardio da doença primária. A média de idade para o desenvolvimento de uma neoplasia encontrada nos pacientes AF foi de 16 anos, comparada com 68 anos de idade para a população, em geral. Os carcinomas digestivos e ginecológicos foram os tumores de tecidos sólidos mais freqüentes.

Há três mecanismos que podem predispor os pacientes com AF ao desenvolvimento de neoplasias: o defeito no reparo do DNA, o defeito na detoxificação de radicais de oxigênio e a imunodeficiência. As células dos pacientes apresentam sensibilidade aumentada a mutágenos como radiação e agentes alquilantes, assim como maior suscetibilidade à transformação pelo vírus símio 40 (SV40). A imunodeficiência pode atuar tanto como uma conseqüência primária da doença ou como uma complicação da terapia imunossupressora pós-TMO. A imunidade humoral tem sido relatada como normal nestes pacientes. O número e a porcentagem de linfócitos B parecem ser normais ou quase normais. IgG e IgM do soro, assim como IgA e IgE, estão normais (PASQUINI; ZANIS-NETO, 2004).

Huck et al. (2006) descreveram um paciente com AF, do grupo de complementação A, diagnosticado somente aos 49 anos de idade devido à persistência de pancitopenia e Síndrome Mielodisplásica/LMA induzida pelo primeiro ciclo de quimioterapia por câncer de mama bilateral. Existem duas possibilidades para explicar porque muitos pacientes apresentam uma maior sobrevida sem problemas hematológicos. Uma delas é o fenômeno natural chamado de reversão da mutação em

uma célula hematopoética precoce resultando em mosaicismos somáticos (HIRSCHHORN, 2003 citado por HUCK et al., 2006). Esta célula primitiva corrigida é capaz de numerosas divisões celulares e múltiplas diferenciações e irá recuperar toda a progênie normal em todas as linhagens hematopoéticas, resultando em mosaicismos somáticos. A segunda explicação para um longo tempo livre da doença, é a presença nos pacientes dos chamados "alelos hipomórficos", os quais codificam proteínas mutadas que são suficientemente estáveis e retêm uma capacidade de atividade residual (HUCK et al., 2006).

2.3 TRATAMENTO

O tratamento do paciente com AF consistia, até recentemente, de procedimentos paliativos e de suporte, os quais melhoravam e prolongavam suas condições de vida. Esses procedimentos incluíam a reposição dos derivados do sangue, administração de andrógenos ou corticosteróides para estimular a medula óssea, uso de antibióticos de amplo espectro e a prevenção à exposição a agentes que são potencialmente responsáveis por sangramento ou infecção.

O transplante de medula óssea (TMO) pode eliminar as manifestações hematológicas da doença que são as principais determinantes da sobrevivência do paciente, independente do grupo de complementação. No entanto, os pacientes são suscetíveis às complicações associadas ao uso de ciclofosfamida (ZANIS-NETO et al., 1995), além da maioria não possuir doador compatível.

Uma alternativa seria a transdução retroviral de um gene AF em células tronco hematopoéticas, opção bastante viável e que vem sendo estudada por vários centros. Apesar de úteis, os estudos de transferência gênica assim como o TMO, não interferem com as anormalidades do desenvolvimento ou com o risco de câncer em tecidos não hematopoéticos. Assim, a clonagem e o melhor conhecimento dos genes e proteínas AF, poderão trazer maiores esclarecimentos sobre seu papel em outros aspectos clínicos da AF, como a suscetibilidade ao câncer.

O tratamento de leucemia, nesta entidade clínica, é ineficiente e, em geral, os pacientes morrem dentro de 1 a 2 meses após o diagnóstico. Muitos deles têm pré existência de mielodisplasia ou pré-leucemia, sendo freqüentes anormalidades citogenéticas nos cromossomos 1 e 7, entre elas, monossomia ou deleção parcial ou translocações (STIVRINS et al., 1984; MAAREK et al., 1996). Thurston et al. (1999), com o objetivo de agilizar a detecção da monossomia do cromossomo 7, introduziram, como prática rotineira, a análise por Hibridização "*in situ*" por fluorescência (FISH), utilizando sondas centroméricas, o que possibilita uma intervenção terapêutica precoce, como o TMO, para prevenir ou retardar o início do processo leucêmico.

O tratamento para AF no Hospital de Clínicas da UFPR iniciou-se em 1979, tendo sido realizados mais de 180 transplantes de medula óssea. O tratamento ambulatorial dos pacientes que ainda não realizaram o TMO iniciou-se em 2000 com a colaboração do Hospital St. Jude, de Memphis, Estados Unidos.

Devido à grande sensibilidade dos pacientes aos agentes alquilantes e à irradiação, o Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC desenvolveu um protocolo específico para diminuir a toxicidade do tratamento e aumentar a sobrevivência do paciente. Transplantes alogênicos com doadores aparentados determinam uma regeneração completa da medula óssea em mais de 80%; porém, o mesmo não ocorre nos casos de doadores não aparentados (PASQUINI; ZANIS-NETO, 2004)

2.4 GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO: GENES, FUNÇÕES E MUTAÇÕES

A variabilidade no quadro clínico, tanto anatômico como fisiológico, a instabilidade cromossômica e a suscetibilidade aos agentes clastogênicos observada nos pacientes AF sugeriram a heterogeneidade desta doença. (SCHROEDER; ANSCHUTZ; KNOPP, 1964; FANCONI, 1967; GERMAN, 1972; SCHROEDER et al., 1976). Yoshida (1980) hibridizando fibroblastos de pacientes com AF com fibroblastos normais, observou que as alterações cromossômicas espontâneas e induzidas por MMC deixavam de ocorrer no híbrido, demonstrando a existência de complementação. Utilizando esta

1995; JOENJE et al., 1997) com o desenvolvimento de um sistema de seleção (complementação funcional). O método consiste na transfecção de DNA normal em células AF, que depois são selecionadas com DEB ou MMC. Somente as células AF cuja hipersensibilidade a estes agentes foram corrigidas, tem a capacidade de crescer e serem isoladas por técnicas moleculares.

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. Esta frequência é variável entre diferentes grupos étnicos. Os riscos associados a cada subtipo da AF, especialmente os mais frequentes, têm sido investigados por meio de 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).

2.4.1 Grupo de Complementação FA-A

O segundo gene a ser clonado foi o *FANCA*, através de experimentos realizados simultaneamente por dois grupos de pesquisadores que utilizaram diferentes abordagens, como a clonagem posicional (APOSTOLOU et al., 1996) e a complementação funcional (LO TEN FOE et al., 1996). O gene *FANCA* localiza-se em 16q34.3, entre os marcadores D16S121 e D16S303 (PRONK et al., 1995). *FANCA* contém aproximadamente 80pb e consiste de 43 exons, que variam de 34 a 188pb, em um total de 4368 nucleotídeos (IANZANO et al., 1997; KUPFER; NAF; D'ANDREA, 1997). O mRNA deste gene tem 5,5pb e codifica uma proteína com 1455 aminoácidos (163kDa). Esta se localiza predominantemente no citoplasma, desempenha funções no núcleo em associação direta com a proteína FANCG, por meio da sua porção N-terminal, e indiretamente com as proteínas FANCC e FANCG. Grompe e D'Andrea (2001) salientaram a importância da interação das proteínas AF do grupo principal,

incluindo FANCA, com a proteína BRCA1 em um modelo para o reparo de ligações cruzadas do DNA.

Levrán et al. (2005), descreveram, com base nos dados do IFAR (*International Fanconi Anemia Registry*), 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 tipos de mutações diferentes identificadas, sendo muitas delas pequenas inserções/deleções que determinam a produção de uma proteína alterada. Contudo, existem as deleções maiores que representam 40% das mutações encontradas neste gene e resultam na ausência total de expressão da proteína (mutação nula).

Os pacientes do grupo FA-A homocigotos para mutações nulas manifestam anemia severa em idade mais precoce e maior incidência de leucemia que os pacientes cuja mutação produz uma proteína FANCA alterada (SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003).

Na população brasileira, uma mutação no exon 38 do gene FANCA, constituída pela deleção dos nucleotídeos das posições 3788 a 3790 (del3788-3790del), foi encontrada com uma frequência de 30% dos pacientes estudados (MAGDALENA et al., 2005).

Em populações da África do Sul, deleções dos exons 11 a 17 e dos exons 12 a 31 são relativamente frequentes (JOENJE; PATEL, 2001).

2.4.2 Grupo de Complementação FA-B

A hipótese dos achados preliminares era de que o gene *FANCB* seria uma variante alélica decorrente de uma mutação do gene *BCRA2*, 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 FA-A. FAAPs são polipeptídeos associados à AF e estão entre os componentes ainda não identificados do complexo principal de

proteínas AF, com uma possível interação direta com FANCL e são aparentemente necessário para estabilizar essa proteína no complexo da AF.

O gene *FANCB* foi identificado através de estudos de transfecção e complementação, possui 853 aminoácidos (95kDa) e está localizado em Xp22.31, manifestando-se, portanto, somente no sexo masculino. A identificação de um gene ligado ao X associado com AF é importante para o diagnóstico e aconselhamento genético, porém este é um subtipo raro (frequência menor que 1%), e apenas quatro famílias foram identificadas com mutações *FANCB* até o presente (MEETEI et al., 2004).

2.4.3 Grupo de Complementação FA-C

O primeiro gene a ser clonado foi o *FANCC* (STRATHDEE et al., 1992). através de complementação funcional das alterações celulares. O gene *FANCC* está localizado no cromossomo 9q22.3 (GIBSON et al., 1993), em um intervalo de 5cM entre os marcadores D9S196/D9S197 e D9S176 (GIBSON et al., 1994). É composto por 14 exons, possui aproximadamente 80pb e codifica uma nova proteína, não homóloga a outras proteínas, com 558 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 63 kDa, de localização citoplasmática (YOUSSOUFIAN, 1994). Posteriormente, foi proposta também a sua localização nuclear (KUPFER et al., 1997b). O *FANCC* produz RNAs mensageiros de 2,3, 3,2 e 4,6 kb, devido a diferentes sítios de poliadenilação e "splicing" alternativo na região 5' não traduzida. A proteína *FANCC* 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 papel importante no controle do ciclo celular, no transporte de proteínas, na sobrevivência das células, na transdução de sinais e na regulação da detoxificação no citoplasma (BOGLIOLO et al., 2002).

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⁻). Esses fatores mutagênicos geram lesões nos cromossomos e quebras de dupla fita do DNA. A redução do oxigênio resulta na produção de superóxido (O₂⁻), hidroxila (OH⁻) radical livre e oxigênio simples (¹O₂). Estes agentes podem contribuir para danos cromossômicos de duas maneiras: (1) por interação química direta com a cromatina resultando em danos e (2) por interferência com enzima de reparo de DNA, que necessita ser removida pela enzima superóxido-dismutase (SOD), a qual, por sua vez, gera o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), cuja toxicidade deve ser detoxificada pela catalase (BOGLIOLO et al., 2002).

Muitos processos envolvem o metabolismo do oxigênio e a detoxificação de suas espécies reativas (ROS). A proteína FANCC tem sua participação conhecida no metabolismo dependente de citocromo P450 e na interação com a glutathione S transferase P1 (GSTP1). As proteínas da superfamília P450 catalisam a oxidação de um grande número de substâncias endógenas e xenobióticas. É necessária a participação de redutases no metabolismo dependente do citocromo P450, as quais fazem a transferência de elétrons do NADPH para P450. Em células do grupo FA-C a detoxificação é anormal, indicando um papel da FANCC como um regulador negativo da atividade redutase, sendo assim, uma atividade elevada das redutases pode originar a produção de ROS influenciando a sobrevivência das células.

Poucas mutações foram descritas no gene *FANCC*. A primeira alteração identificada foi 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%) na população de judeus Ashkenazi. Estas duas mutações estão associadas a um fenótipo grave da doença. As mutações R548X, 322delG, R185X são mais frequentes em indivíduos com origem ancestral do norte da Europa e estão associadas a fenótipos mais brandos (WHITNEY et al., 1994).

2.4.4 Grupo de Complementação FA-D1

O grupo de complementação D foi descrito por Whitney et al. (1995) e Jakobs et al. (1997) que identificaram mutações deletérias no gene que caracteriza a linhagem celular PD20, a qual era incapaz de complementar a linhagem celular HSC62, considerada de referência para o grupo FA-D. O gene *FANCD* foi mapeado usando uma fusão cromossômica microcelular, através da introdução de regiões do cromossomo humano 3p em uma linhagem celular *FANCD*, sensível a MMC, resultando em uma conversão para a resistência a MMC. Por este método, o gene *FANCD* foi mapeado em 3p22-26.

Em 2001, Timmers et al. demonstraram que este grupo apresenta uma heterogeneidade genética ao identificarem mutações nas linhagens celulares do gene *FANCD2* (PD20, VU008 e PD 733) de três famílias, não relacionadas, pertencentes ao grupo D e concluíram que o gene mutado nas linhagens *FANCD* é distinto do *FANCD2* e não está localizado no cromossomo 3, sendo designado *FANCD1*. Em seguida, o gene *FANCD1* foi reconhecido como sendo idêntico ao gene de suscetibilidade ao câncer de mama, o *BRCA2*, mapeado em 13q12-13 (HOWLETT et al., 2002). A principal função da proteína *BRCA2* (3418 aminoácidos com 380kDa) é a regulação do reparo do DNA por recombinação homóloga (HR) mediante o controle da recombinase *RAD51*. A *BRCA2* também participa na estabilização da dupla fita do DNA (TANIGUCHI; 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 deste tipo de mutações requer um monitoramento mais freqüente que permita intervenções terapêuticas precoces (WAGNER et al., 2004).

2.4.5 Grupo de Complementação FA-D2

Por clonagem posicional, Timmers et al. (2001) localizaram o *FANCD2* em 3p25.3. Foi o primeiro gene da AF que teve um gene homólogo encontrado em não vertebrados (*A. thalian*, *C. elegans* e *Drosophila*). Este gene contém 44 exons e codifica uma proteína com 1451 aminoácidos, apresentando duas proteínas isoformas, resultantes de modificações que ocorrem após a tradução: uma curta denominada FANCD2-S com 155 kDa e uma longa, FANCD2-L 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 fosforilada pela proteína ATM na serina da posição 222. O gene *ATM* codifica uma proteína-quinase 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; 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).

2.4.6 Grupo de Complementação FA-E

O gene *FANCE* foi mapeado por fusão celular e análise de complementação, no cromossomo 6p21-22, em uma região flanqueada pelos marcadores D6S422e D6S1610 (WAISFISZ et al., 1999). Este gene é composto por 10 exons e codifica uma nova proteína de 536 aminoácidos (60kDa) com dois sinais de localização nuclear (de WINTER et al., 2000a). A banda 6p21.2-22.3 onde o *FANCE* está localizado é uma região rica em genes codificadores de histonas, do complemento C4 e de classe I do MHC.

A FANCE faz parte do complexo nuclear formado pelas proteínas AF. Ela é necessária para que a FANCC permaneça no interior do núcleo e ainda estabelece uma ponte entre o complexo principal de proteínas AF e FANCD2 (PACE et al., 2002).

Devido a sua capacidade de ligar-se a FANCD2, ela tem sido descrita como fator de recrutamento de substrato do complexo principal da AF (GURTAN; D'ANDREA. 2006).

2.4.7 Grupo de Complementação FA-F

O *FANCF* foi identificado por complementação (DE WINTER et al., 2000b). O gene não tem introns e codifica um polipeptídeo com 374 aminoácidos (42kDa), homólogo à proteína de ligação ao RNA em procariontes (ROM), o que sugere que a *FANCF* pode ter um domínio de ligação a ácidos nucleicos. Com localização predominantemente nuclear, parece ter um papel importante na estabilização das associações entre as demais proteínas que constituem o complexo principal da AF (MEDHURST et al., 2006).

O *FANCF* foi mapeado em 11p15 entre os marcadores microssatélites D11S1359 e D11A929. Foram identificadas algumas variantes alélicas do *FANCF* que resultam em ausência de expressão desta proteína, devido à deleção dos nucleotídeos 230-252 até a mutação 484-485del, que resulta da deleção de somente dois pares de bases (DE WINTER et al., 2000c).

2.4.8 Grupo de Complementação FA-G

Saar et al. (1998) mapearam o gene *FANCG* no cromossomo 9p13 em uma região de 21 cM entre os marcadores D9S1678 e D9S175, utilizando o método de mapeamento por homoziguidade em uma família consanguínea.

Posteriormente, De Winter et al. (1998), demonstraram que este gene era idêntico ao *XRCC9*, localizado em 9p13, com funções na regulação do ciclo celular ou no reparo pós-replicação. Possivelmente ele atua no reparo do DNA pós-replicação, ou no controle dos pontos de checagem do ciclo celular.

Acredita-se que após a replicação, no final da fase S do ciclo celular, a *FANCG* possa ser fosforilada por quinases do próprio ciclo, e que esta promova a

remoção do complexo de proteínas AF que esteve ligado à cromatina, para reparo do DNA, durante a replicação (GURTAN; D'ANDREA, 2006).

O gene *FANCG* é formado por 14 exons que codificam uma proteína de 622 aminoácidos (68kDa). Sabe-se que a *FANCG* é necessária para a ligação entre *FANCA* e *FANCC* e que as três fazem parte do complexo principal de proteínas AF. A função adicional no reparo do DNA é via interação independente com *BRCA2*, que ocorre em resposta a um dano 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 (HUSSAIN et al., 2003).

Auerbach et al. (2003) estudaram a distribuição do gene *FANCG* com base nos registros do IFAR. 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.

2.4.9 Grupo de Complementação FA-H

O grupo de complementação *FANC-H*, descrito por Joenje et al. (2000) como sendo o *FANC-A*, identificado através de estudos na linhagem celular HSC72, e não havia sido incluída no grupo *FA-A*, nos estudos iniciais, porque apresentava uma reversão fenotípica que impossibilitou a detecção da correção por complementaridade na fusão híbrida. Estudos posteriores demonstraram que esta linhagem apresentava uma heterozigose composta, com duas novas mutações, uma no exon 29 e a deleção dos exons 17 ao 31 do gene *FANCA* (JOENJE et al., 2000).

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).

2.4.10 Grupo de Complementação FA-I

Levitus et al. (2004) estudaram 8 pacientes AF não relacionados, que foram excluídos dos subtipos de linhagem celular de complementação conhecidos. Quatro destas linhagens estudadas não complementaram uma a outra em células do híbrido, e foram classificadas em um novo grupo, o I. As linhagens celulares remanescentes complementaram o grupo FA-I, porém não complementaram uma a outra, representando então outro novo grupo, denominado FA-J. Ambas as linhagens são 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 (GODTHELP et al., 2006).

O gene *FANCI* identificado recentemente por Smogorzewska et al. (2007) está mutado em linhagens de células do grupo FA-I. O *FANCI* foi mapeado no cromossomo 15q25-26 e sua proteína com 1328 aminoácidos (150kDa) corresponde a uma variante do loco KIAA1794. Este gene apresenta regiões homólogas com o gene *FANCD2* e seu produto também é monoubiquitinado. A FANCI liga-se a FANCD2 e ambas ubiquitinadas formam um complexo à jusante na via de interação AF/BRCA, necessário para o reparo de ligações cruzadas do DNA.

2.4.11 Grupo de Complementação FA-J

Levitus et al. (2004) descreveram o grupo FA-J quando as células foram capazes de monoubiquitinar a proteína FANCD2, sugerindo que o defeito envolvendo este grupo de complementação pode estar localizado à jusante da monoubiquitinação da FANCD2, de acordo com o mecanismo proposto para AF.

O gene *FANCI* (*BRIP1*) foi mapeado no cromossomo 17q22-24, possui 1249 aminoácidos (130kDa) e codifica a proteína FANCI que foi descrita como um membro da família das RecQ DEAH helicases. Essas enzimas processam arranjos

irregulares do DNA, como as junções *holliday*, formadas durante a recombinação homóloga, ou as estruturas estendidas a partir de forquilhas de replicação. A FANCIJ também chamada de 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 disto, estas proteínas têm uma ligação direta com a recombinação homóloga interagindo com a BRCA1 (LEVITUS et al., 2005).

2.4.12 Grupo de Complementação FA-L

O gene *FANCL* foi identificado baseado em estudos de associação em proteínas, definindo mais um grupo de complementação, o grupo L. O *FANCL* foi mapeado no cromossomo 2p16.1 e codifica uma proteína com 375 aminoácidos (43kDa) (MEETEI et al., 2003). Estes autores detectaram um componente do complexo principal, chamado PHF9 (*PHD finger protein 9*) que possui atividade de E3 ubiquitina ligase. Este gene PHF9, também chamado *FANCL*, codifica três repetições de WD40, as quais são conhecidas pela função de mediar interações proteína-proteína. Ele codifica também um domínio PHD, que é variante de domínios do tipo RING, conhecidos por possuírem atividade E3 ubiquitina ligase. Estes estudos levaram ao melhor entendimento do mecanismo de atuação das proteínas AF em resposta aos danos, pois não se conhecia que as proteínas envolvidas na monoubiquitinação da FANCD2 apresentavam um sítio específico com atividade ubiquitina ligase (GURTAN; STUCKERT; D'ANDREA, 2006).

2.4.13 Grupo de Complementação FA-M

Meetei et al. (2005) descreveram um outro grupo de complementação, o grupo M. O *FANCM* foi mapeado no cromossomo 14q21.2 e seu produto é uma proteína de 2048 aminoácidos (250kDa). A proteína FANCM tem seqüências similares às 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.

O domínio helicase da FANCM usa a energia da hidrólise do ATP para translocar-se sobre o DNA, possibilitando a dissociação das seqüências de DNA tripla hélice. A FANCM atua como "locomotiva" que transporta o complexo de proteínas AF ao longo do DNA. Supostamente este deslocamento permite ao complexo detectar os danos causados ao DNA (MEETEI et al., 2005).

2.4.14 Grupo de Complementação FA-N

Xia et al. (2007) descreveram o grupo de complementação N estudando um paciente não classificado nos demais grupos de complementação de AF. Os indivíduos deste grupo apresentam a monoubiquitinação da proteína FANCD2 normal.

O gene candidato para codificar a proteína alterada correspondente ao grupo N é o *PALB2*, mapeado no cromossomo 16p12.1. Este codifica uma proteína que interage com o BCRA2 no núcleo, e atua à jusante da monoubiquitinação da FANCD2, em associação à BRCA2, promovendo sua localização e estabilidade, facilitando as funções da BRCA2 no reparo do DNA.

A perda da função, resultado de uma mutação bialélica em *PALB2*, pode ser uma das causas da AF. 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 pela RAD51 e a sensibilidade à MMC (XIA et al., 2007).

A AF causada por mutações em *PALB2* pode representar uma variante extrema da doença com respeito à gravidade do fenótipo clínico, especialmente em relação ao tempo para o estabelecimento da anemia e ao alto risco de câncer na infância, de maneira semelhante aos pacientes com mutações bialélicas em *BRCA2* (*FANCD1*). Sendo a *PALB2* 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 tumor (REID et al., 2007).

Rahman et al. (2006) descreveram 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.

Estes resultados sugerem que a via de estabilização da AF no genoma deve ser controlada por pelo menos 13 diferentes genes. No quadro 1 estão descritos todos os grupos de complementação, as linhagens estudadas, bem como os genes correspondentes e suas localizações.

QUADRO 1 - GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO EM AF, RESPECTIVOS GENES E LOCALIZAÇÃO

SUBTIPO	LINHAGEM DE REFERÊNCIA ⁽¹⁾	GENE	LOCALIZAÇÃO
FA-A	HSC72	<i>FANCA</i>	16q24.3
FA-B	HSC230	<i>FANCB(FAAP95)</i>	Xp22.31
FA-C	HSC536	<i>FANCC</i>	9p22.3
FA-D1	HSC62	<i>FANCD1(BRCA2)</i>	13q12.3
FA-D2	PD20	<i>FANCD2</i>	3p25.3
FA-E	EUFA130	<i>FANCE</i>	6p21.22
FA-F	EUFA121	<i>FANCF</i>	11p15
FA-G	EUFA143	<i>FANCG(XRCC9)</i>	9p13
FA-I	EUFA592	<i>FANCI(KIAA1794)</i>	15q25-26
FA-J	EUFA543	<i>FANCI(BRIP1)</i>	17q22-24
FA-L	EUFA868	<i>FANCL(PHF9)</i>	2p16.1
FA-M	EUFA867	<i>FANCM(Hef / FAAP250)</i>	14q21.2
FA-N	EUFA1341	<i>FANCN(PALB2)</i>	16p12.1

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

(1) Linhagens utilizadas nos estudos de complementação para definir o subtipo.

2.5 FREQUÊNCIA DOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO

Faivre et al. (2000) estudaram um total de 245 pacientes AF provenientes de 179 famílias, de 24 países registrados durante o período de 1989-1999 pelo EFARG (European Fanconi Anemia Research Group) e obtiveram a seguinte classificação: 172 pacientes do grupo A (70,2%); um do grupo B (0,4%); 34 do grupo C (13,9%); três do grupo D (11,2%); cinco do grupo E (2%); seis do grupo F (2,5%) e 24 do grupo G (9,8%).

A frequência de pacientes por grupo de complementação referido pelo "European Fanconi Anemia Research Programme" (1994-2003), baseado em 241

famílias com AF incluindo os 11 grupos, é estimada, como sendo: 65,8% do grupo A; menor que 1% do grupo B; 9% do grupo C, 6% do grupo D; 2% do grupo E; 2% do grupo E; 2% do grupo F; 9% do grupo G; menos de 2% do grupo I; menos de 2% do grupo J e menos de 1% do grupo L (citado por LEVITUS et al., 2004).

A gravidade clínica da doença tem sido associada ao genótipo do paciente portador da AF. Os pacientes do grupo FA-G apresentaram as citopenias mais severas e maior incidência de leucemias. As anomalias congênitas são de menor prevalência no grupo FA-C e mais freqüente nos grupos FA-D, FA-E e FA-F (SAGASETA DE ILURDOZ et al., 2003).

Pacientes do grupo FA-A, homocigotos para a mutação que resulta em um alelo 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.

Outro estudo realizado por Wagner et al. (2004) sugere que pacientes com mutações bialélicas em *BRCA2* (ambas formas de expressão do gene apresentam mutações bialélicas deletérias, em homocigose ou em heterocigose composta), mostram um alto risco de desenvolver leucemia aguda durante os primeiros cinco anos de vida. De forma semelhante, os pacientes com mutações bialélicas em *FANCN* (*PABL2*) podem representar um subtipo com fenótipo clínico de alta complexidade. Reid et al. (2007) concluíram que o teste genético 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 grupo de complementação freqüentemente pesquisados.

O gráfico 1, elaborado com base no estudos feitos por Shimamura (2006), apresenta os 12 grupos de complementação melhor caracterizados até o momento, e a estimativa da freqüência do grupo FA-N (REID et al., 2007).

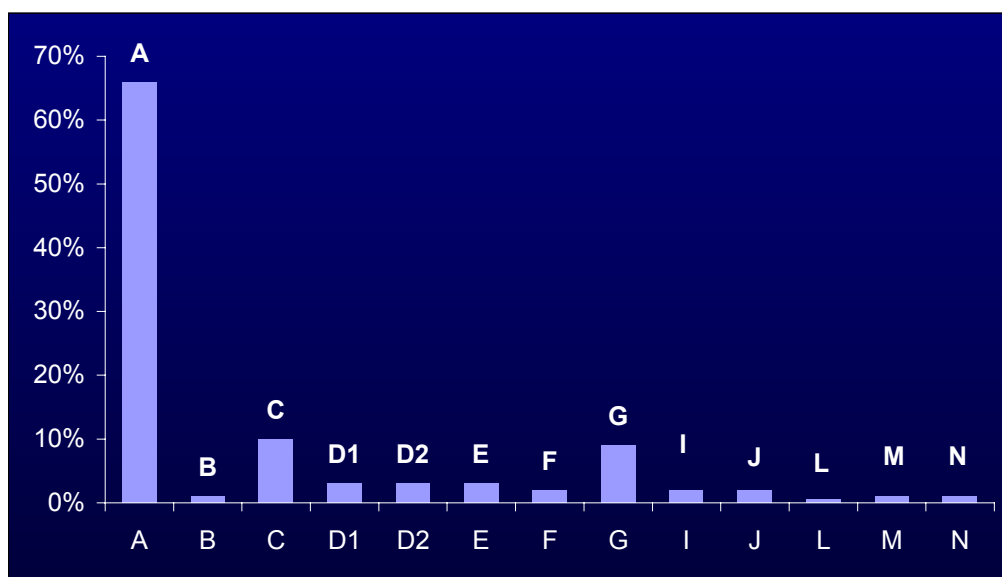


GRÁFICO 1 - FREQUÊNCIA DOS GRUPOS DE COMPLEMENTAÇÃO NA AF

FONTE: Adaptado de Shimamura (2006) e Reid et al. (2007)

2.6 ETIOPATOGENIA DA ANEMIA DE FANCONI

Baseado no fato de que nas famílias estudadas poucos filhos eram afetados e na incidência de consangüinidade entre os pais, admitiu-se um padrão de herança autossômica recessiva (citado por OLIVEIRA, 2001). Porém, a variabilidade de sintomas, malformações congênitas, a diferença na idade em que as manifestações hematológicas têm início, a frequência de leucemias e mielodisplasias, nestas famílias, serem maior que do na população em geral, eram contra uma herança recessiva. Somente com a elucidação da heterogeneidade genotípica da AF e a suscetibilidade aos agentes clastogênicos que introduzem ligações cruzadas (*cross-linking*) na molécula de DNA, pôde-se entender o caráter autossômico recessivo da AF. Este padrão de herança foi confirmado pelos estudos de análise de segregação em 90 famílias, realizados por Schroeder et al. (1976) e de 88 pacientes do *International Fanconi Anemia Registry* (IFAR) realizado por Rogatko e Auerbach (1988). Em 2004 Meetei et al. identificaram que o gene *FANCB* que está localizado no cromossomo X, caracterizando também herança ligada ao X na AF.

Além de apresentarem alta frequência de quebras cromossômicas espontâneas e suscetibilidade aos agentes clastogênicos, o envolvimento de muitos processos celulares têm sido sugeridos na patofisiologia da AF, entre eles, reparo do DNA (reparo de ligações cruzadas), regulação do ciclo celular (anormalidades manifestadas pela prolongação da fase G2) e aumento da apoptose (morte celular programada) (JOENJE et al., 1981; DUTRILLAUX et al., 1982; REY; SCOTT; MULLER, 1994; RUPPITSCH et al., 1997; LACKINGER et al., 1998).

2.6.1 Reparo do DNA

Vários autores admitem que a AF seja uma doença de reparo do DNA devido as células destes pacientes apresentarem alterações cromossômicas estruturais espontâneas (SASAKI, 1975, 1980; BARTRAM, 1980; KIDSON, 1980), além de demonstrarem uma capacidade reduzida de reparo das ligações cruzadas induzidas pela MMC e pelo DEB, sugerindo um defeito primário na via de regulação do 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, necessitam de um sistema de reparo dos danos evitando o aparecimento de mutações (SOBECK et al., 2006).

Após uma lesão, a célula ativa primeiramente os mecanismos de checagem de ponto que prolongam as fases do ciclo celular, possibilitando que o DNA seja reparado. Em seguida, atuam mecanismos de reparo do DNA que corrigem quebras na dupla fita. Os agentes ativam um grande número de genes de pontos de checagem e de reparo, e os produtos destes genes cooperam em uma rede de sinalização intracelular (GREGORY; TANIGUCHI; 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. Sabe-se que ocorre um prolongamento na fase S do ciclo celular, para que o reparo aos danos ocorra, onde é ativado o mecanismo AF/BCRA

pela monoubiquitinação da proteína FANCD2. Ainda falta elucidar o papel preciso das proteínas AF na resposta às ligações cruzadas (GODTHELP et al., 2006). Muitos 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 homólogas (NEHJ), a excisão de nucleotídeos e a recombinação homóloga. Os principais serão considerados a seguir.

2.6.1.1 Recombinação homóloga

A recombinação homóloga é um processo de reparo do DNA sem alterações da seqüência nucleotídica recombinada. Os eventos ocorrem de maneira precisa, sendo que nenhum nucleotídeo seja perdido ou ganho durante a recombinação (D'ANDREA; GROMPE, 2003).

A recombinação homóloga acontece em todos os organismos e pode ocorrer entre quaisquer duas moléculas de DNA de dupla fita com regiões de seqüências similares, não necessariamente idênticas, podendo gerar moléculas de DNA com seqüências novas. Este mecanismo é de grande importância no reparo de quebras de dupla fita e de outros tipos de danos causados ao DNA. A RAD51 é a molécula central no mecanismo de recombinação homóloga e é ela que forma filamentos de nucleoproteína no DNA e promove a troca entre seqüências homólogas (GODTHELP et al., 2006).

Muitas proteínas estão envolvidas no mecanismo de recombinação homóloga como a BRCA2/FANCD1, que se liga diretamente a RAD51. Os alvos de reparo são estabelecidos no local onde ocorreu o dano e provavelmente representam centros localizados de reparo destas lesões. Entre as proteínas que participam de maneira direta ou indireta, estão a RAD52, RAD54, a proteína da replicação A (RPA) e a BRCA1 (NAKANISHI et al., 2005; GODTHELP et al., 2006).

Duas moléculas de DNA fita dupla 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 moléculas de DNA oposta, formando duas hélices duplas intactas. As incisões nas fitas de DNA são seladas para que a recombinação ocorra e as duas fitas de DNA fiquem ligadas fisicamente. Este passo é conhecido como "troca de fitas cruzadas ou junções *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 (COOPER; HAUSMAN, 2006).

2.6.1.2 Junção de terminações não homólogas (NHEJ)

Este é um mecanismo com tendência a erros, muito simples e direto no reparo de ligações cruzadas do DNA que envolve o corte e a ligação dos fragmentos. 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, sendo observadas deleções maiores e em maior número, quando comparado a células normais (D'ANDREA; GROMPE, 2003).

2.6.1.3 Ubiquitinação

O direcionamento das proteínas envolvidas nos processos de checagem e reparo para o foco nuclear, é a característica fundamental em resposta aos danos de DNA. Estes focos são sítios para a replicação do DNA e ou prolongamento da fase de síntese do DNA. Estudos recentes indicam que o direcionamento das proteínas requer modificações pós-translacionais como a adição de uma molécula de ubiquitina (monoubiquitinação). Após a marcação, estas proteínas atingem o foco nuclear, em seguida ocorre a transdução de sinais que levam ao prolongamento do ciclo celular para a replicação e ou reparo aos danos. Possíveis falhas neste direcionamento

resultam em acúmulo de material danificado, instabilidade do genoma e em câncer (TANIGUCHI; D'ANDREA, 2006).

A ubiquitinação foi primeiramente descrita pelo seu envolvimento no processo de degradação mediada pelos proteossomos e geralmente associada a uma poliubiquitinação. É a ligação de moléculas de ubiquitina a um substrato alvo. Sabe-se hoje que ela 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 (GURTAN; STUCKERT; D'ANDREA, 2006).

O processo de ubiquitinação envolve uma cascata de três enzimas: E1, E2 e E3. No mecanismo proposto para a interação das proteínas AF, a FANCL desempenha a função de E3 ubiquitina ligase, a qual é capaz de intermediar a transferência da molécula de ubiquitina para o substrato, além de conferir especificidade a esta ligação. A enzima E1 ativa uma molécula de ubiquitina através da hidrólise de ATP e depois transfere, por meio de uma ligação tioéster, esta molécula para uma enzima E2 que tem atividade ubiquitina conjugase (GURTAN; STUCKERT; D'ANDREA, 2006).

No mecanismo proposto, o domínio PHD da FANCL que é do tipo RING, recruta e interage com o componente E2, o qual interage com o domínio PHD da FANCL. Uma interação direta da FANCL parece não ocorrer, no entanto, a FANCE tem sido indicada como fator de recrutamento do substrato (FANCD2) que intermedia a sua ligação com a E3 ligase (FANCL) (GURTAN; STUCKERT; D'ANDREA, 2006).

2.6.2 Alterações do Ciclo Celular

Anormalidades no ciclo celular de pacientes AF foram primeiramente descritas por Sasaki em 1975 (citado por HEINRICH et al., 1998) observando que a fase G2/M das células AF é mais prolongada do que as das células normais. Esta observação inicial foi enfatizada por Elmore e Swift (1975) e por Dutrillaux e Fosse (1976) ao constatarem que enquanto nos linfócitos normais a duração do ciclo celular, embora

apresente variações, em geral, ocorre em pouco menos de vinte horas, nas células de pacientes com AF é aproximadamente duas vezes maior.

Dutrillaux et al. (1982) utilizando BrdU (5-bromo-2'desoxiuridina) para estudar o ciclo celular em linfócitos de 18 pacientes AF, observaram que a lentidão do mesmo, quando comparado ao do grupo controle, é devido a uma fase G2 longa. Além disso, constataram que existe uma relação entre a lentidão do ciclo e as anomalias de cromátides, pois as células mais lentas, são mais freqüentemente portadoras de figuras radiais do que as mais rápidas, no mesmo paciente.

Kupfer et al. (1997a) demonstraram que a expressão da proteína FANCC é regulada durante a progressão do ciclo celular. Na sincronização de células HeLa, a expressão da proteína FANCC aumentou durante a fase S, chegou no máximo na transição de G2/M e declinou durante a fase M. Além disso, a proteína FANCC coimunoprecipitou com a quinase dependente de ciclina cdc^2 . Eles também testaram a forma de ligações de várias proteínas FANCC mutantes com a cdc^2 . Uma proteína mutante de um paciente, contendo uma mutação de ponto L554P, não se ligou a cdc^2 , demonstrando que a interação FANCC/ cdc^2 está relacionada a função da proteína FANCC. A ligação da FANCC a cdc^2 foi mediada por 50 aminoácidos da região carboxi terminal da FANCC. Estes dados sugerem que a interação FANCC/ cdc^2 é requerida para a progressão G2/M normal nas células de mamíferos. Estes autores, propuseram então, que a falta de interação FANCC/ cdc^2 , nas células AF podem desencadear anormalidades no ciclo celular e anormalidades clínicas da AF.

Sala-Trepat et al. (2000) determinaram a proporção de replicação e parada das células na fase S do ciclo celular e observaram que, enquanto as células normais cessam a replicação na presença de 4, 5',8-trimetilpsolaren (Me(3)Pso), os linfoblastos AF não interrompem a síntese de DNA. Estes dados sugerem que em resposta aos danos induzidos por agentes alquilantes, o ponto de checagem na fase S é ineficiente nas células AF, o que poderia levar à acumulação de lesões secundárias, como quebras e falhas simples e duplas no filamento de DNA. Isto justificaria uma fase G2

prolongada nas células AF, na tentativa de remover lesões que se acumularam durante a fase S anormal.

2.6.3 Apoptose

Os estudos sobre apoptose em células AF apresentam, em geral, informações não concordantes.

Rey, Scott e Muller (1994) demonstraram que linfoblastos AF tratados com MMC apresentaram fragmentação celular, condensação da cromatina e degradação do DNA, características da apoptose. Observaram que, 24 horas depois da adição da droga, havia um decréscimo no número de células na fase G2/M do ciclo celular, coincidindo com a presença de células apoptóticas na fase G1 posterior, indicando que ocorreu apoptose nas células que ultrapassaram a fase G2/M. Além disso, verificaram que o nível de fragmentação do DNA 48 horas após o tratamento com MMC foi aproximadamente 33%, tanto nas células AF como nas células normais ou controles, atingindo 60% após 98 horas. Como o nível de apoptose foi igual nas linhagens AF e controles, os pesquisadores concluíram que o defeito AF não conduz à apoptose anormal.

Rosselli et al. (1995) evidenciaram que a taxa de apoptose nas células AF é drasticamente reduzida quando submetidas à radiação gama, embora a taxa espontânea de apoptose seja mais elevada nas culturas de células AF do que nas normais. Como a indução da apoptose por radiação é um mecanismo dependente da proteína p53, esta foi examinada nas células AF pertencentes aos grupos de complementação C e D. Estes pesquisadores observaram que a proteína p53 não é induzida pela irradiação nas células AF, ao contrário do que ocorre com células normais. Como o gene supressor de tumor *TP53* codifica um ativador de transcrição cujos alvos incluem genes que regulam a estabilidade genômica, resposta celular aos danos de DNA e progressão do ciclo celular, estes autores sugeriram que a expressão alterada do *TP53* poderia ser relevante para o fenótipo AF.

Kruyt et al. (1996) observaram que linfoblastos AF imortalizados pelo vírus Epstein-Barr (EBV) apresentaram alta suscetibilidade à apoptose e à ativação do gene *TP53*. Nas células AF do grupo de complementação FANCC tratadas com MMC, a apoptose ocorreu após a parada do ciclo celular na fase G2. Em células do grupo FANCC estáveis transfectadas, a expressão da proteína FANCC selvagem citoplasmática liberou a parada na fase G2 dependente da MMC e suprimiu a ativação do *TP53*. No entanto, tanto em linfoblastos AF como nos não AF, não houve indicação de o *TP53* ser o causador da iniciação da apoptose dependente da MMC, já que a super-expressão de um *TP53* mutante, dominante-negativo afetou a sobrevivência da célula. Além disso, nenhuma diferença no nível de expressão do *BCL-2*, um inibidor da apoptose, foi observada entre as células AF e as não AF, tanto na ausência como na presença da MMC. Baseados nestas informações os autores sugeriram que a proteína FANCC pode funcionar em uma via da apoptose ainda a ser identificada, e que é independente do *TP53*.

Ridet et al. (1997) demonstraram que, independentemente do dano no DNA, a alteração no controle da apoptose na AF está relacionada também com a via iniciada pela ativação do Faz, um receptor de superfície que pertence à família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF). Demonstraram, também, que a expressão do gene *FANCC* selvagem, corrige a sensibilidade aumentada à MMC, as anomalias na apoptose no ciclo celular nas células AF. Todos estes dados levaram os autores a concluir que os genes da AF estão envolvidos no controle da apoptose.

Rathbun et al. (1997) testaram a hipótese de que as células progenitoras hematopoéticas (HPC) da medula óssea de crianças, pertencentes ao grupo de complementação FANCC, são hipersensíveis ao efeito inibitório mitótico do interferon-gama (IFN- γ), e que a via Faz está envolvida na morte celular programada em resposta a baixas doses de IFN- γ nas células AF. Após experimentações, chegaram à conclusão de que a proteína FANCC normal atua, em parte, como sinalizadora para IFN- γ . Rathbun et al. (2000) admitiram que a morte celular programada mediada pela Faz, em várias células, envolve a ativação seqüencial de caspases específicas. Os

autores testaram à hipótese de que a morte celular programada nas HPC da AF envolve a ativação ordenada de moléculas específicas de caspase. Usando lisados de linfoblastos tratados com anticorpos anti-faz e IFN- γ , contendo membros ativados da família de caspases 3 (caspase 3, 6 e 7), bem como caspase 8, observaram que o efeito apoptótico das células do grupo FANCC foi bloqueado quando pré tratadas com inibidores da protease da caspase 3. O tratamento das células AF com inibidores da caspase 8 suprimiu a ativação da caspase 3. Portanto, a apoptose induzida pela Faz nas células do grupo FANCC envolve ativação da caspase 8, que controla a ativação das caspases da família 3 e a proteína FANCC, direta ou indiretamente, funciona para suprimir respostas apoptóticas do IFN- γ antes da ativação da caspase 3.

2.6.4 Instabilidade Cromossômica

As células dos pacientes AF mostram crescimento lento em cultura e uma fragilidade cromossômica caracterizada tanto por aumento espontâneo na taxa de quebras cromossômicas como por hipersensibilidade a agentes alquilantes, como a mitomicina C (MMC) e o diepoxibutano (DEB) (AUERBACH; WOLMAN, 1976). Após a exposição a estes agentes, as células de portadores de AF apresentam alterações que incluem além da indução de alterações cromossômicas (quebras e rearranjos), um retardo na fase G2 do ciclo celular com conseqüente diminuição de células em divisão e morte celular (ISHIDA; BUCHWALD, 1982). Molecularmente, ocorre a formação de ligações cruzadas na dupla hélice do DNA, tanto inter como intra-fita (ICLs), o que leva a um bloqueio da replicação do DNA e transcrição de RNA, que deve ser reparado para permitir a sobrevivência da célula e sua função celular (WANG; D'ANDREA, 2004).

As quebras ocorrem casualmente em todos os cromossomos do genoma, porém são observadas preferencialmente nas bandas G claras e sítios frágeis (KOSULL; AULA, 1973; PORFIRIO et al., 1991), que têm sido associados com pontos de quebra em locos de oncogenes e outros genes envolvidos no processo cancerígeno (HETCH, 1988). Fundia, Gorla e Larripa (1994), por exemplo, detectaram 5 bandas localizadas em: 1p22; 1q21; 1p36; 3p14 e 3q21 que são coincidentes com locais de quebras

envolvidas no câncer, 4 destas bandas (80%) localizadas em 1p36; 1q21; 3p14 e 3q21 foram associadas com locais de quebras presentes na leucemia mielóide aguda (LMA).

Devido à sensibilidade celular aos agentes clastogênicos, a AF é frequentemente comparada com outras síndromes que demonstram sensibilidade a drogas e instabilidade genômica, incluindo o Xeroderma Pigmentoso (XP), a Ataxia-telangiectasia (AT), a Síndrome de Bloom (SB), a Síndrome de Cockayne (SC) e o Câncer Colorretal Não Poliposo Hereditário (HNPCC). Em todas estas doenças, já foi descrita a atuação de genes envolvidos no reparo do DNA ou com a regulação do ciclo celular, sugerindo que a instabilidade genômica resulte de uma deficiência celular em um ou vários processos, incluindo reparo do DNA, regulação do ciclo celular ou replicação do DNA (D'ANDREA; GROMPE, 1997).

A hipersensibilidade das células AF a drogas que causam estas ligações cruzadas indica um defeito na via de reparo que é específica para ICLs (WANG; D'ANDREA, 2004).

2.7 DIAGNÓSTICO

2.7.1 Citogenético

A AF foi a primeira doença associada à presença de quebras cromossômicas espontâneas na cultura de linfócitos (SCHROEDER; ANSCHUTZ; KNOPP, 1964). Estes autores, analisando citogeneticamente dois irmãos afetados, detectaram em mais de 40% das metáfases analisadas rearranjos e quebras cromossômicas. Posteriormente Schroeder e German (1974) e Dosik, Steier e Lubiniecki (1979) demonstraram que as alterações mais frequentes são as quebras de cromátides, isocromátides e figuras radiais.

O diagnóstico clínico da AF é difícil, devido a grande variabilidade fenotípica, tanto em relação à presença como à gravidade dos sinais e sintomas. Segundo D'Andrea e Grompe (1997), aproximadamente 33% dos pacientes com AF não possuem anorma-

lidades congênitas e muitos deles, mesmo que apresentem malformações anatômicas, não são diagnosticados até que as alterações hematológicas se manifestem, o que pode ocorrer em alguns casos na idade adulta. Níveis aumentados de hemoglobina fetal e macrocitose são comumente observados, mas a ausência destes achados não exclui o diagnóstico (BAGBY; ALTER, 2006).

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

Considerando que as células AF têm uma frequência aumentada de quebras cromossômicas espontâneas comparadas com as das células normais e que esta frequência pode ser amplificada, pela adição ao meio de cultura de agentes clastogênicos ou alquilantes que induzem, inclusive, a formação de figuras radiais (figura 1), tais observações são utilizadas para a confirmação do diagnóstico da doença (SCHULER; KISS; FABIAN, 1969; SASAKI, 1975; AUERBACH; WOLMAN, 1976, 1978; POLL et al., 1984; TIMME; MOSES, 1998).

Os agentes alquilantes mais utilizados são a mitomicina C (MMC) e o diepoxibutano (DEB), sendo que esse é preferencialmente usado pela maioria dos laboratórios, porque admite-se que a MMC apresenta 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 comprometida (AUERBACH, 1993).

O exame pode ser feito na cultura de linfócitos, fibroblastos, amniócitos ou células da vilosidade coriônica. Usualmente se usam linfócitos estimulados com fitohemaglutinina (PHA) na presença de baixas doses de DEB ou MMC. Após o cultivo celular, é feita a quantificação de quebras cromossômicas ocorridas nas células AF,

incluindo formações radiais que são características da doença. Os resultados são apresentados em número de alterações por células (usualmente são analisadas 50 células) assim como a porcentagem de células com alterações (AUERBACH, 1993). De acordo com o IFAR, homozigotos para AF têm uma média de 8,96 (variação de 1,3 a 23,9 quebras por célula), análise feita em células de sangue periférico cultivados com DEB, comparada a uma média de 0,06 (variação de 0 a 0,36) nas mesmas células de indivíduos normais (AUERBACH; ROGATKO; SCHROEDER-KURTH, 1989).

Apesar do teste citogenético com DEB ser altamente específico e sensível, ele não é capaz de distinguir entre os diferentes grupos de complementação e de identificar os heterozigotos (AUERBACH; ADLER; CHAGANTI, 1981).



FIGURA 1 - CROMOSSOMOS DE PACIENTE COM AF DEMONSTRANDO FRAGMENTOS (1), FIGURAS RADIAIS (2) E QUEBRAS CROMOSSÔMICAS (3)

FONTE: A autora

2.7.2 Clínico

Através do estudo de 328 pacientes registrados no IFAR, Auerbach, Rogatko e Schroeder-Kurth (1989), além de demonstrarem estatisticamente que a sensibilidade aumentada ao efeito clastogênico de DEB é um fator discriminativo para a AF, desenvolveram um sistema de escore para o diagnóstico clínico, baseado em oito sinais (retardo de crescimento, pigmentação anormal, anormalidade renal e urinária, microftalmia, dificuldades no aprendizado, trombocitopenia, anormalidade de rádio e polegar e outras anormalidades esqueléticas). Os seis sinais que obtiveram coeficiente positivo foram, microcefalia, marcas de nascimento (manchas hiperpigmentadas) e anomalias renais e urinárias, trombocitopenia, retardo de crescimento e anomalias de rádio e polegar. Entre os dois sinais que obtiveram coeficiente negativo estão a dificuldade do aprendizado e outras anormalidades esqueléticas. O diagnóstico é feito somando um ponto para cada um dos seis sinais positivos e subtraindo um ponto para cada um dos sinais negativos. Os pacientes com escore, por exemplo, + 2 têm 75% de probabilidade de serem afetados por AF.

2.7.3 Ensaio de Complementação

A subtipificação em grupos de complementação que correspondem à deficiência genética em todos os pacientes AF é uma metodologia complexa para uso em rotina clínica. Os métodos atuais utilizam linfócitos de sangue periférico, linhagens EBV ou fibroblastos de 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).

Segundo Shimamura et al. (2002), o método de *Western Blot* pode ser utilizado para detectar a correção da mutação do gene defeituoso pelo DNAc transduzido, permitindo uma subtipificação mais precisa da AF. Estão sendo produzidos anticorpos monoclonais para as proteínas dos diferentes subtipos da AF e o método de *Western*

Blot poderá ser uma alternativa para o uso na pré-classificação dos pacientes com diagnósticos da AF.

2.7.4 Western Blot para FANCD2

Esse novo teste descrito por Shimamura et al. (2002), quando associado à clínica do paciente e aos testes de quebras cromossômicas, permite uma melhor caracterização dos pacientes AF. O teste também facilita a detecção da reversão somática no sangue periférico e a definição dos casos de mosaicismo pela análise de fibroblastos de pele. No entanto, não é um procedimento de rotina, sendo utilizado somente para o desenvolvimento de projetos de pesquisa.

O método permite a detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 em linfócitos de sangue periférico em cultura celular. A ausência da forma ubiquitinada da proteína FANCD2 (FANCD2-L) em decorrência de mutações nas proteínas formadoras do complexo principal da AF ou na própria FANCD2, determina uma falha no mecanismo de reparo e conseqüentemente à expressão fenotípica de muitas características observadas na AF. A ausência da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 correlaciona-se com o diagnóstico de AF por ser uma característica específica desta doença (SHIMAMURA et al., 2002).

Este novo método juntamente com o teste de quebras cromossômicas em pacientes AF, possibilita a identificação de qual etapa da via de interação das proteínas AF/BRCA se encontra alterada (BAGBY; ALTER, 2006).

2.7.5 Pesquisa de Mutações

A clonagem dos genes AF teve um grande impacto no diagnóstico e no tratamento dos pacientes portadores de AF. A análise direta do DNA dos genes AF, permitirá um diagnóstico mais rápido, preciso e será possivelmente a base para estudos pré-natais em famílias afetadas, através do seqüenciamento completo do genoma ou da pesquisa de mutações por DHPLC (*denaturing high performance liquid*

chromatography) que são técnicas de alto custo e disponíveis somente em centros especializados (BAGBY; ALTER, 2006).

A identificação de mutações específicas na AF é bastante complexa devido ao grande número de genes associados a esta doença, e às diferentes mutações encontradas em cada um deles. Além disso os procedimentos metodológicos como seqüenciamento, SSCP, são sofisticados, embora utilize também outros de menor complexidade como a amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Cerca de 65 a 70% dos pacientes AF apresentam mutações no gene *FANCA* e 40% das mutações deste gene são deleções de grandes segmentos de DNA. Os testes moleculares são atualmente indicados para casos de diagnóstico pré-natal, detecção de portadores em famílias com afetados e em grupos étnicos com freqüência elevada de mutações específicas (JOENJE; PALS; ZWAAN, 2004).

O estudo molecular é de grande importância para a identificação de pacientes com mosaïcismo somático onde o teste do DEB pode resultar falso negativo (DOKAL, 2000).

2.7.6 Mosaïcismo

A presença do mosaïcismo é observada na AF, o qual pode ser definido pela presença de duas populações de células geneticamente distintas em um único indivíduo que diferem pela seqüência do DNA, mas que são originadas de um único zigoto. Na AF é observada a presença de mosaïcismo conferindo ao alelo mutado funções normais (HIRSCHHORN, 2003). Em torno de 15 a 25% dos pacientes AF apresentam evidências de mosaïcismo que ocorre espontaneamente (GREGORY et al., 2001).

O mosaïcismo somático ocorre por reversão do alelo mutante para o tipo selvagem em uma única célula hematopoética. O mecanismo mais conhecido de reversão nas células AF acontece através da conversão gênica em pacientes heterozigotos compostos, em que um alelo restabelece a seqüência do outro. Outros mecanismos têm sido descritos como aqueles que resultam em alterações secundárias compensatórias na seqüência do DNA, como nos casos onde a mutação resulta em

alteração na leitura durante a transcrição. Deleções de uma única base, uma inserção ou outros eventos genéticos levam à correção da seqüência alterada de forma compensatória (WAISFISZ et al., 1999).

Nos testes de quebras cromossômicas, o mosaïcismo é observado pela presença de duas populações distintas de linfócitos: uma delas é sensível aos agentes que induzem as ligações cruzadas do DNA, enquanto a outra apresenta um comportamento normal e chega a corresponder a mais de 50% das células analisadas (GREGORY et al., 2001).

O mosaïcismo somático pode resultar em diagnósticos citogenéticos imprecisos pela ambigüidade dos mesmos ou por interpretações falso-negativos. No caso de pacientes com quadro clínico sugestivo e teste do DEB negativo, é necessário confirmar o diagnóstico utilizando um tecido alternativo, como por exemplo, fibroblastos da pele (SOULIER et al., 2005).

Em pacientes AF, as conseqüências clínicas do mosaïcismo somático ainda são pouco conhecidas, podendo ser uma das causas da variabilidade hematológica observadas nestes pacientes. Nas células revertidas, os eventos genéticos adquiridos ao longo do tempo produzem um gene AF funcional que confere resistência a agentes genotóxicos. Acredita-se que as células revertidas tenham uma vantagem de crescimento sobre as células mutadas e possa favorecer uma reposição progressiva das células defeituosas na medula óssea (SOULIER et al., 2005). Embora a presença de mosaïcismo sugira um fenótipo hematológico mais brando, os pacientes que o apresentam freqüentemente desenvolvem falha progressiva na medula óssea ou leucemia (GREGORY et al., 2001). Outros autores, sugerem ainda, que o mosaïcismo somático pode predispor a complicações após o transplante de célula tronco hematopoéticas (TMO), tal como a falência na medula óssea ou a rejeição do enxerto (ZANIS-NETO et al., 2005).

2.8 INTEGRIDADE DO GENOMA: FUNÇÃO DA FANCD2

A correção de erros endógenos e exógenos no DNA e a manutenção da integridade genômica ocorrem através de múltiplas vias celulares. Muitos dos genes

envolvidos no reparo do DNA e estabilidade genômica estão mutados em síndromes com predisposição ao câncer, como a Anemia de Fanconi, embora a função dos produtos destes genes permaneça desconhecida (MEDHURST et al., 2006).

Apesar das funções exatas das proteínas AF ainda não serem totalmente conhecidas, um modelo molecular denominado AF/BRCA tem sido proposto (WANG; 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 na fase S do ciclo celular em resposta aos vários tipos de danos causados ao DNA, incluindo as ligações cruzadas intercadeias, quebras de dupla fita e formação de forquilhas de replicação. Vários estudos revelaram que a isoforma FANCD2 participa do foco nuclear onde se encontra com múltiplas proteínas envolvidas na estabilidade genômica incluindo BRCA2/FANCD1, NBS1, RAD51, FANCN e RPA entre outras (GARCIA-HIGUERA et al., 2001; NAKANISHI et al., 2005; TANIGUCHI et al., 2002 citados por MEDHURST et al., 2006).

A FANCD2 monoubiquitinada é necessária para que se associe à cromatina e à proteína BRCA1 que atua na translocação da FANCD2 monoubiquitinada para o foco de reparo do DNA (WANG; D'ANDREA, 2004). Ela é também fosforilada em resposta a diferentes tipos de danos ao DNA, em especial as quebras de dupla fita induzidas por radiação ionizante. Sugere-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 a ATM (Ataxia Telangectasia Mutadas). A ATM é uma proteína-quinase 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 (D'ANDREA; GROMPE, 2003).

O mecanismo pela qual a ATM quinase fosforila a FANCD2 não está completamente elucidado, mas alguns modelos sugerem que a mesma atue na fosforilação das proteínas NSB1 e BRCA1. A NSB1 fosforilada une-se a MRE11 e RAD50 e assim ativadas induzem a fosforilação da FANCD2 na serina 222, formando um complexo de proteínas de ponto de checagem, atuando como um sensor de danos causados

ao DNA e inibindo a replicação do DNA danificado (RISINGER; GRODEN, 2004; WANG; D'ANDREA, 2004).

Recentes evidências indicam que mutações bialélicas do *BRCA1* ou *BRCA2* em células tumorais resultam em um defeito no reparo do DNA por recombinação homóloga. A via FA/BRCA regularia a recombinação homóloga durante a fase S ou seguiria os danos causados no DNA por agentes de ligações cruzadas, embora a função precisa da proteína FANCD2 monoubiquitinada permaneça desconhecida (D'ANDREA; GROMPE, 2003).

Há evidências de que a proteína FANCD2 esteja envolvida em duas diferentes funções: a) em resposta aos danos causados ao DNA por ligações cruzadas, sendo monoubiquitinada na lisina 561, levando a sua interação com o BRCA2 na cromatina e atuando no reparo do DNA; b) 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; D'ANDREA, 2004).

Alterações na proteína FANCD2 em decorrência de mutações no gene correspondente, assim como mutações em qualquer um dos genes codificadores das proteínas do complexo AF (*FANCA*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*, *L* e *M*), impedem a monoubiquitinação da proteína FANCD2 e conseqüentemente prejudicam o sistema de reparo de danos. Estes defeitos no reparo do DNA originam muitas das características fenotípicas observadas na AF (D'ANDREA; GROMPE, 2003).

2.8.1 Formação do Complexo

As 13 proteínas AF são divididas em três grupos: Grupo I consiste de 8 proteínas, *FACA*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*, *L* e *M*, que constituem o complexo principal, sendo que as mutações nos genes que as codificam caracterizam oito grupos de complementação distintos. Uma das principais funções deste complexo é a monoubiquitinação da FANCD2 e FANCI e, em conseqüência, as células que são deficientes em um destas proteínas são deficientes na monoubiquitinação. Uma nona subunidade do complexo denominada "proteína 100 associada à AF" (FAAP100) foi identificada bioquimicamente,

porém nenhum paciente com alterações nesta proteína foi observado. O Grupo II consiste das proteínas FANCD2 e FANCI, as quais interagem uma com a outra para formar o complexo ID. Estas proteínas são interdependentes: células FANCD2 deficientes são deficientes na monoubiquitinação da FANCI e vice-versa. O terceiro grupo consiste das proteínas FANCD1 (BRCA2), FANCN e FANCI. Células que são deficientes em qualquer uma destas proteínas têm níveis de ubiquitinação normal, indicando que a função das mesmas é à jusante do complexo ID ou em uma via paralela (WANG, 2007). A figura 2 apresenta a estrutura das proteínas AF e seus respectivos parceiros na formação do complexo.

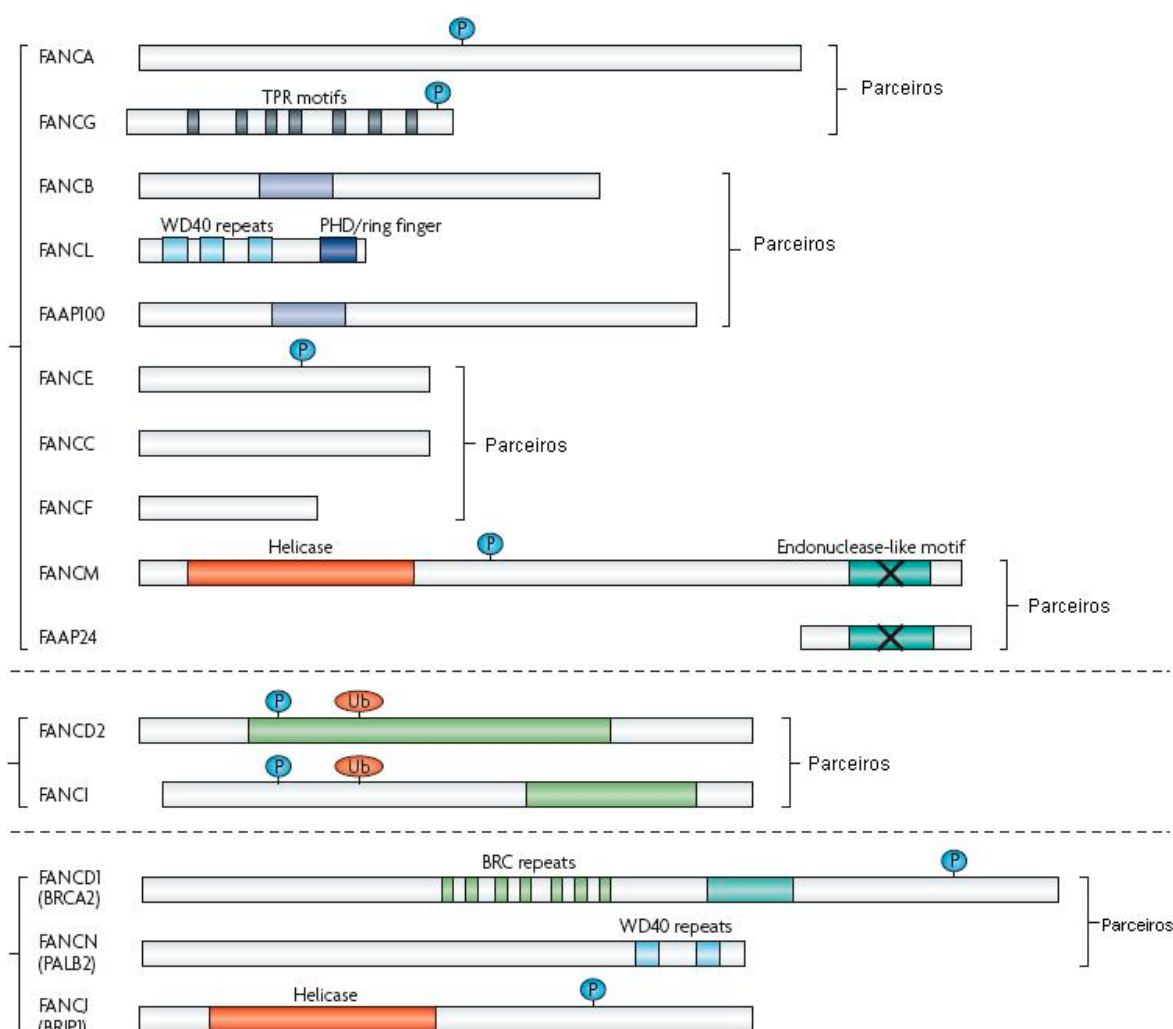


FIGURA 2 - PROTEÍNAS AF E SEUS PARCEIROS NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO

FONTE: Adaptado de Wang (2007)

NOTA: As chaves indicam que certas proteínas AF podem formar complexos ou subcomplexos com funções em parceria; inativação de uma destas proteínas afeta a estabilidade e a localização nuclear do seu parceiro. BCR: domínio de repetição interna do *BRCA2*; FAAP: proteína AF associada; P: fosforilação; Ub: ubiquitina; WD40: motivo de repetição.

Este complexo é também composto por múltiplas subunidades com função ubiquitina ligase, responsáveis pela monoubiquitinação da FANCD2. Ele é formado em resposta à presença de ligações cruzadas do DNA, e é ativado mediante a fosforilação pela ATR quinase em suas múltiplas subunidades (TANIGUCHI; D'ANDREA, 2006).

Medhurst et al. (2006) propõem 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, que são transportados ao núcleo e formam um complexo em torno da FANCM. A união dos primeiros subcomplexos se dá pela proteína FANCG que liga FANCA e FANCE. Com associação da FANCC com a FANCE no interior do núcleo. O complexo principal se completa com a união entre FANCA/FANCE e os subcomplexos já reunidos em torno da FANCM. A proteína FANCF é a última a se ligar, e é provável que a sua função seja de estabilizar a associação das proteínas que constituem o complexo principal da AF. Com o complexo formado, a E3 ubiquitina ligase associa-se ao seu substrato, a FANCD2.

2.8.2 Monoubiquitinação da FANCD2

Em resposta ao dano no DNA durante a fase S do ciclo celular, o complexo enzimático AF é ativado e a proteína substrato FANCD2 é monoubiquitinada. A maioria das proteínas da AF atua no processo de reparo do DNA à montante da monoubiquitinação da proteína FANCD2, a qual é o ponto central no processo de reparo do DNA por recombinação homóloga (WANG; D'ANDREA, 2004). A figura 3 apresenta as sinalizações à montante em resposta aos danos no DNA.

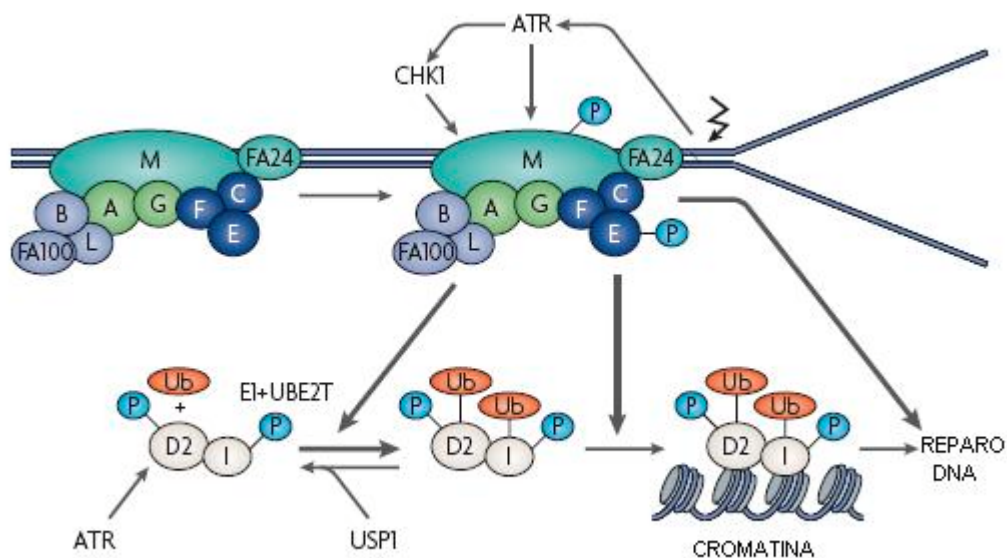


FIGURA 3 - SINALIZAÇÕES À MONTANTE DA MONOUBIQUITINAÇÃO

FONTE: Adaptado de Wang (2007)

NOTA: A forquilha da replicação é bloqueada ativando a proteína ATR e os pontos de checagem da quinase 1 (CHK1), ativando assim o complexo principal e o complexo ID pela fosforilação. O complexo se desloca e é solicitado nos sítios de dano ao DNA pela proteína FANCM e a FAAP24, enquanto o complexo ID é monoubiquitilado. As enzimas E1 e a UBE2T são co-funcionais com a enzima E3 para monoubiquitilar o complexo ID complexo AF. A enzima de-ubiquitina USP1 remove a ubiquitina do complexo após o reparo da lesão.

As proteínas FANCD1/BRCA2, FANCI e FANCD2 são as únicas conhecidas que atuam à jusante da proteína central FANCD2, pois pacientes destes grupos são capazes de monoubiquitilar a FANCD2. Elas são parte do mecanismo AF/BRCA e atuam em conjunto com a FANCD2 monoubiquitinada e outras proteínas reparadoras do DNA, em especial a RAD51, conectando o mecanismo AF/BRCA diretamente ao processo de recombinação homóloga (GODTHELP et al., 2006). A figura 4 apresenta as sinalizações à jusante em resposta aos danos no DNA.

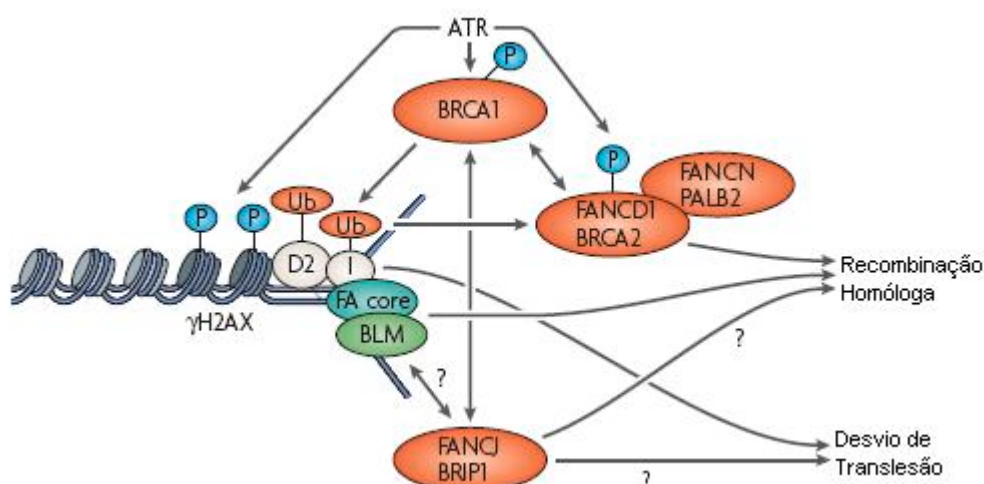


FIGURA 4 - SINALIZAÇÕES À JUSANTE DA MONOUBIQUITINAÇÃO

FONTE: Adaptado de Wang (2007)

NOTA: A ATR fosforila a histona H2AX, BRCA1 e BRCA2. O complexo de BRCA2 e seu parceiro PALB2 podem promover recombinação homóloga, enquanto a FANCD1 provavelmente promove o desvio de translesão. O complexo helicase BLM poderia ser co-funcional com o complexo AF para estabilizar e reiniciar o bloqueio da forquilha de replicação.

Uma vez formado o complexo principal, este induz à monoubiquitinação da proteína FANCD2, que passa da forma curta FANCD2-S, para a forma longa FANCD2-L. A monoubiquitinação 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 pode funcionar na modulação da atividade da BRCA2 no reparo do DNA (GODTHELP et al., 2006).

A proteína FANCN atua na localização e estabilização da BRCA2 no núcleo e defeitos na mesma impedem a formação do foco nuclear induzido pela RAD51.

2.9 ANÁLISE CITOGENÉTICA DA MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES AF

Admite-se que os pacientes com AF apresentem um risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias de vários sistemas incluindo a pele, gastrointestinal e ginecológico (D'ANDREA; GROMPE, 1997), mas principalmente leucemias mielóides agudas (LMA), presente em cerca de 15 a 20% dos pacientes que entram na segunda década de vida. Estes pacientes têm usualmente clones cariotipicamente anormais na

medula óssea, mas em geral, não exibem translocações cromossômicas envolvendo pontos de quebra associados a oncogenes específicos (AUERBACH, 1992). Butturini et al. (1994) estudando pacientes do IFAR, observaram que 59 (15,21%) desenvolveram MDS ou LMA, e avaliaram que o risco de desenvolvê-las é de 25% até os 40 anos de idade. Estudos em pacientes AF sem evidência de doenças malignas, com MDS ou anemia aplástica demonstraram a presença de alterações cromossômicas clonais (LISKER; COBO de GUTIERREZ, 1974; BERGER; BUSSEL; SCHENMETZLERLER, 1975; MEISSNER; TAHER; SHAHIDI, 1978; BERGER et al., 1980; CARBONE et al., 1984; HURET et al., 1986). Já os estudos citogenéticos em pacientes que haviam desenvolvido um quadro leucêmico são relativamente mais limitados (BOURGEOIS; HILL, 1977; BERGER; BUSSEL; SCHENMETZLERLER, 1977; BERGER et al., 1980; BERGER; Le CONIAT; SCHAISON, 1993; MEISSNER; TAHER; SHAHIDI, 1978; AUERBACH et al., 1982; STIVRINS et al., 1984; BESSHO et al., 1989; FERTI et al., 1996; SUGITA et al., 2000).

Auerbach e Allen (1991) consideraram todos os pacientes AF como sendo pré-leucêmicos e que a AF representa um modelo para o estudo da etiologia da LMA. Mutações somáticas resultantes da instabilidade genética e fatores ambientais podem atuar como agentes desencadeantes. Agentes carcinógenos considerados como leucemogênicos são o clorafenicol, a fenilbutazona e o benzeno (BLOOMFIELD; BRUNNING, 1976), sendo que o melhor documentado, o benzeno, está associado com quebras cromossômicas e desenvolvimento de anemia aplástica. Todos os casos de leucemia resultantes da exposição a estes carcinógenos são do tipo aguda que podem ser desenvolvidas em pacientes hipersensíveis, como os portadores de AF, mesmo com pequenas quantidades destes agentes no meio ambiente.

Várias evidências demonstram que a presença de clones anormais na medula óssea aumenta o risco de desenvolvimento de leucemia. A presença de clones com rearranjos cariotípicos complexos ou com monossomia ou deleção no braço longo dos cromossomos 5 e 7 (-5/-7 ou del5q/7q) em pacientes pré-leucêmicos, tem sido associada a um prognóstico desfavorável e progressão para leucemia (NOWELL; BESA, 1989). Uma revisão das correlações clínicas e citogenéticas em pré-leucemias, realizada no

Sexto "Workshop" Internacional em Cromossomos e Leucemias em 1987, demonstrou que a presença de alterações cromossômicas clonais nos pacientes AF é uma forte indicação da natureza neoplásica da doença, indicando também que um curto tempo de sobrevida está associado com um maior grau de complexidade cariotípica.

Os primeiros estudos em células da medula óssea, de pacientes com AF, datam da década de 60, sem que se tenha observado alterações cromossômicas. Schroeder, Anschutz e Knopp (1964) analisaram 35 metáfases de dois pacientes e não encontraram alterações cromossômicas. Bloom et al. (1966) observaram um cariótipo normal em 32 metáfases de um paciente. Dosik et al. (1970) descreveram uma família com dois pacientes afetados, um dos quais desenvolveu leucemia mielomonocítica aguda. As células da medula óssea tanto do paciente como da mãe do mesmo apresentaram cariótipo normal.

Alterações envolvendo o cromossomo 1 têm sido descritas com uma frequência elevada na medula óssea de pacientes com Anemia de Fanconi. As mais descritas são duplicações, triplicações e deleções. Carbone et al. (1984) descreveram uma paciente com anemia, de 31 anos de idade, sem evidências de anormalidades congênitas. Em duas análises citogenéticas da medula óssea, observaram clones anormais. Na primeira, detectaram dois clones, com cariótipos $48,XX,+9,+19$ e $46,XX,dup(1)(q24q32),t(17;?)(p12-13;?)$. Em análise subsequente, o clone foi $46,XX,t(17;?)(p12-13;?)$.

Thompson, Standen e Geddes (1991) encontraram na medula óssea de um paciente com 15 anos de idade portador de AF com evolução para MDS, trissomia do cromossomo 8 ($47,XY,+8$). Numa segunda análise, 18 meses após a primeira, observou-se em 40 células estudadas trissomia do 8 e um clone adicional em outras três células contendo um cromossomo Y derivativo, resultante de uma $t(Y;1)$ com cariótipo $46,X,-Y,+der(Y)t(Y;1)(q12;q21)$. Em uma análise subsequente, quatro meses depois, não foi encontrada a $t(Y;1)$ e a trissomia do cromossomo 8 foi observada em 100 células analisadas.

Maarek et al. (1996) detectaram anormalidades clonais nas células da medula óssea de 20 pacientes AF, dos quais 12 não apresentavam anormalidades morfológicas nas células hematopoéticas. Destes, 3 pacientes apresentaram rearranjos estruturais envolvendo o cromossomo 1 e cinco pacientes apresentaram alterações clonais envolvendo os cromossomos 13, 17, 18, 21 e 22. Neste mesmo estudo, os autores observaram que oito pacientes apresentaram SMD, detectando-se alterações clonais envolvendo os cromossomos Y, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 17, 18, 20 e 21, sendo mais freqüentes as dos cromossomos 7 (monossomia, isocromossomo e deleção) e 6 (material adicional e deleção). Um dos pacientes com o cariótipo 46,XY,dup(1)(q21q31),add(5)(q35),del(6)(p22)[cp22] desenvolveu LMA.

Alterações estruturais e numéricas envolvendo o cromossomo 7 têm sido descritas na literatura também com uma freqüência elevada. Huret et al. (1986) analisaram citogeneticamente as células da medula óssea de uma paciente com 10 anos de idade com AF, em quatro diferentes períodos. No primeiro, em dezembro de 1984, não foram observadas alterações clonais em 26 células; no segundo, em fevereiro de 1985, identificou-se um isocromossomo 7q [46,XX,i(7)(q10)] em 20 das 49 células analisadas. Seis meses depois, em agosto de 1985, o cariótipo mostrou-se normal em 33 células e, finalmente, no último período, em março de 1986, novamente identificou-se o isocromossomo 7q em 10 das 34 células analisadas.

Thurston et al. (1999) descreveram uma paciente AF com dez anos de idade, que ao diagnóstico de AF, em dezembro de 1991, apresentou cariótipo normal em células da medula óssea. Após dois anos e meio, em maio de 1994, a análise citogenética demonstrou em uma das 20 células uma monossomia do cromossomo 7, esta mesma amostra quando analisada por FISH, apresentou a mesma alteração em oito (4%) de 199 células. O mesmo cariótipo foi observado em janeiro de 1995, porém a análise por FISH detectou a monossomia de 7 em 43 (21,5%) de 200 células analisadas. Onze meses após observou-se esta alteração em duas de 30 células e a análise por FISH detectou a monossomia 7 em 83 (40%) de 207 células analisadas. Em abril de 1996, a análise citogenética demonstrou cariótipo 47,XX,-

7,+21,+22[7]/46,XX[12]. A paciente foi submetida ao transplante de medula óssea sendo previamente analisadas 20 células que apresentaram o cariótipo 45,XX,-7,add(18)(p11.2). Vinte e seis dias após o transplante a paciente foi a óbito devido a uma infecção necrotizante fúngica em seus pulmões. Este caso conduziu os autores a verificar se a análise por FISH poderia ser usada para detectar previamente clones anormais antes que pudessem ser detectados pela citogenética convencional, motivando-os a utilizar a análise por FISH para a monossomia do 7, como uma rotina em seus pacientes.

Maarek et al. (1996) estudaram citogeneticamente 12 pacientes, destes, quatro apresentaram alterações envolvendo o cromossomo 7, dois com monossomia, um com isocromossomo 7q e um que evoluiu para LMA, com translocação t(7;18)(q31;p11).

Alter et al. (2000) descreveram os resultados de 41 pacientes com AF, analisados durante o período de 1980 a 1998, dos quais 16 (39,02%) tinham anormalidades clonais. Destes, 12 (75%) foram analisados citogeneticamente quando não apresentavam anormalidades morfológicas nas células hematopoéticas sendo que cinco, apresentaram alterações estruturais envolvendo os cromossomos 3, 13, 14, 16 e 21; dois, com monossomia do 7 e com t(5;22)(q?;q?), evoluíram para LMA e cinco com alterações numéricas e/ou estruturais dos cromossomos X, 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11 e 21. Estes últimos pacientes foram reanalisados citogeneticamente quando evoluíram para SMD sendo que quatro apresentaram o mesmo cariótipo identificado na fase anterior (AF) e em um houve a perda da del(7)(p15). Quatro (25%) dos 16 pacientes foram estudados somente na fase com SMD observando-se alterações numéricas e/ou estruturais dos cromossomos 1, 2, 6, 7, 11, 12, 13 e 17, sendo mais freqüentes a dos cromossomos 1 e 7. Um destes pacientes com cariótipo 46,XY, der(18)t(1;18)(q12;p11)[19]/46, idem, del(12)(p12.1)[2] desenvolveu LMA, quando o clone com a deleção do 12 não foi observado.

Os cromossomos 3, 8, 21, X têm sido descritos alterados em células da medula óssea de pacientes AF com uma freqüência menor que o 1 e o 7. Berger, Bussel e Schenmetzlerler (1975), usando técnicas de bandeamento, encontraram

um clone anormal com 47 cromossomos (47,XX,+21) nas células da medula óssea de um dos quatro pacientes com AF estudados.

Standen et al. (1989) descreveram um paciente com AF, que após tratamento com hormônio de crescimento por um período de oito anos, apresentou síndrome mielodisplásica e clones anormais na medula óssea, com cariótipo 47,XY,+8.

Berger, Le Coniat e Schaison (1993) estudaram as células da medula óssea de duas pacientes com AF. Na paciente de oito anos de idade foram analisadas 20 células das quais 12 apresentaram cariótipo 46,XX,-5,+8 e oito 46,XX. Na outra paciente foi encontrado o cariótipo 46,XX,+5,-21 em 25 células analisadas. Treze anos depois, em novembro de 1991, o mesmo cariótipo anormal foi observado, em 14 células analisadas.

Outros cromossomos têm sido descritos alterados em células da medula óssea de pacientes AF com uma frequência menor. Lisker e Cobo de Gutierrez (1974) descreveram um caso de AF em que 60% das metáfases apresentaram anormalidades no braço longo de um dos cromossomos do grupo D (Dq+), 46,XX,Dq+.

Sugita et al. (2000) analisaram células da medula óssea de um paciente com AF e LLA cujo cariótipo foi 46,XY. O paciente desenvolveu LMA-t (relacionada ao tratamento com agentes alquilantes e inibidor de topoisomerase II). O cariótipo na fase de LMA-t apresentou 46,XY,t(11;16)(q23;p13) em 20 células analisadas.

Tönnies et al. (2003) analisaram 213 amostras de medula óssea de 53 pacientes. Destes, 28 demonstraram cariótipo normal enquanto 25 apresentaram alterações clonais. Trissomias parciais e tetrassomias do braço longo do cromossomo 3 foram as alterações mais frequentes, observadas em 18 dos 25 cariótipos anormais (72%). Quatro genes envolvidos em SMD e/ou LMA são localizados em 3q, e ganhos em nesta região foram associados com um pior prognóstico e representam um fator de risco adverso para pacientes AF.

Tootian et al. (2006) publicaram um estudo onde foram analisados 318 pacientes com suspeita de AF no Irã. Um total de 61 pacientes foram positivos para

AF pelo teste com MMC (mitomicina C). Três pacientes apresentaram alterações cromossômicas clonais: caso 1 - material adicional no braço curto do cromossomo X, cariótipo 46,X,add(X)(p?); caso 2 – trissomia do cromossomo X, cariótipo 47,XXY[9]/46,XY[41] (não constitucional); caso 3 – inversão no cromossomo 12, cariótipo 46,XX,inv(12)(p13.3q13.1). O defeito na proteína que leva ao grupo de complementação B é um componente necessário no evento para a resposta ao danos no DNA. O gene que codifica a proteína FANCB esta localizado em Xp22.31.

3 OBJETIVOS

- Avaliar a presença de alterações cromossômicas clonais e suas frequências, em células da medula óssea de pacientes previamente diagnosticados citogeneticamente como portadores para AF.
- Analisar a casualidade da ocorrência das alterações observadas nos diferentes cromossomos do genoma.
- Correlacionar a presença ou ausência de alterações cromossômicas com a evolução clínica do paciente
- Avaliar a dependência das variações do índice de quebras cromossômicas, em função dos graus da situação hematológica dos pacientes e do tempo entre as análises consecutivas num mesmo paciente.
- Verificar se as alterações detectadas estão de acordo com as descritas na literatura.
- Associar os pontos de quebra observados com a presença de oncogenes, genes supressores ou com outros genes relacionados ao processo leucemogênico, de acordo com informações apresentadas na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por 130 pacientes, 63 (48%) do sexo feminino e 67 (52%) do sexo masculino, com idades entre 1 e 31 anos ($\bar{x} = 10 \pm 5,74$), euro-brasileiros (75 = 57,7%), mulatos (32 = 24,62%), negros (21 = 16,15%), oriental (1 = 0,77%) e índio (1 = 0,77%). Trinta e três pacientes (25,4%) eram do grupo de complementação A, 7 (5,4%) do G, 2 (1,5%) do C, 1 (0,77%) do E, e 87 (67%) não tem informação sobre o grupo a qual pertencem. Os pacientes tiveram o diagnóstico de Anemia de Fanconi confirmado pelo teste do DEB, de acordo com os critérios aceitos internacionalmente. Todos os pacientes foram atendidos no Ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná, no período de agosto de 1995 a janeiro de 2008. Este ambulatório realiza mais de 300 atendimentos por ano e tem atualmente mais de 80 pacientes 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 internacional desde 2001.

Para a seleção dos pacientes estudados neste trabalho, primeiro foi realizado o teste de quebras cromossômicas em 500 indivíduos com suspeita de Anemia de Fanconi. Dos 180 (36%) pacientes DEB positivos, em 130 (26%) foram realizadas as análises citogenéticas de células da medula óssea. Em quarenta pacientes não foi possível a coleta da medula óssea e em 10 não se obteve metáfases.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da UFPR. Houve a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tendo em vista que todos os dados utilizados nesta pesquisa foram provenientes de um banco de dados do Laboratório de Citogenética.

4.2 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

4.2.1 Teste de Estresse para Diagnosticar Anemia de Fanconi com DEB

Os pacientes foram previamente testados quanto à presença aumentada de quebras, fragmentos, falhas e figuras radiais induzidas pelo DEB, de acordo com os seguintes procedimentos:

4.2.1.1 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada no Serviço de Análises Clínicas (SAC) na seção de coleta de material do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). De cada paciente coletou-se 5 ml de sangue periférico, através de punção venosa com seringas descartáveis, previamente heparinizadas. Após a coleta, a seringa era encaminhada ao Laboratório de Citogenética do HC.

4.2.1.2 Cultura celular

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras de sangue periférico, foi utilizado o método descrito por Moorhead et al. (1960), com modificações, conforme descrito a seguir.

No processamento do material, de 20 a 30 gotas de sangue periférico foram colocadas em meio de cultura com 5 ml (Kit-Cultilab-completo), suplementado com 30% de soro bovino fetal e com 0,2 ml de fitohemaglutinina. O material do paciente foi cultivado em dois frascos e outros dois frascos foram utilizados como controle contendo amostras do sangue periférico de indivíduo normal. O material foi incubado por 24 horas a 37°C. Em seguida, em dois tubos, um pertencente ao paciente e outro ao controle, foram adicionados 12 µl de DEB (para uma concentração final 0,1 µg/ml), recém diluído e novamente colocado na estufa, a 37°C por mais 48h. Após este período, o protocolo de preparação citológica seguiu três etapas principais:

interrupção mitótica, quando foi adicionado 0,1 ml de colchicina (Sigma – 16 ug/ml) na cultura, que foi mantida a 37°C por 60 minutos; tratamento hipotônico com solução de cloreto de potássio – KCl (0,75M) a 37°C por 15 minutos e a fixação do material com 3 volumes de metanol para 1 de ácido acético glacial recém preparado. Três gotas da suspensão foram distribuídas em lâminas e após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com Giemsa para posterior análise.

Todo o trabalho foi feito usando luvas de látex e máscaras em fluxo laminar vertical. O material utilizado na manipulação, pipetas de vidro, frascos de cultura, tubos de centrífuga e sobrenadante, antes de serem descartados, foram colocados em um recipiente contendo HCl 50% 6M (1 volume de ácido clorídrico para 1 volume de água), com o cuidado de ficarem totalmente imersos. Após uma hora o HCl foi descartado em um recipiente com quantidade abundante de água. Todo o material foi entregue à segurança sanitária do HC para ser devidamente descartado.

4.2.1.3 Análise

Após o material ser corado, no mínimo, 25 metáfases de cada frasco foram analisadas (25 da cultura exposta ao DEB e 25 da cultura sem DEB), anotando a frequência de quebras, falhas, figuras, e fragmentos encontrados em cada célula.

O mesmo procedimento foi realizado para os indivíduos controles. Como critério para a classificação de percentagem de quebras e figuras radiais, foram utilizados os recomendados pelo Registro Internacional de Anemia da Fanconi (IFAR) e padronizado por Auerbach, Rogatko e Schroeder-Kurth (1989). O seguinte índice de quebras cromossômicas (IQ) foi calculado para cada paciente:

$$I = \frac{\text{Número total de quebras}}{\text{Número total de células analisadas}}$$

O número total de quebras foi calculado contando uma a uma as quebras, fragmentos, falhas e figuras encontradas em cada célula analisada. Pacientes que

apresentarem um índice médio variando entre 1,06 a 23,9 quebras por célula foram considerados DEB+, confirmando a suspeita de Anemia de Fanconi. No mínimo duas metáfases de cada paciente foram selecionadas e fotografadas em microscópio comum ou em sistema analisador de imagem (Zeiss).

4.2.2 Análise Citogenética de Células da Medula Óssea de Pacientes AF

4.2.2.1 Obtenção das amostras

A coleta do material foi realizada no Ambulatório de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Cerca de 5 ml de medula óssea foram aspirados a partir da crista ilíaca ou da região esternal. O material foi enviado ao Laboratório de Citogenética Humana do Hospital de Clínicas, onde cerca de 2ml foram utilizados para a cultura de curta duração dos cromossomos.

4.2.2.2 Cultura celular

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras de medula óssea, foi utilizado o método descrito por Raimondi et al. (1999), com modificações, conforme descrito a seguir.

Cerca de 2 ml do material foram colocados em dois frascos de cultura com 5ml de meio de cultura (RPMI 1640 – Gibco) suplementado com 30% de soro bovino fetal e incubado por 24 horas a 37°C. Após este período, o protocolo de preparação citológica seguia três etapas principais: interrupção mitótica, quando é adicionado 0,1ml de colchicina (Sigma – 16 µg/ml) na cultura, que é mantida a 37°C por 40 minutos; tratamento hipotônico com solução de cloreto de potássio – KCl (0,75M) a 37°C por 20 minutos e a fixação do material com 3 volumes de metanol para 1 de ácido acético glacial recém preparado. Duas gotas da suspensão foram distribuídas em

lâminas e após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram armazenadas em estufa a 37°C, para obtenção das bandas G.

4.2.2.3 Bandeamento cromossômico GTG

Foi utilizada a técnica de Scheres (1972), com modificações. O material foi hidratado em soluções decrescentes de álcoois (95%, 85%, 70%) e passagem em tampão fosfato pH 6,8 por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de tripsina 0,02% e coradas em solução de Giemsa diluída em tampão fosfato 0,06M (14,2 g/l de NaHPO₄ + 8,16 g/l de KH₂PO₄), pH 6,8, na proporção de 1:30, durante 5 minutos.

4.2.2.4 Análise

Após o bandeamento GTG, sempre que possível, um mínimo de 20 metáfases bandeadas foram analisadas em desenhos, fotografias e sistema de imagem (Metasystem-Zeiss) para a identificação da presença ou ausência de alterações cromossômicas. Foram utilizados como critérios para a classificação, os recomendados pelo ISCN, 2005 (SHAFFER; TOMMERUP 2005). Neste, define-se como clone, a presença de duas células com a mesma alteração estrutural ou cromossomo adicional e três células com ausência do mesmo cromossomo. Foram considerados normais os cariótipos cuja análise de pelo menos 20 metáfases bandeadas não apresentou alterações cromossômicas clonais e foram considerados como contendo alterações, os cariótipos cuja análise demonstrou a presença de pelo menos um clone anormal. No mínimo duas metáfases de cada paciente foram selecionadas e fotografadas em microscópio comum, equipado com câmara fotográfica automática, ou pelo Sistema de imagem Metasystem da Zeiss. A análise dos dados foi realizada tanto considerando o número total de alterações detectadas como cada alteração individualmente.

4.2.2.5 Situação hematológica

A situação hematológica dos pacientes foi avaliada de acordo com (BUTTURINI et al., 1994; GUARDIOLA et al., 2000), que estabeleceram três graus de gravidade:

- **Grau I** → Sem falha medular. Critérios: plaquetas acima de 100.000/ μ L; neutrófilos acima de 100/ μ L; hemoglobina acima de 10 g/dL.
- **Grau II** → Falha medular inicial. Pelo menos um dos critérios: plaquetas entre 100.000/ μ L e 20.000/ μ L; neutrófilos entre 1.000/ μ L e 500/ μ L; hemoglobina menor que 10g/dl; sem necessidade de transfusões ou até 20 transfusões.
- **Grau III** → Falha medular avançada. Pelo menos um dos critérios: plaquetas abaixo de 20.000/ μ L; neutrófilos abaixo de 500/ μ L ou necessidade de mais de 20 transfusões de hemácias e/ou plaquetas.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste do qui ao quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a casualidade de ocorrência das alterações cromossômicas e para avaliar a homogeneidade da distribuição das variáveis. O teste *t* (de Student) foi utilizado para as comparações entre as médias. A razão entre os quadrados médios foi avaliada pelo teste F (FISHER) e a homogeneidade das variâncias através do teste de Bartlett. O grau de dependência de uma variável em função de outra, foi determinado pelo coeficiente de regressão (b). As fórmulas utilizadas nos testes acima podem ser encontradas em Beiguelman (1988). As curvas de sobrevida foram estimadas e comparadas pelo método de Kaplan-Meier e pelo log rank test, respectivamente (BEWICK; CHEEK; BALL, 2004).

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE ESTRESSE PARA DIAGNOSTICAR ANEMIA DE FANCONI COM DEB

De um total de 500 amostras de sangue periférico de pacientes com suspeita clínica de Anemia de Fanconi, atendidos no Ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná, foram selecionados 130 pacientes positivos para AF, através do teste de estresse com DEB, e que tiveram estudo citogenético realizado, para a amostra deste estudo.

O quadro 2 apresenta o sexo, grupo étnico, idade, grupo de complementação, informações clínicas e citogenéticas dos 130 pacientes estudados.

QUADRO 2 - DADOS GERAIS DOS PACIENTES

continua

PACIENTE	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE	SOBREVIDA	DATA DIAGNÓSTICO	ÍNDICE DE QUEBRAS	SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA	EVOLUÇÃO CLÍNICA	GRUPO DE COMPLE-MENTAÇÃO	ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS
1	M	B	8	14m	24/10/2007	6,08	II		SI	V.A
2	M	N	13	60m	18/12/2003	1,83	II	TMO	SI	V.S
3	F	N	7	8m†	26/11/2001	2,4	III		SI	O.S
4	F	B	25	92m	23/4/2001	1,44	II		FA-A ³	V.A
5	F	B	8	39m	20/9/2005	3,5	III	TMO	SI	V.A
6	F	B	10	82m	22/2/2002	1,4	II	TMO	FA-A ³	V.S
7	F	B	3	36m†	6/12/2005	2,4	II	TMO	SI	O.S
8	F	B	11	82m†	14/2/2006	2,65	III	TMO	SI	O.A
9	F	B	7	33m	15/2/2006	4,88	I		SI	V.A
10	M	N	8	59m†	25/1/2005	1,5	II		SI	O.A
11	F	B	3	96m	6/11/2000	1,5	I		FA-A ³	V.S
12	M	B	1	32m	25/4/2006	4,08	II	TMO	FA-G ¹	V.S
13	F	B	24	25m†	12/6/2006	5,4	III	TMO-MDS	SI	O.A
14	F	B	6	80m	17/4/2001	2,76	II	TMO	FA-G ¹	V.A
15	F	B	4	39m†	17/4/2001	2,32	II	TMO	FA-G ¹	O.S
16	F	B	11	29m†	14/8/2007	2,82	II	TMO	SI	O.S
17	F	N	12	54m	15/6/2004	2,4	II	TMO	SI	V.S
18	F	B	6	26m	17/10/2006	8	II	TMO	SI	V.S
19	F	B	6	140m	7/4/1997	3,5	III	TMO	FA-A ¹	V.S
20	M	B	15	16m†	17/8/2004	5,92	II	TMO	SI	O.S
21	M	B	18	49m	23/11/2004	2,4	I		SI	V.S
22	M	B	8	24m	5/12/2006	1,28	II	TMO	SI	V.A
23	F	M	8	23m	31/1/2006	2,42	III	TMO	SI	V.S
24	F	B	15	47m†	21/1/2003	2,63	II	TMO	FA-A ¹	O.A
25	F	B	11	71m	21/1/2003	2,92	I	TMO	SI	V.S
26	F	B	13	27m†	19/8/1997	3,7	III		SI	O.S
27	F	B	13	28m	8/8/2006	3,24	III		SI	V.A
28	F	B	8	36m	8/11/2005	3,24	I		FA-A ³	V.S
29	M	B	5	58m	3/2/2004	5,56	I		FA-A ³	V.S

QUADRO 2 - DADOS GERAIS DOS PACIENTES

continua

PACIENTE	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE	SOBREVIDA	DATA DIAGNÓSTICO	ÍNDICE DE QUEBRAS	SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA	EVOLUÇÃO CLÍNICA	GRUPO DE COMPLE- MENTAÇÃO	ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS
30	F	B	12	111m	20/9/1999	5,27	II		SI	V.S
31	F	B	20	83m	21/1/2002	3,91	II		SI	V.S
32	F	B	7	22m†	2/1/2001	3,2	II	TMO	FA-A ³	O.S
33	F	M	9	69m	25/3/2003	9,28	II	TMO	SI	V.S
34	F	B	10	56m	20/4/2004	1,72	I		SI	V.S
35	F	B	9	14m†	8/7/2003	2,46	III	TMO	SI	O.S
36	M	B	8	92m	9/4/2001	2,2	II	TMO	SI	V.A
37	M	N	13	25m	21/11/2006	2,8	II		SI	V.A
38	M	M	11	35m	24/1/2006	5,28	III	APLASIA	SI	V.A
39	M	N	9	39m	27/9/2005	3,72	II	APLASIA	SI	V.A
40	F	B	6	8m†	24/8/2005	1,25	III		SI	O.A
41	F	M	12	33m†	15/3/2005	8,46	I	TMO-MDS	FA-C ¹	O.A
42	F	N	22	50m	5/10/2004	5,56	I	TMO	SI	V.A
43	F	B	31	16m†	8/1/2002	7,92	II	TMO-MDS	FA-A ¹	O.A
44	F	B	1	119m	3/11/1997	3,68	II	TMO	FA-A ¹	V.A
45	M	M	14	52m†	22/4/2003	1,24	III	LMA	FA-A ³	O.A
46	F	M	11	69m	11/3/2003	1,39	III	TMO	FA-A	V.A
47	F	M	16	17m†	13/8/2002	15,33	III	TMO-LMA	FA-A	O.A
48	M	M	12	45m	8/3/2005	1,92	III		SI	V.S
49	M	M	5	45m	8/3/2005	2,92	II		SI	V.A
50	M	B	13	22m†	20/7/2004	5,44	III	TMO	SI	O.S
51	M	B	12	25m†	2/9/2003	1,57	III		SI	O.A
52	M	B	8	38m	25/10/2005	2,66	III		SI	V.S
53	M	M	10	47m	4/1/2005	4,12	II		SI	V.A
54	M	M	6	45m	15/3/2005	2,24	I	PANCITOPENIA	SI	V.A
55	M	M	6	24m†	6/5/2003	2,4	III	TMO	SI	O.S
56	M	B	14	12m†	23/10/2001	1,98	II	TMO-APLASIA	FA-A ¹	O.A
57	M	N	9	21m	20/3/2007	2,72	I		SI	V.S
58	M	B	8	56m	20/4/2004	5,05	III	TMO	SI	V.S

QUADRO 2 - DADOS GERAIS DOS PACIENTES

continua

PACIENTE	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE	SOBREVIDA	DATA DIAGNÓSTICO	ÍNDICE DE QUEBRAS	SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA	EVOLUÇÃO CLÍNICA	GRUPO DE COMPLE- MENTAÇÃO	ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS
59	M	N	15	11m	15/1/2008	1,44	II		SI	V.S
60	F	B	2	24m†	19/5/2004	1,84	III	TMO	SI	O.S
61	M	N	8	13m	21/11/2007	2,68	II	TMO	SI	V.S
62	M	B	6	69m	8/4/2003	2,56	III	TMO-APLASIA	FA-A ³	V.A
63	F	N	7	6m†	21/11/2006	5,84	III	APLASIA	SI	O.A
64	F	B	1	35m	24/1/2006	3,16	I		SI	V.S
65	F	M	7	27m†	11/7/2004	1,56	II	APLASIA	SI	O.A
66	M	M	11	63m	30/9/2003	3,04	II	TMO	SI	V.S
67	F	B	6	33m	28/3/2006	2,28	II		SI	V.A
68	F	M	12	11m	15/1/2008	2,56	II		SI	V.A
69	M	B	5	46m	1/2/2005	1,76	III	TMO	FA-A ¹	V.S
70	F	M	11	74m	15/10/2002	1,84	III	TMO	SI	V.S
71	M	N	8	25m	26/11/2006	2,8	II		SI	V.S
72	F	M	8	63m	9/9/2003	2,52	II	TMO	SI	V.A
73	F	B	29	28m†	11/6/2002	1,8	II	TMO-MDS	FA-A ¹	O.A
74	F	M	11	21m†	27/7/2004	5,48	III	TMO	FA-A ¹	O.S
75	F	B	10	124m	17/8/1998	1,48	II		SI	V.A
76	F	M	3	19m†	15/7/2003	2,1	III	TMO	SI	O.S
77	F	B	10	29m	9/5/2006	18,75	II		FA-A ³	V.S
78	M	I	9	15m	25/9/2007	6,66	II		SI	V.S
79	F	B	7	74m	15/10/2002	1,47	II	TMO	SI	V.S
80	M	M	30	33m	21/3/2006	1,16	II		SI	V.S
81	M	B	7	151m	7/5/1996	3,9	II	TMO	FA-A ¹	V.A
82	M	B	17	118m	1/2/1999	3,33	II		FA-A ¹	V.A
83	M	M	5	43m	3/5/2005	3,92	II	APLASIA	SI	V.A
84	M	N	6	13m†	4/4/2006	3,28	III	TMO	SI	O.S
85	F	B	6	25m†	21/3/2006	3,64	II	TMO	SI	O.S
86	F	M	2	11m†	1/3/2005	3,56	II	TMO	FA-E ¹	O.S
87	M	M	12	49m	23/11/2004	2,96	II	APLASIA	SI	V.A

QUADRO 2 - DADOS GERAIS DOS PACIENTES

continua

PACIENTE	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE	SOBREVIDA	DATA DIAGNÓSTICO	ÍNDICE DE QUEBRAS	SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA	EVOLUÇÃO CLÍNICA	GRUPO DE COMPLEMENTAÇÃO	ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS
88	M	N	11	18m†	6/11/2001	1,72	III	TMO	SI	O.S
89	M	B	2	44m	12/4/2005	4,24	I		SI	V.S
90	M	M	7	71m	14/1/2003	5,04	II	TMO	FA-A ¹	V.S
91	M	M	12	46m†	20/8/2002	1,2	III	TMO	FA-A ²	O.S
92	F	N	13	23m	9/1/2007	1,8	II		SI	V.S
93	F	B	9	65m	15/7/2003	1,08	II	TMO	FA-A ¹	V.S
94	M	B	5	32m	27/6/2006	1,96	II	PANCITOPENIA	FA-A ³	V.A
95	M	N	2	17m	17/7/2007	17,16	II	TMO	SI	V.S
96	M	B	6	46m	23/2/2005	2,64	II	APLASIA	FA-A ³	V.A
97	M	B	9	24m†	28/8/1995	1,32	II	TMO	SI	O.S
98	M	M	4	50m	27/10/2004	2,2	I		FA-G ¹	V.S
99	F	B	12	7m†	12/9/2001	3,72	II	TMO-APLASIA	FA-C	O.A
100	M	B	5	33m	9/5/2006	15,47	III	TMO	SI	V.S
101	F	N	13	45m†	24/7/2001	1,97	III		SI	O.A
102	F	B	15	5m†	17/10/2006	1,2	III	TMO	SI	O.S
103	M	N	6	24m	19/12/2006	1,36	II		SI	V.S
104	M	B	5	47m	11/1/2005	3,32	II	TMO-MDS	FA-A ¹	V.A
105	F	B	11	57m	2/3/2004	3,24	II	TMO	FA-A ¹	V.S
106	F	B	9	74m	15/10/2002	1,7	II	TMO	FA-A ¹	V.S
107	F	M	5	117m	29/3/1999	3,86	II	TMO	FA-G ¹	V.S
108	F	B	1	103m	29/5/2000	3,28	II		FA-A ³	V.S
109	F	M	25	26m†	27/5/2003	1,72	I	PANCITOPENIA	FA-A ³	O.A
110	M	M	8	117m	8/3/1999	4,7	II	TMO-APLASIA	SI	V.A
111	M	B	13	59m	13/1/2004	2,64	II	APLASIA	SI	V.A
112	F	B	5	101m	16/7/2002	10,48	II		SI	V.S
113	F	M	9	39m†	15/1/2002	4,2	III	APLASIA	FA-C ²	O.A
114	F	B	16	53m	28/9/2004	1,6	II		SI	V.S
115	F	B	6	101m†	7/7/1998	1,95	II	TMO	SI	O.S
116	M	M	5	28m	8/8/2006	2,48	III	TMO-APLASIA	FA-G ¹	V.A

QUADRO 2 - DADOS GERAIS DOS PACIENTES

PACIENTE	SEXO	GRUPO ÉTNICO	IDADE	SOBREVIDA	DATA DIAGNÓSTICO	ÍNDICE DE QUEBRAS	SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA	EVOLUÇÃO CLÍNICA	conclusão	
									GRUPO DE COMPLE- MENTAÇÃO	ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS
117	M	B	6	32m	10/4/2006	3,72	III		SI	V.S
118	M	M	15	24m†	20/7/2004	3,36	III	APLASIA	SI	O.A
119	M	B	14	73m	19/11/2002	1,39	II	TMO	SI	V.S
120	M	B	23	8m†	4/4/2006	3,64	III	APLASIA	SI	O.A
121	M	N	10	53m	6/7/2004	2,88	II	TMO	SI	V.S
122	M	B	14	52m†	13/4/1999	3,3	III		SI	O.S
123	F	N	10	56m	27/4/2004	1,94	III	TMO	SI	V.S
124	M	B	10	15m†	16/5/2006	15,88	III	TMO	SI	O.A
125	M	B	6	56m	13/4/2004	5,36	II	TMO-APLASIA	SI	V.A
126	M	B	2	84m	15/1/2002	1,48	II	APLASIA	FA-A ¹	V.S
127	M	B	6	111m	20/9/1999	5,8	II		SI	V.S
128	M	O	8	62m	7/10/2003	3,33	II	TMO	SI	V.S
129	F	N	15	11m	16/1/2008	1,32	II		SI	V.S
130	F	B	8	1m†	19/6/2001	1,89	I	TMO-APLASIA	FA-A ¹	O.A

NOTA: M = masculino; F = feminino; Grupo étnico B = branco; N = negro; M = mulato; I = índio; O = oriental.

Situação hematológica grau I = sem falha medular; grau II = falha inicial; grau III = falha avançada.

† = óbito; SI = Sem informação; Grupos de complementação: (1) Rockefeller University, Nova Iorque - EUA; (2) VU University Medical Center, Amsterdam- Holanda; (3) Hospital de Clínicas - UFPR; V.S = vivo sem alteração; V.A = vivo com alteração; O.S = óbito sem alteração; O.A = óbito com alteração.

5.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES AF

Todas as amostras de medula óssea dos 130 pacientes estudados foram submetidas ao bandeamento cromossômico GTG e analisadas conforme descrito em Material e Métodos.

O quadro 3 apresenta o resultado da análise citogenética nesta amostra. Setenta e cinco (57,69%) pacientes não apresentaram anormalidades cromossômicas clonais e 55 (42,31%) apresentaram. Nestes, observou-se 993 alterações clonais, das quais 464 (46,73%) eram alterações numéricas e 529 (53,27%) eram estruturais, sendo a diferença estatisticamente significativa ($\chi^2_1 = 4,26$; $P < 0,05$), e entre as numéricas, as monossomias (323) foram mais freqüentes do que as trissomias (141) ($\chi^2_1 = 71,38$; $P < 0,001$). Os quadros 4 e 5 apresentam respectivamente, as distribuições das alterações cromossômicas numéricas e estruturais por cromossomo e por paciente.

Entre as 464 alterações numéricas, as monossomias mais freqüentes foram dos cromossomos 21 e 22 (14,86%), 15 (10,52%), 20 (7,43%), X e 13 (6,19%). Os cromossomos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19 e Y apresentaram freqüências inferiores a 5% e monossomias não foram observadas nos cromossomos 1, 2 e 4. As trissomias mais freqüentes foram dos cromossomos 1 (19,14%), 12 (14,89%), X (10,63%), 2 (9,21%), 3 e 8 (5,67%). Os cromossomos 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21 e 22 apresentaram freqüências inferiores a 5%, não tendo sido observadas cromossomos 16, 20 e Y adicionais.

QUADRO 3 - CARIÓTIPOS OBTIDOS EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DOS 130 PACIENTES AF ANALISADOS

continua

PACIENTE	CARIÓTIPO
1	46,XY,add(1)(p36)[5]/46,XY[15]
2	46,XY[20]
3	46,XX[16]
4	46,XX,add(10)(q26)[3]/46,XX[8]/46,XX[21] 46,XX,add(10)(q26)[1]/46,XX[19] (2.ª amostra)
5	46,XX,del(5)(q34)[2]/46,XX[20]
6	46,XX[20] 46,XX[20]
7	46,XX[20]
8	45,XX,-22[3]/46,XX[17]
9	44,X,-X[3],-6[3][cp5]/46,XX[15]
10	45,XY,-7[6],del(9)(q22)[4][cp6]/45,XY,-10[4]/46,XY[8]
11	46,XX[6]
12	46,XY[19]
13	46,XX[18] 46,XX,dup(1)(p21p32)[2] (2.ª amostra) 46,XX,dup(1)(p21p32)[5],add(6)(p22)[9][cp14]/46,XX[3] (3.ª amostra)
14	46,XX,add(15)(q26)[3]/46,XX[19]
15	46,XX[18]
16	46,XX[5] 46,XX[20]
17	46,XX[20]
18	46,XX[20]
19	46,XX[5]
20	46,XY[10]
21	46,XY[13]
22	38~46,XY,+mar[3]/46,XY[17]
23	46,XX[20]
24	41~44,XX,-13[13],-18[3],-20[4],-21[5][cp8]/46,XX[12]
25	46,XX[20]
26	46,XX[20]
27	46,XX,trp(1)(q21q32)[2]/46,XX[4]
28	46,XX[13]
29	46,XY[20]
30	46,XX[20]
31	46,XX[17]
32	46,XX[11]
33	46,XX[20] 46,XY[18]/46,XX[2]
34	46,XX[13]
35	46,XX[6]
36	45,XY,-14[4]/46,XX[26]
37	46,XY,dup(1)(q22q44)[13],add(4)(q35)[4],del(7)(q35)[2][cp13]/46,XY[13]
38	46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY[16]
39	46,XY[6] 41~44,XY,-8[4],-9[4],-15[3],-21[5][cp7]/46,XY[13] (2.ª amostra)
40	42~46,XX,t(6;17)(q22;q25)[6]/46,XX[14]
41	46,XX[20] 37~41,X,-X[4],-3[4],-7[3],-9[5],-11[3],- 20[3][cp8]/37~66,XX,+1[2],+2[2],+3[2],+4[2],+6[2],+7[3],+10[3],+11[3],+12[3],+13[2],+14[3],+15[3],+17[3],+18[3],+ 19[5],+21[2],+22[3][cp5]/46,XX[5] (2.ª amostra)

QUADRO 3 - CARIÓTIPOS OBTIDOS EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DOS 130 PACIENTES AF ANALISADOS

continua

PACIENTE	CARIÓTIPO
42	46,XX[12] 42~44,X,-X,+mar[13]/46,XX[5] (2.ª amostra)
43	44~48,XX,+X[4],+9[5],+12[18],-21[18],-22[3][cp20] 46~47,XX,+X[11],-8[4],del(8)(q22)[7],-21[15],+mar[11][cp20] (2.ª amostra)
44	45,XX,-13[3]/46,XX[17]
45	46,XY,dup(3)(q11q29)[15]/47,XY,+2,dup(3)(q11q29)[3]/46,XY[2] 40~46,XY,+2,dup(3)(q11q29),add(19)(p13)[8]/46,XY,dup(3)(q11q29)[3] (2.ª amostra)
46	44,XX,-15,-18[cp6]/46,XX [14]
47	46,XX,dup(1)(q11q44)[20]/46,sl,dup(1)(p11p33)[cp4]
48	46,XY[20]
49	45,XY,-16[4]/45,XY,-17[3]/46,XY[11]
50	46,XY[12]
51	46,XY,dup(5)(q31)[14]/46,XY,del(6)(q32)[2],-7[3][cp3]
52	46,XY[8] 46,XY[20] (2.ª amostra)
53	41~44,XY,-15[5],-20[3][cp7]/46,XY[13]
54	40~44,XY,-12[4],-22[4][cp5] 46,XY[15]
55	46,XY[18]
56	46,XY,dup(1)(p11p32),del(5)(q13q33)[15]/46,sl,del(11)(q23)[4]
57	46,XY[20]
58	46,XY[16]
59	46,XY[5]
60	46,XX[20]
61	46,XY[16]
62	45,XY,-22[7]/46,XY[7]
63	46,XX,del(6)(q16)[2]/46,XX[23]
64	46,XX[20]
65	44,XX,-13[4],-14[3][cp5]/46,XX[15]
66	46,XY[20]
67	47,XX,+1[17]
68	46,XX,del(6)(q22)[2]/46,XX[20]
69	46,XY[20]
70	46,XX[20]
71	46,XY[20]
72	45,XX,-22[4]/46,XX[16]
73	46,XX,dup(1)(q12q32),t(5;5)(p13;q35)[20]
74	46,XX[20]
75	46,XX,del(7)(q31)[6]/46,XX[14]
76	46,XX[20]
77	46,XX[20]
78	46,XY[20]
79	46,XX[20] 46,XX[11]
80	46,XY[15] 46,XY[20]
81	46,XY,del(17)(p12)[4]/46,XY[9]
82	41~44,XY,-15,-19[6]/46,XY[16] 45,XY,del(6)(q22)[2],der(15)t(1;15)(q10;q10),-15[9][cp11]/46,XY[5] (2.ª amostra) 46,XY[35] (3.ª amostra)
83	46,XY,trp(1)(q21q31),add(8)(p23)[24]
84	46,XY[7]

QUADRO 3 - CARIÓTIPOS OBTIDOS EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DOS 130 PACIENTES AF ANALISADOS

PACIENTE	CARIÓTIPO	conclusão
85	46,XX[15]	
86	46,XX[29]	
87	47,XY,+mar[3]/46,XY[21]	
88	46,XY[20]	
89	46,XY[20]	
90	46,XY[10]	
91	46,XY[20]	
92	46,XX[12]	
93	46,XX[19] 46,XX[16]	
94	44~46,XY,add(1)(p22)[3]/46,XY[21]	
95	46,XY[20]	
96	46,XY,del(17)(p12)[2]/46,XY[16]	
97	46,XY[23]	
98	46,XY[20]	
99	46,XX,dup(1)(q23q43)[3]/46,XX, trp(1)(q23-q43)[4] 39~46,X,del(X)(q11)[5], trp(1)(q21q43)[8],dup(5)(p13p15)[3],- 11[3],del(12)(p12)[2],del(13)(q12q22)[7],add(20)(q13)[3],-20[6][cp8] (2.ª amostra)	
100	46,XY[20]	
101	46,XX,dup(1)(q21q32)[25]/46,sl,t(1;5)(p36;q23)[3]/46,XX, trp(1)(q21q32)[5]/46,XX[9]	
102	46,XX[5]	
103	46,XY[20]	
104	37~46,X,-Y[4],+1[8],+3[6],-6[8],-8[4],-15[5],-21[5],-22[16][cp17]	
105	46,XX[5]	
106	46,XX[13]	
107	46,XX[28]	
108	46,XX[10]	
109	46,XX,der(12)t(1;12)(q21;q13)[20]	
110	46,XY,del(7)(q31)[12]/46,XY[8]	
111	46,XY,+5,-22[8]/46,XY[12]	
112	46,XX[10]	
113	43~45,XX,-17,-20[8]/46,XX[12]	
114	46,XX[20]	
115	46,XX[20]	
116	46,XY,add(3)(q28)[2]/46,XY[16]	
117	46,XY[20]	
118	45~46,XY,del(6)(q23)[5],del(7)(q22)[14],+8[7],-14[9][cp14]/46,XY[3]	
119	46,XY[20]	
120	43~45,XY,del(1)(q32)[2],-5[3],-7[3],-8[3],-9[4],-10[4][cp14]/46,XY[6]	
121	46,XY[11]	
122	46,XY[18]	
123	46,XX[20]	
124	46,XY,del(2)(p24)[6]/46,XY[14]	
125	45,XY,-22[3]/46,XY[17]	
126	46,XY[13]	
127	46,XY[20]	
128	46,XY[15]	
129	46,XX[19]	
130	47,XX,del(5)(p10),+mar[7]/46,XX,t(11;19)(q23;p13)[2]	

QUADRO 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS CLONAIS NOS 55 PACIENTES

PACIENTE																								conclusão				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	TP	TG	F(%)
54	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	8		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	1,72
62	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	7		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	1,5
65	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	1,5
67	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	T	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	17	3,66
72	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	4		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,86
82	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	6	-	-	-	-	-	21		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	4,52
99	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	9		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	1,93
104	M	-	-	-	-	-	8	-	4	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	16	-	4	42		
	T	8	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	56	12,06
111	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	8		
	T	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	16	3,44
113	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	8	-	-	-	-	16		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	3,44
118	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9		
	T	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	16	3,44
120	M	-	-	-	-	3	-	3	3	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	3,66
125	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	3		
	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,64
TP	M	-	-	4	-	3	11	15	15	13	8	6	4	20	16	34	4	11	9	6	24	48	48	20	4	323		
	T	27	13	8	2	8	2	3	7	5	3	3	21	2	3	3	-	3	3	5	-	2	3	15	-	141		
TG		27	13	12	2	11	13	18	22	18	11	9	25	22	19	37	4	14	12	11	24	50	51	35	4		464	
F(%)		5,81	2,8	2,58	0,43	2,37	2,8	3,87	4,74	3,87	2,37	1,93	5,38	4,74	4,09	7,97	0,86	3,01	2,58	2,37	5,17	10,77	10,99	7,54	0,86			

NOTA: M = monossomia; T = trissomia; TP = total parcial; TG = total geral.

QUADRO 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS CLONAIIS NOS 55 PACIENTES

continua

PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	add(1)(p36)[5]	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	del(5)(q34)[2]	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	del(9)(q22)[4]
13	dup(1)(p21p32)[7]	-	-	-	-	add(6)(p22)[9]	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	trp(1)(q21q32)[2]	-	-	-	-	-	-	-	-
37	dup(1)(q22q44)[13]	-	-	add(4)(q35)[4]	-	-	del(7)(q35)[2]	-	-
38	-	-	-	-	-	-	del(7)(q32)[2]	-	-
40	-	-	-	-	-	t(6;17)(q22;q25)[6]	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	del(8)(q22)[7]	-
45	-	-	dup(3)(q11q29)[29]	-	-	-	-	-	-
47	dup(1)(q11q44)[24]/dup(1)(p11p33)[4]	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	dup(5)(q31)[14]	del(6)(q32)[2]	-	-	-
56	dup(1)(p11p32)[19]	-	-	-	del(5)(q13q33)[19]	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	del(6)(q16)[2]	-	-	-
68	-	-	-	-	-	del(6)(q22)[2]	-	-	-
73	dup(1)(q12q32)[20]	-	-	-	t(5;5)(p13;q35)[20]	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	del(7)(q31)[6]	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	t(1;15)(q10q10)[9]	-	-	-	-	del(6)(q22)[2]	-	-	-
83	trp(1)(q21q31)[24]	-	-	-	-	-	-	add(8)(p23)[24]	-
87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	add(1)(p22)[3]	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	dup(1)(q23q43)[3]/trp(1)(q23-q43)[12]	-	-	-	dup(5)(p13p15)[3]	-	-	-	-
101	dup(1)(q21q32)[28]/trp(1)(q21q32)[5]/t(1;5)(p36;q23)[3]	-	-	-	t(1;5)(p36;q23)[3]	-	-	-	-
109	t(1;12)(q21;q13)[20]	-	-	-	-	-	-	-	-
110	-	-	-	-	-	-	del(7)(q31)[12]	-	-
116	-	-	add(3)(q28)[2]	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	del(6)(q23)[5]	del(7)(q22)[14]	-	-
120	del(1)(q32)[2]	-	-	-	-	-	-	-	-
124	-	del(2)(p24)[6]	-	-	-	-	-	-	-
130	-	-	-	-	del(5)(p10)[7]	-	-	-	-
TOTAL	203	6	31	4	68	28	36	31	4
F(%)	38,37	1,13	5,86	0,75	12,85	5,29	6,80	5,86	0,75

NOTA: mar = cromossomo marcador.

QUADRO 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS CLONAIS NOS 55 PACIENTES

PACIENTE											conclusão	
	10	11	12	13	15	17	19	20	X	MAR	TOTAL	F(%)
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0,94
4	add(10)(q26)[4]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,75
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,37
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,75
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	3,02
14	-	-	-	-	add(15)(q26)[3]	-	-	-	-	-	3	0,56
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mar[3]	3	0,56
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,37
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	3,59
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,37
40	-	-	-	-	-	t(6;17)(q22;q25)[6]	-	-	-	-	12	2,26
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mar[13]	13	2,45
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mar[11]	18	3,4
45	-	-	-	-	-	-	-	add(19)(p13)[8]	-	-	37	6,99
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	5,29
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	3,02
56	-	del(11)(q23)[4]	-	-	-	-	-	-	-	-	42	7,93
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,37
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,37
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	7,56
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0,94
81	-	-	-	-	-	del(17)(p12)[4]	-	-	-	-	4	0,75
82	-	-	-	-	der(15)t(1;15) (q10q10)[9]	-	-	-	-	-	20	3,78
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48	9,07
87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	mar[3]	3	0,56
94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,56
96	-	-	-	-	-	del(17)(p12)[2]	-	-	-	-	2	0,37
99	-	-	del(12)(p12)[2]	del(13)(q12q22)[7]	-	-	-	add(20)(q13)[3]	del(X)(q11)[5]	-	35	6,61
101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39	7,37
109	-	-	der(12)t(1;12) (q21;q13)[20]	-	-	-	-	-	-	-	40	7,56
110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	2,26
116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,37
118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	3,59
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,37
124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0,94
130	-	t(11;19)(q23;p13)[2]	-	-	-	-	t(11;19)(q23;p13)[2]	-	-	mar[7]	18	3,4
TOTAL	4	6	22	7	12	12	10	3	5	37	529	
F(%)	0,75	1,13	4,15	1,32	2,26	2,26	1,89	0,56	0,94	6,99		

Entre as 529 alterações estruturais, 203 (38,37%) envolveram o cromossomo 1, 68 (12,85%) o cromossomo 5, 36 (6,8%) o cromossomo 7, 31 (5,86%) os cromossomos 3 e 8, 28 (5,29%) o cromossomo 6, 22 (4,15%) o cromossomo 12, 12 (2,26%) os cromossomos 15 e 17, 10 (1,89%) o cromossomo 19, 7 (1,32%) o cromossomo 13, 6 (1,13%) os cromossomos 2 e 11, 5 (0,94%) o cromossomo X, 4 (0,75%) os cromossomos 4, 9 e 10, 3 (0,94%) envolveram o cromossomo 20, e 37 (6,99%) eram cromossomos marcadores. Alterações estruturais não ocorreram nos cromossomos 14, 16, 18, 21, 22 e Y. As tabelas 1 e 2 e nos gráficos 2 e 3 são apresentadas o resumo das frequências de alterações cromossômica, numéricas e estruturais por cromossomo e por paciente, respectivamente.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS CLONAIIS POR CROMOSSOMO

C	NUMÉRICAS							ESTRUTURAIS				
	M	M/TP	T	T/TP	TP	TP/Total N	TP/TG	n	n/TG	n/Total E	TG	TG/Total
1	-	-	27	100	27	5,81	12	203	88	38,37	230	23
2	-	-	13	100	13	2,8	68	6	32	1,13	19	1,9
3	4	33	8	67	12	2,5	28	31	72	5,86	43	4,3
4	-	-	2	100	2	0,43	33	4	67	0,75	6	0,6
5	3	27	8	73	11	2,37	14	68	86	12,85	79	7,9
6	11	85	2	15	13	2,8	32	28	68	5,29	41	4,1
7	15	83	3	17	18	3,8	33	36	67	6,8	54	5,4
8	15	68	7	32	22	4,7	42	31	58	5,86	53	5,3
9	13	72	5	28	18	3,8	82	4	18	0,75	22	2,2
10	8	73	3	27	11	2,37	73	4	27	0,75	15	1,5
11	6	67	3	33	9	1,9	60	6	40	1,13	15	1,5
12	4	16	21	84	25	5,3	53	22	47	4,15	47	4,7
13	20	91	2	9	22	4,7	76	7	24	1,32	29	2,9
14	16	84	3	16	19	4	100	-	-	-	19	1,9
15	34	92	3	8	37	7,9	76	12	24	2,26	49	4,9
16	4	100	-	-	4	0,86	-	-	-	-	4	0,4
17	11	79	3	21	14	0,3	54	12	46	2,26	26	2,6
18	9	75	3	25	12	2,5	100	-	-	-	12	1,2
19	6	55	5	45	11	2,37	52	10	48	1,89	21	2,1
20	24	100	-	-	24	5,1	89	3	11	0,56	27	2,7
21	48	96	2	4	50	10,77	100	-	-	-	50	5
22	48	94	3	6	51	10,99	100	-	-	-	51	5,1
X	20	57	15	43	25	5,3	88	5	12	0,94	40	4
Y	4	100	-	-	4	0,86	100	-	-	-	4	0,4
mar	-	-	-	-	-	-	-	37	100	6,99	37	3,7
Total	323	70	141	30	464	100	47	529	53	100	993	
F(%)	35,52%		14,19%		46,72%			53,27%				

NOTA: C = cromossomo; M = monossomia; T = trissomia; TP: total parcial; TG = total geral; Total N = total alterações numéricas; Total E = total alterações estruturais.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS CLONAIS POR PACIENTES

PAC.	NUMÉRICAS							ESTRUTURAIS				
	M	M/TP	T	T/TP	TP	TP/ Total N	TP/TG	n	n/TG	n/ Total E	TG	TG/Total
1	-	-	-	-	-	-	-	5	100	0,94	5	0,5
4	-	-	-	-	-	-	-	4	100	0,75	4	0,4
5	-	-	-	-	-	-	-	2	100	0,37	2	0,2
8	3	100	-	-	3	0,64	100	-	-	-	3	0,3
9	6	100	-	-	6	1,29	100	-	-	-	6	0,6
10	10	100	-	-	10	2,15	71	4	29	0,75	14	1,4
13	-	-	-	-	-	-	-	16	100	3,02	16	1,6
14	-	-	-	-	-	-	-	3	100	0,56	3	0,3
22	-	-	-	-	-	-	-	3	100	0,56	3	0,3
24	25	100	-	-	25	5,38	100	-	-	-	25	2,5
27	-	-	-	-	-	-	-	2	100	0,37	2	0,2
36	4	100	-	-	4	0,86	100	-	-	-	4	0,4
37	-	-	-	-	-	-	-	19	100	3,59	19	1,9
38	-	-	-	-	-	-	-	2	100	0,37	2	0,2
39	16	100	-	-	16	3,44	100	-	-	-	16	1,6
40	-	-	-	-	-	-	-	12	100	2,26	12	1,2
41	22	32	46	68	68	14,65	100	-	-	-	68	6,8
42	13	100	-	-	13	2,8	50	13	50	2,45	26	2,6
43	40	51	38	49	78	16,8	81	18	19	3,4	96	9,6
44	3	100	-	-	3	0,64	100	-	-	-	3	0,3
45	-	-	11	100	11	2,37	23	37	77	6,99	48	4,8
46	12	100	-	-	12	2,58	100	-	-	-	12	1,2
47	-	-	-	-	-	-	-	28	100	5,29	28	2,8
49	7	100	-	-	7	1,5	100	-	-	-	7	0,7
51	3	100	-	-	3	0,64	16	16	84	3,02	19	1,9
53	8	100	-	-	8	1,72	100	-	-	-	8	0,8
54	8	100	-	-	8	1,72	100	-	-	-	8	0,8
56	-	-	-	-	-	-	-	42	100	7,93	42	4,2
62	7	100	-	-	7	1,5	100	-	-	-	7	0,7
63	-	-	-	-	-	-	-	2	100	0,37	2	0,2
65	7	100	-	-	7	1,5	100	-	-	-	7	0,7
67	-	-	17	100	17	3,66	100	-	-	-	17	1,7
68	-	-	-	-	-	-	-	2	100	0,37	2	0,2
72	4	100	-	-	4	0,86	100	-	-	-	4	0,4
73	-	-	-	-	-	-	-	40	100	7,56	40	4
75	-	-	-	-	-	-	-	6	100	1,13	6	0,6
81	-	-	-	-	-	-	-	4	100	0,75	4	0,4
82	21	100	-	-	21	4,52	51	20	49	3,78	41	4,1
83	-	-	-	-	-	-	-	48	100	9,07	48	4,8
87	-	-	-	-	-	-	-	3	100	0,56	3	0,3
94	-	-	-	-	-	-	-	3	100	0,56	3	0,3
96	-	-	-	-	-	-	-	2	100	0,37	2	0,2
99	9	100	-	-	2	0,43	20	35	80	6,61	44	4,4
101	-	-	-	-	-	-	-	39	100	7,37	39	3,9
104	42	75	14	25	56	12,06	100	-	-	-	56	5,6
109	-	-	-	-	-	-	-	40	100	7,56	40	4
110	-	-	-	-	-	-	-	12	100	2,26	12	1,2
111	8	50	8	50	16	3,44	100	-	-	-	16	1,6
113	16	100	-	-	16	3,44	100	-	-	-	16	1,6
116	-	-	-	-	-	-	-	2	100	0,37	2	0,2
118	9	56	7	44	16	3,44	46	19	54	3,59	35	3,5
120	17	100	-	-	17	3,66	89	2	11	0,37	19	1,9
124	-	-	-	-	-	-	-	6	100	1,13	6	0,6
125	3	100	-	-	3	0,64	100	-	-	-	3	0,3
130	-	-	-	-	-	-	-	18	100	3,4	18	1,8
TOTAL	323	70	141	30	464	47		529	53		993	

NOTA: M = monossomia; T = trissomia; TP: total parcial; TG = total geral; Total N = total alterações numéricas; Total E = total alterações estruturais.

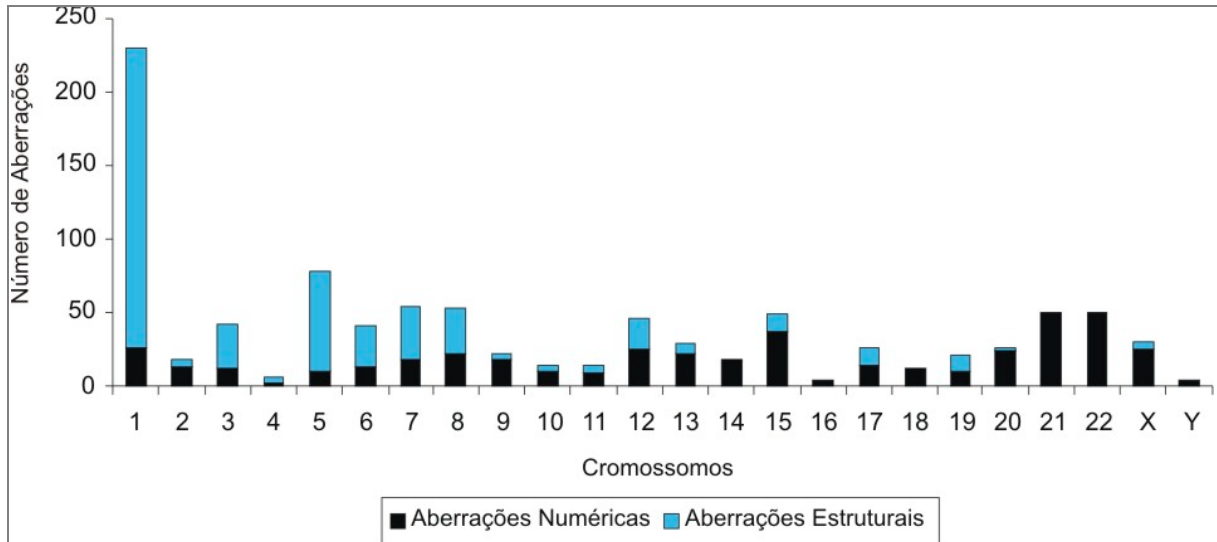


GRÁFICO 2 - FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS POR CROMOSSOMO

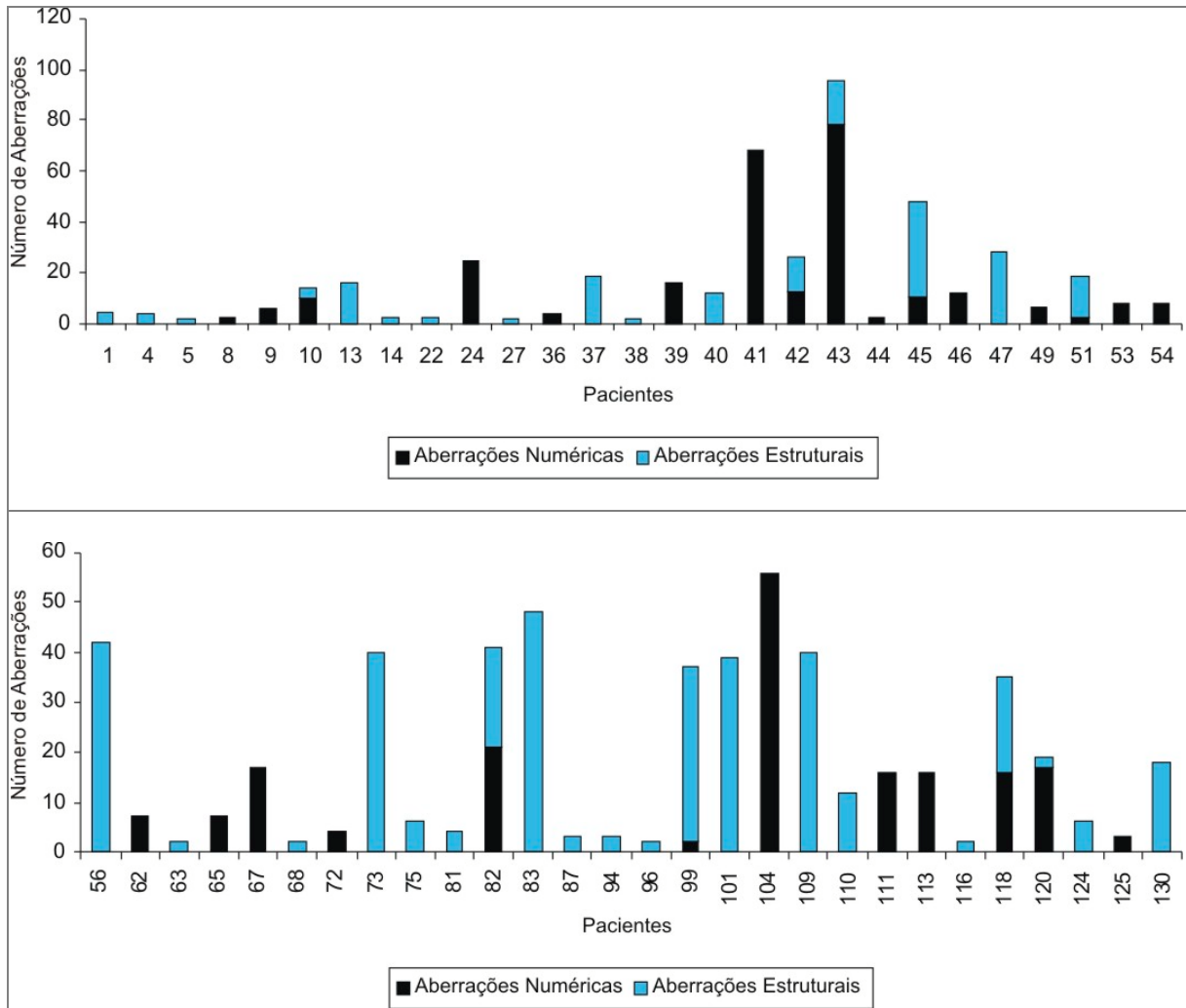


GRÁFICO 3 - FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS NOS 55 PACIENTES

O cromossomo 1 foi o mais frequentemente envolvido nas alterações cromossômicas, tendo sido observadas em 17 (13,07%) dos 130 pacientes (1, 13, 27, 37, 41, 47, 56, 67, 73, 82, 83, 94, 99, 101, 104, 109 e 120). As alterações estruturais do cromossomo 1 (203) corresponderam a 20,44% das 993 alterações clonais encontradas nos pacientes analisados e a 88% das identificadas neste cromossomo. Das 203 alterações estruturais do cromossomo 1, 88 (43,35%) foram duplicação no braço longo, 43 (21,18%) triplicação no mesmo braço, 30 (14,78%) duplicação no braço curto, 20 (9,85%) translocações com segmentos dos cromossomos 12, 12 (5,9%) com segmentos do cromossomo 15, 8 (3,94%) material adicional no braço curto e 2 (0,98%) deleções no braço longo. Alterações numéricas foram observadas em 3 (5,45%) dos 55 pacientes com alterações, sendo 27 trissomias representando 12% das alterações deste cromossomo. As figuras 5 e 6 apresentam uma metáfase dos casos 13 e 27, respectivamente, com dup(1)(p21p32) e trp(1)(q21q32).

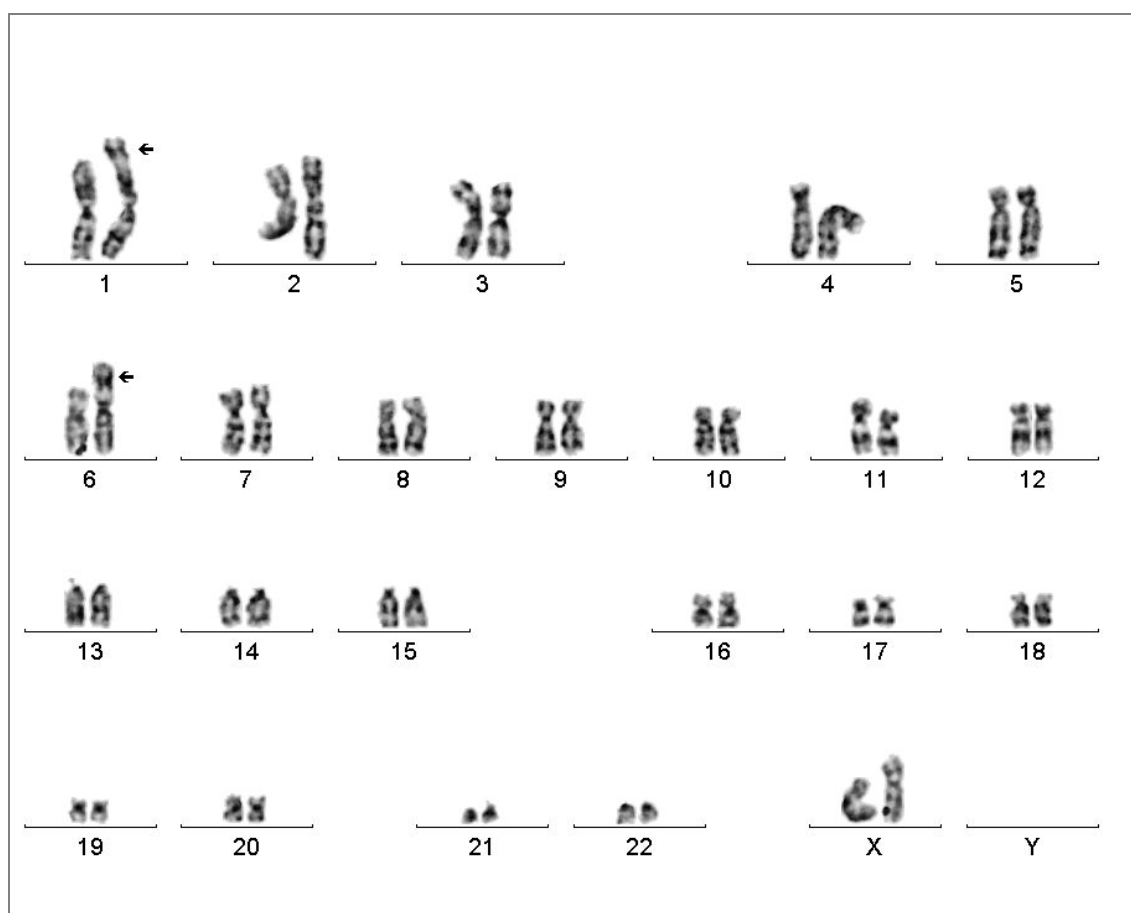


FIGURA 5 - METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 13: 46,XX,dup(1)(p21p32),add(6)(p22)

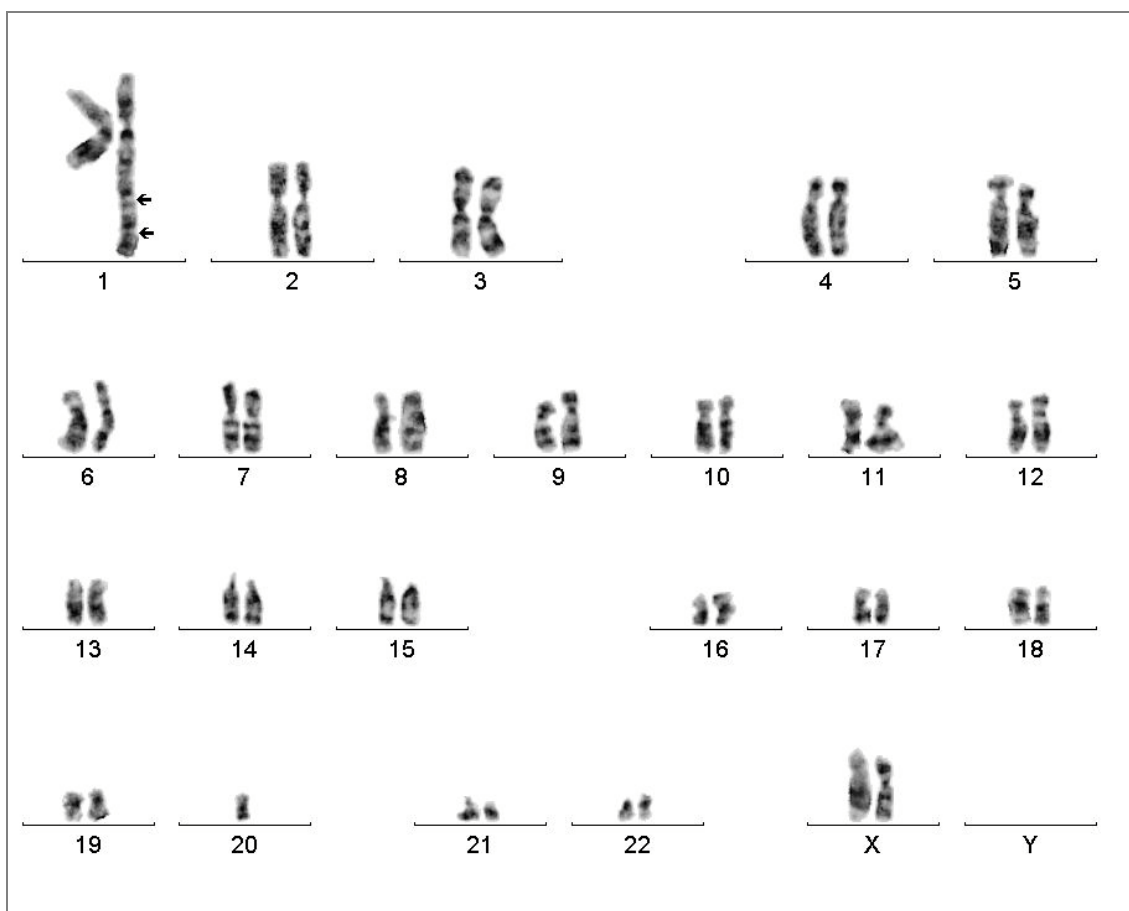


FIGURA 6 - METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 27: 46,XX, trp(1)(q21q32), -20

O cromossomo 5, foi o segundo mais envolvido em alterações cromossômicas, tendo sido observado em 9 (6,92%) dos 130 pacientes (5, 51, 56, 73, 99, 101, 111, 120 e 130). As alterações envolvendo este cromossomo corresponderam a 79 do total das 993 alterações. As alterações estruturais foram mais frequentes (68=86%) do que as numéricas (11=14%). A deleção no braço longo (5q13-q34) foi a alteração mais frequente, observada em 2 (3,63%) dos 55 pacientes com alterações, correspondendo a 30,88% das alterações envolvendo este cromossomo. As demais alterações estruturais observadas foram: translocação com o cromossomo homólogo, t(5;5) (29,41%), duplicação do braço longo, dup(5q) (20,58%), deleção no braço curto, del(5p) (10,29%), duplicação do braço curto, dup(5p) (4,41%) e a translocação com segmento do cromossomo 1, t(1;5) (4,41%). Entre as alterações numéricas envolvendo o cromossomo 5 observou-se que estas ocorreram em somente 2 (3,63%)

dos 55 pacientes com alterações: um com trissomia (8=10,25%) e outro com monossomia (3= 3,84%)

O cromossomo 7 foi o terceiro mais freqüentemente envolvido em alterações citogenéticas, tendo sido observadas em 9 (6,92%) dos 130 pacientes estudados (10, 37, 38, 41, 51, 75, 110, 118, 120), correspondendo a 5,4% do total das 993 alterações observadas, sendo que as estruturais (36=67%) foram mais freqüentes do que as numéricas (18=33%) neste cromossomo. O único tipo de alteração estrutural observada foi a deleção no braço longo em q22, q31, q32 e q35. As monossomias (15=83%) foram mais freqüentes do que as trissomias (3=17%). A figura 7 apresenta uma metáfase do paciente 38 com del(7)(q32).

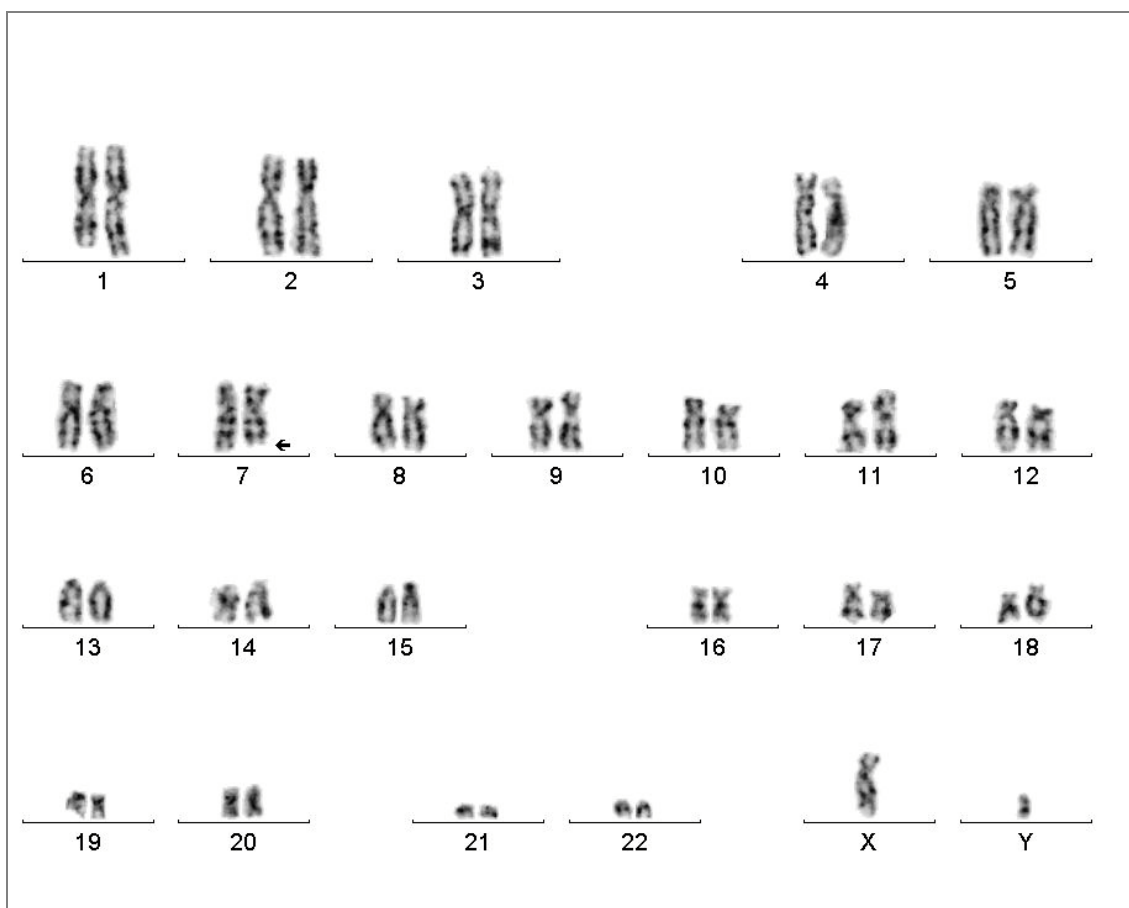


FIGURA 7 - METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 38: 46,XY,del(7)(q32)

Alterações envolvendo o cromossomo 8 foram observadas em 6 (5,3%) dos 130 pacientes estudados (39, 43, 83, 104, 118, 120). As alterações deste

cromossomo (53) representam 5,3% do total das alterações observadas, sendo que 31 (58%) foram estruturais e 22 (42%) foram numéricas. Entre as estruturais a presença de material adicional no braço curto em p23 foi a mais freqüente (24=77,4%). Observou-se 15 (68,18%) monossomias e 7 (31,82%) trissomias.

Alterações envolvendo o cromossomo 3 foram observadas em 4 (3,07%) dos 130 pacientes (41, 45, 104, 116), e as 43 alterações observadas representam 4,3% do total das 993 alterações observadas na nossa amostra. Destas, 72% foram estruturais e 38% foram numéricas. Entre as estruturais, a duplicação do braço longo, em q11q29 foi a mais freqüente (29=93,6%). Das numéricas, 8 (66,67%) foram trissomias e 4 (33,33%) foram monossomias. A figura 8 apresenta uma metáfase do paciente 45, com dup(3q)(q11q29).

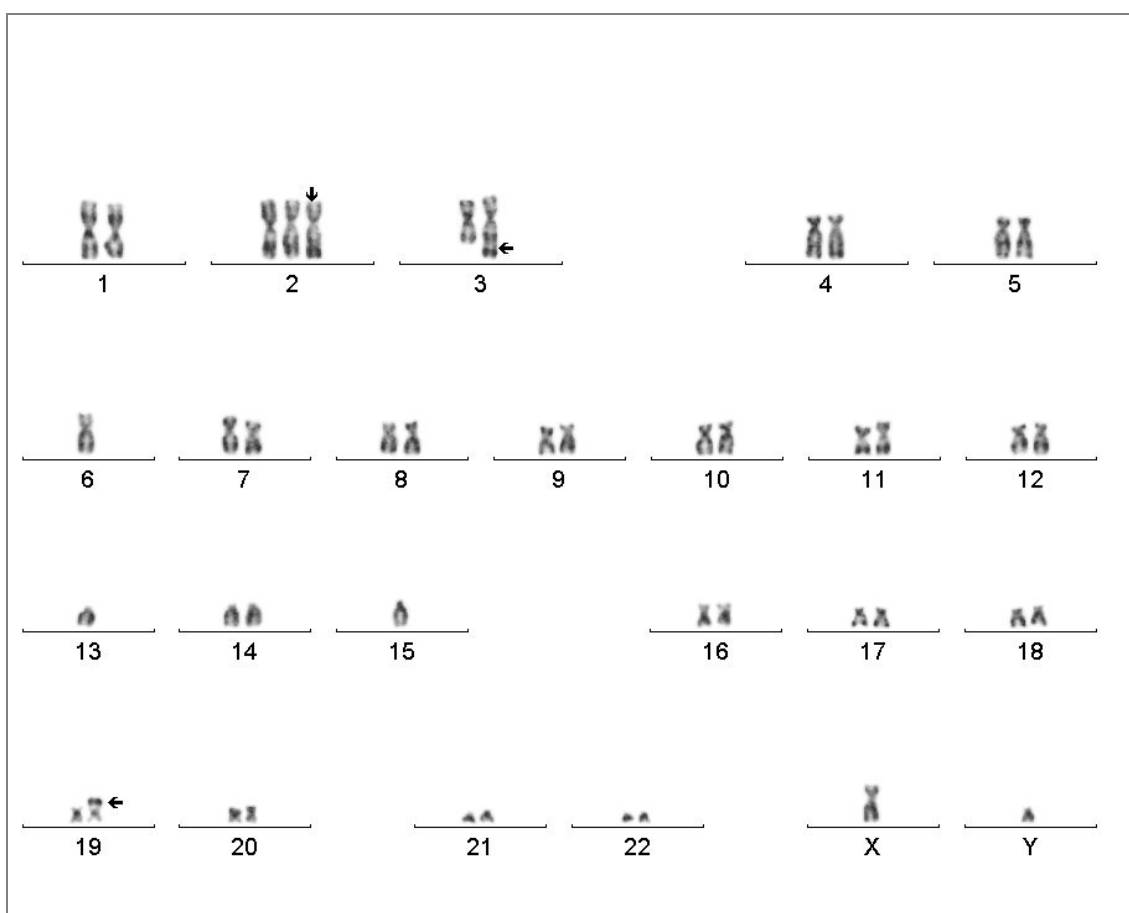


FIGURA 8 - METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 45: 44,XY,+2,dup(3)(q11q29),-6,-13,-15,add(19)(p13)

O cromossomo 6 apresentou alterações em 10 (7,69%) dos 130 pacientes (9, 13, 40, 41, 51, 63, 68, 82, 104, 118), num total de 41 (4,1%) das 993 alterações. Destas 28 (68%) foram estruturais e 13 (32%) numéricas, das quais, 11 (84,62%) foram monossomias e 2 (15,38%) foram trissomias. Das estruturais as deleções no braço longo do cromossomo 6, em q16, q22, q23 e q32, foram as mais freqüentes (13=46,43%). As monossomias (11=84,62%) foram mais freqüentes do que as trissomias (2=15,38%).

O cromossomo 12 apresentou alterações em 5 (3,84%) dos 130 pacientes (41, 43, 54, 99, 109), sendo que as 47 alterações observadas corresponderam a 4,7% do total das 993 alterações. Destas, 22 (47%) foram estruturais e 25 (53%) numéricas. Das estruturais, o derivativo 12, da t(1;12) observado em 20 delas, foi a mais freqüente (90,9%), e das numéricas 21 (84%) foram trissomias e 4 (16%) monossomias.

O cromossomo 15 apresentou alterações em 7 (5,38%) dos 130 pacientes (14, 39, 41, 46, 53, 82, 104), num total de 49 (4,9%) das 993 alterações, sendo que 12 (24%) foram estruturais e 37 (76%) foram numéricas. Das estruturais o derivativo 15, da t(1;15) foi a mais freqüente (12=75%) e das numéricas as trissomias (34=91,9%) foram mais freqüentes do que as monossomias (3=8,10%). A figura 9 apresenta uma metáfase do paciente 82 com der(15)t(1;15)(q10;q10).

Somente alterações numéricas foram observadas nos cromossomos 21 e 22 em 5 (3,84%) e 9 (6,92%) dos pacientes (24, 39, 41, 43, 104 e 8, 41, 43, 54, 62, 72, 104, 111 e 125 respectivamente). Em ambos as monossomias 48(96% e 94%) foram mais freqüentes do que as trissomias (2=4% e 3=6%), respectivamente para os cromossomos 21 e 22, totalizando 50(5%) e 51(5,1%) das 993 alterações.

O cromossomo X apresentou alterações em 5 (3,85%) dos 130 pacientes (9, 41, 42, 43, 99), num total de 40 (4%) alterações das 993, sendo que a única alteração estrutural (5=12,5%) foi a deleção no braço longo do X, del(X)(q11) e 35 (87,5%) foram numéricas, das quais 20 (57,14%) foram monossomias e 15 (42,86%) foram trissomias.

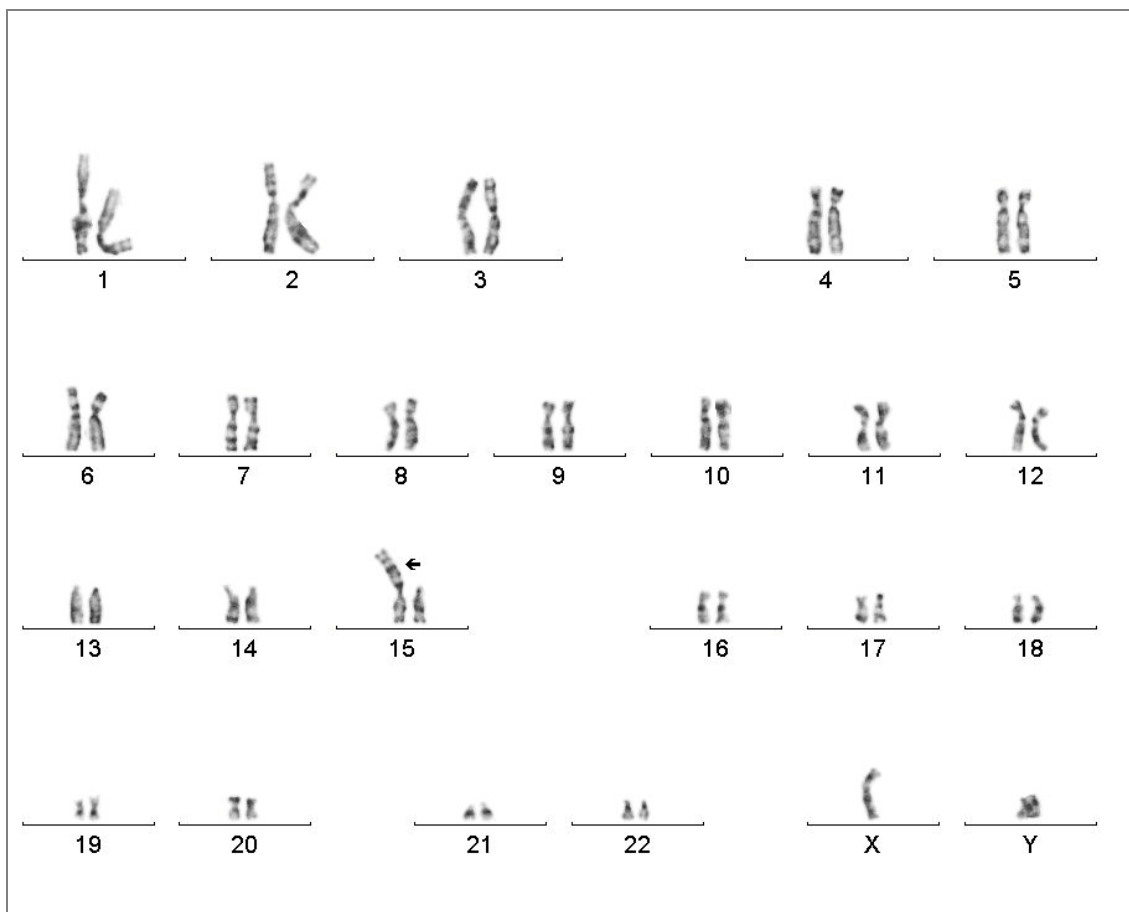


FIGURA 9 - METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 82: 46,XY,der(15)t(1;15)(q10;q10)

A presença de cromossomo marcador foi observada em 5 (3,85%) dos 130 pacientes (22, 42, 43, 87, 130), num total de 37 (3,7%) alterações das 993 alterações clonais totais observadas na nossa análise.

O cromossomo 13 apresentou alterações em 5 (3,85%) dos 130 pacientes (24, 41, 44, 65, 99), num total de 29 (2,9%) alterações das 993, 7 (24,14%) foram estruturais, sendo a única alteração a $del(13)(q12q22)$ e 22 (75,86%) foram numéricas, das quais 20 (90,90%) foram monossomias e 2 (9,09%) foram trissomias.

O cromossomo 20 apresentou alterações em 5 (3,85%) dos 130 pacientes (24, 41, 53, 99, 113), num total de 27 (2,7%) alterações das 993, sendo que a única 3(11,11%) estrutural foi a presença de material adicional no braço longo do cromossomo 20, $add(20q)(q13)$. Somente monossomias foram observadas (24=88,89%).

O cromossomo 17 apresentou alterações em 6 (4,61%) dos 130 pacientes (40, 41, 49, 81, 96, 113), num total de 26 (2,6%) alterações das 993, sendo que 12 (46,15%) foram estruturais, representadas pela del(17)(p12) (50%) e pela t(6;17)(q22;q25) (50%) e 14 (53,85%) foram numéricas (11=78,57% monossomias e 3=21,43%, trissomias).

O cromossomo 9 apresentou alterações em 5 (3,85%) dos 130 pacientes (10, 39, 41, 43, 120), num total de 22 (2,2%) alterações das 993, sendo que 4 (18,19%) foram estruturais, sendo única, a deleção no braço longo do 9, del(9q)(q22); 18 (81,81%) foram numéricas, das quais 13 (72,22%) foram monossomias e 5 (27,78%) foram trissomias.

O cromossomo 19 apresentou alterações em 4 (3,07%) dos 130 pacientes (41, 45, 82, 130), num total de 21 (2,1%) alterações das 993, sendo que 10 (47,61%) foram alterações estruturais: material adicional no braço curto do 19, add(19p) (80%) e a translocação envolvendo os cromossomos 11 e 19, t(11;19) (20%) e 11 (52,39%) foram numéricas, das quais 6 (54,54%) foram monossomias e 5 (45,46%) foram trissomias.

O cromossomo 2 apresentou alterações em 3 (2,3%) dos 130 pacientes (41, 45, 124), num total de 19 (1,9%) alterações das 993, sendo que 6 (31,57%) foram alterações estruturais, del(2p)(p24) e 13 (68,42%) foram numéricas, somente trissomias.

O cromossomo 14 apresentou alterações em 4 (3,07%) dos 130 pacientes (36, 41, 65, 118), num total de 19 (1,9%) alterações das 993, sendo que não foram observadas alterações estruturais envolvendo este cromossomo. Das 19 alterações numéricas, 16 (84,21%) foram monossomias e 3 (15,79%) foram trissomias.

O cromossomo 10 apresentou alterações em 7 (5,38%) dos 130 pacientes (4, 39, 41, 46, 53, 82, 104), num total de 15 (1,5%) alterações das 993, sendo que 4 (26,67%) foram estruturais, add(10q)(q26) e 11 (73,33%) foram numéricas, das quais 8 (72,72%) monossomias e 3 (27,28%) trissomias.

O cromossomo 11 apresentou alterações em 4 (3,07%) dos 130 pacientes (41, 56, 99, 130), num total de 15 (1,5%) alterações das 993, sendo que 6 (40%) foram estruturais: del(11q)(q23) e t(6;17) e 9 (60%) foram numéricas, das quais 6 (66,67%) monossomias e 3 (33,33%) trissomias.

O cromossomo 18 apresentou alterações em 3 (2,3%) dos 130 pacientes (24, 41, 46), num total de 12 (1,2%) alterações das 993, sendo que não foram observadas alterações estruturais envolvendo este cromossomo. Das 12 alterações numéricas, 9 (75%) foram monossomias e 3 (25%) foram trissomias.

O cromossomo 4 apresentou alterações em 2 (1,53%) dos 130 pacientes (37, 41), num total de 6 (0,6%) alterações das 993, sendo que 4 (66,67%) foram estruturais, add(4q)(q34) e 2 (33,33%) foram trissomias.

O cromossomo 16 apresentou alteração em 1 (0,76%) dos 130 pacientes (49), num total de 4 (0,4%) alterações das 993, sendo que não foram observadas alterações estruturais envolvendo este cromossomo, e todas as alterações numéricas foram monossomias.

O cromossomo Y apresentou alteração em 1 (0,76%) dos 130 pacientes (104), num total de 4 (0,4%) alterações das 993, sendo que não foram observadas alterações estruturais envolvendo este cromossomo, e todas as alterações numéricas foram monossomias.

As informações até agora descritas, estão também apresentadas considerando individualmente as alterações cromossômicas, conforme os dados das tabelas 3 e 4. Observa-se que os resultados mais significativos foram confirmados quando consideramos o número total de alterações observadas.

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS POR CROMOSSOMO

C	NUMÉRICAS							ESTRUTURAIS				
	M	M/TP	T	T/TP	TP	TP/Total N	TP/TG	n	n/TG	n/Total E	TG	TG/Total
1	-	-	3	100	3	3,57	14	18	86	29,03	21	14,4
2	-	-	2	100	2	2,38	67	1	33	1,61	3	2,05
3	1	33	2	67	3	3,57	60	2	40	3,22	5	3,42
4	-	-	1	100	1	1,19	50	1	50	1,61	2	1,36
5	1	50	1	50	2	2,38	22	7	78	11,29	9	6,2
6	2	67	1	33	3	3,57	33	6	67	9,67	9	6,2
7	4	80	1	20	5	5,95	50	5	50	8,06	10	6,85
8	4	80	1	20	5	5,95	71	2	29	3,22	7	4,79
9	3	75	1	25	4	4,76	80	1	20	1,61	5	3,42
10	2	67	1	33	3	3,57	75	1	25	1,61	4	2,73
11	2	67	1	33	3	3,57	60	2	40	3,22	5	3,42
12	1	33	2	67	3	3,57	60	2	40	3,22	5	3,42
13	3	75	1	25	4	4,76	80	1	20	1,61	5	3,42
14	3	75	1	25	4	4,76	100	-	-	-	4	2,73
15	5	83	1	17	6	7,14	75	2	25	3,22	8	5,47
16	1	100	-	-	1	1,19	100	-	-	-	1	0,68
17	2	67	1	33	3	3,57	60	2	40	3,22	5	3,42
18	2	67	1	33	3	3,57	100	-	-	-	3	2,05
19	1	50	1	50	2	2,38	50	2	50	3,22	4	2,73
20	5	100	-	-	5	5,95	83	1	17	1,61	6	4,1
21	4	80	1	20	5	5,95	100	-	-	-	5	3,42
22	8	89	1	11	9	10,71	100	-	-	-	9	6,2
X	3	75	1	25	4	4,76	80	1	20	1,61	5	3,42
Y	1	100	-	-	1	1,19	100	-	-	-	1	0,68
mar	-	-	-	-	-	-	-	5	100	8,06	5	3,42
Total	58	69	26	31	84		58	62	42		146	
F(%)	39,72%		17,80%		57,53%			42,47%				

NOTA: C = cromossomo; M = monossomia; T = trissomia; TP: total parcial; TG = total geral; Total N = total alterações numéricas; Total E = total alterações estruturais.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E NUMÉRICAS POR PACIENTE

PAC.	NUMÉRICAS							ESTRUTURAIS				
	M	M/TP	T	T/TP	TP	TP/ Total N	TP/TG	n	n/TG	n/ Total E	TG	TG/Total
1	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
4	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
5	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
8	1	100	-	-	1	1,2	100	-	-	-	1	0,69
9	2	100	-	-	2	2,4	100	-	-	-	2	1,37
10	2	100	-	-	2	2,4	67	1	33	1,6	3	2,05
13	-	-	-	-	-	-	-	2	100	3,22	2	1,37
14	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
22	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
24	4	100	-	-	4	4,8	100	-	-	-	4	2,74
27	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
36	1	100	-	-	1	1,2	100	-	-	-	1	0,69
37	-	-	-	-	-	-	-	3	100	4,8	3	2,05
38	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
39	4	100	-	-	4	4,8	100	-	-	-	4	2,74
40	-	-	-	-	-	-	-	2	100	3,22	2	1,37
41	6	26	17	74	23	27,4	100	-	-	-	23	15,75
42	1	100	-	-	1	1,2	50	1	50	1,6	2	1,37
43	3	50	3	50	6	7,15	75	2	25	3,22	8	5,48
44	1	100	-	-	1	1,2	100	-	-	-	1	0,69
45	-	-	1	100	1	1,2	33	2	67	3,22	3	2,05
46	2	100	-	-	2	2,4	100	-	-	-	2	1,37
47	-	-	-	-	-	-	-	2	100	3,22	2	1,37
49	2	100	-	-	2	2,4	100	-	-	-	2	1,37
51	1	100	-	-	1	1,2	33	2	67	3,22	3	2,05
53	2	100	-	-	2	2,4	100	-	-	-	2	1,37
54	2	100	-	-	2	2,4	100	-	-	-	2	1,37
56	-	-	-	-	-	-	-	3	100	4,8	3	2,05
62	1	100	-	-	1	1,2	100	-	-	-	1	0,69
63	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
65	2	100	-	-	2	2,4	100	-	-	-	2	1,37
67	-	-	1	100	1	1,2	100	-	-	-	1	0,69
68	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
72	1	100	-	-	1	1,2	100	-	-	-	1	0,69
73	-	-	-	-	-	-	-	2	100	3,22	2	1,37
75	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
81	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
82	2	100	-	-	2	2,4	40	3	60	4,8	5	3,42
83	-	-	-	-	-	-	-	2	100	3,22	2	1,37
87	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
94	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
96	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
99	2	100	-	-	2	2,4	22	7	78	11,3	9	6,16
101	-	-	-	-	-	-	-	2	100	3,22	2	1,37
104	6	75	2	25	8	9,5	100	-	-	-	8	5,48
109	-	-	-	-	-	-	-	2	100	3,22	2	1,37
110	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
111	1	50	1	50	2	2,4	100	-	-	-	2	1,37
113	2	100	-	-	2	2,4	100	-	-	-	2	1,37
116	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
118	1	50	1	50	2	2,4	50	2	50	3,22	4	2,74
120	5	100	-	-	5	5,9	83	1	17	1,6	6	4,1
124	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1,6	1	0,69
125	1	100	-	-	1	1,2	100	-	-	-	1	0,69
130	-	-	-	-	-	-	-	4	100	6,5	4	2,74
TOTAL	58	69	26	31	84		58	62	42		146	

NOTA: M = monossomia; T = trissomia; TP: total parcial; TG = total geral; Total N = total alterações numéricas; Total E = total alterações estruturais.

5.3 ÍNDICE DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS E SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA

A média do índice de quebras cromossômicas nos 130 pacientes que constituíram a amostra foi igual a $3,60 \pm 3,09$. Dezesesseis (12,31%) pacientes apresentaram situação hematológica grau I, 73 (56,15%) grau II e 41 (31,54%) grau III (quadro 2). Com o objetivo de avaliar se as variações do índice de quebras cromossômicas dependem do grau da situação hematológica, calculou-se o coeficiente de regressão que indicou um valor positivo e estatisticamente significativo ($b = 3,03 \pm 0,42$. $t = 3,10$; $P < 0,01$). O gráfico 4 apresenta a distribuição e a reta de regressão dos valores utilizados para obtenção do coeficiente de regressão. As médias do índice de quebras cromossômicas em cada um dos graus da situação hematológica foram iguais a: grau I = $3,26 \pm 1,86$, grau II = $3,55 \pm 3,10$ e grau III = $3,83 \pm 3,58$. Considerando que o teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett indicou que os quadrados médios das três amostras (graus I, II e III), apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($\chi^2_{2\text{corr}} = 7,30$; $P < 0,05$), não foi possível avaliar a significância das diferenças entre as médias pela análise da variância. A razão entre os quadrados médios das amostras foi, então, estimada por F (Fisher) que apresentou os seguintes valores, interpretados a 2,5% de significância, para as comparações: grau III e I = 3,69 (significante) graus III e II = 1,33 (não significativa) e graus II e I = 2,77 (significante). O teste t (Student) apresentou valores não significativos nas comparações das diferenças entre as médias dos graus III e I ($t' = 0,78 > t_c = 2,07$) e dos graus II e I ($t' = 0,49 > t_c = 2,09$).

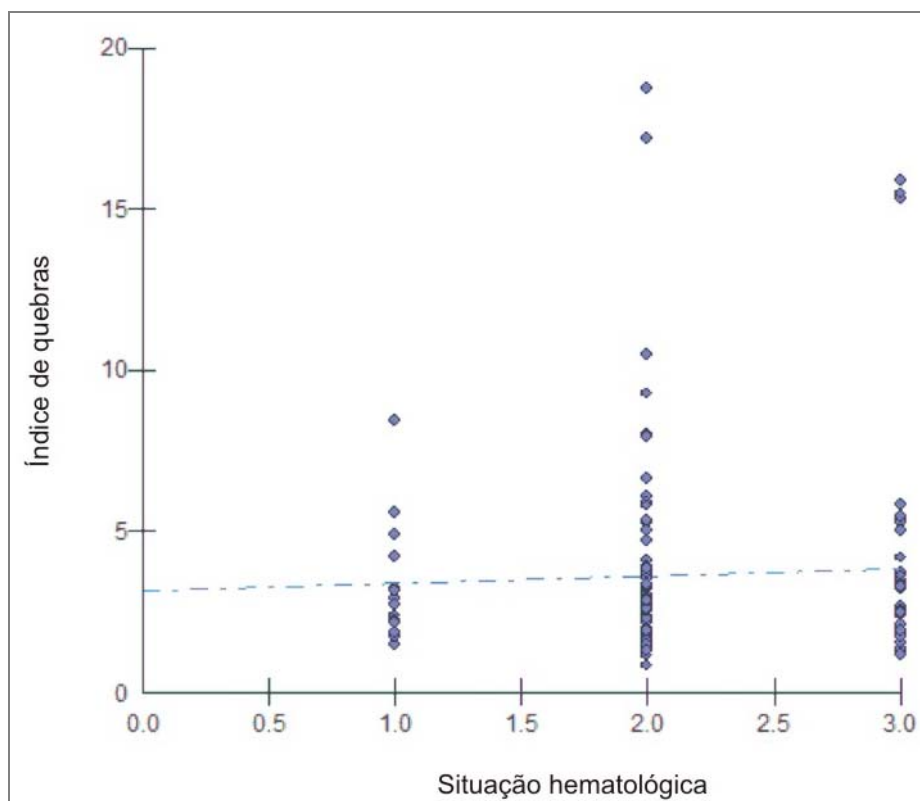


GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS ÍNDICES DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS E RETA DE REGRESSÃO EM FUNÇÃO DO GRAU DA SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA

5.4 ÍNDICE DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS EM ANÁLISES CONSECUTIVAS

A tabela 5 apresenta os índices de quebras cromossômicas ao diagnóstico e em análises repetidas, após o diagnóstico, em diferentes períodos de tempo (meses) no mesmo paciente. Este procedimento foi realizado em 32(25%) dos 130 pacientes da amostra. O coeficiente de regressão foi igual a: $b = -0,02 \pm 0,02$. $t = 1,0$; $P > 0,30$, negativo e estatisticamente não significativo, indicando que as variações do índice de quebras cromossômicas não dependem do tempo de repetição do teste do DEB, após o diagnóstico. O teste t para dados emparelhados, demonstrou que a média das diferenças intrapares dos índices de quebras cromossômicas obtidas ao diagnóstico e em diferentes períodos após o mesmo, não apresentou diferença estatisticamente significativa ($\bar{d} = -0,47 \pm 0,52$. $t = 0,81$; $P > 0,40$). O gráfico 5 apresenta a distribuição dos índices de quebras cromossômicas e a reta de regressão em função do tempo (meses) de repetição do exame.

TABELA 5 - ÍNDICE DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS NO DIAGNÓSTICO E EM REPETIDAS ANÁLISES EM 32 PACIENTES

PACIENTE	IQ DIAG	MESES	IQ REP
105	3,24	2	1,92
34	1,72	3	2,29
5	3,5	4	3,5
28	3,24	4	8,42
50	5,44	4	4,04
121	2,88	5	12,84
46	1,39	6	2,09
42	5,56	14	4,4
39	3,72	16	1,7
93	1,08	18	1,8
16	2,82	20	9,13
114	1,6	20	3,28
29	5,56	21	3,72
24	2,63	24	1,32
65	1,56	24	4
80	1,16	24	1,26
7	2,44	26	2
41	8,46	28	0,32
126	1,48	29	1,48
49	2,92	31	2,8
31	3,91	33	1,56
48	1,92	33	2,32
4	1,44	39	2,71
12	4,08	45	5,72
10	1,5	50	1,6
11	1,5	51	1,6
64	3,16	54	4,12
30	5,27	56	8,42
9	2,66	73	1,92
75	1,48	77	2,08
8	2,65	80	2,65
44	3,68	86	3,52

NOTA: IQ Diag = índice de quebras cromossômicas no diagnóstico; IQ Rep = índice de quebras cromossômicas na repetição.

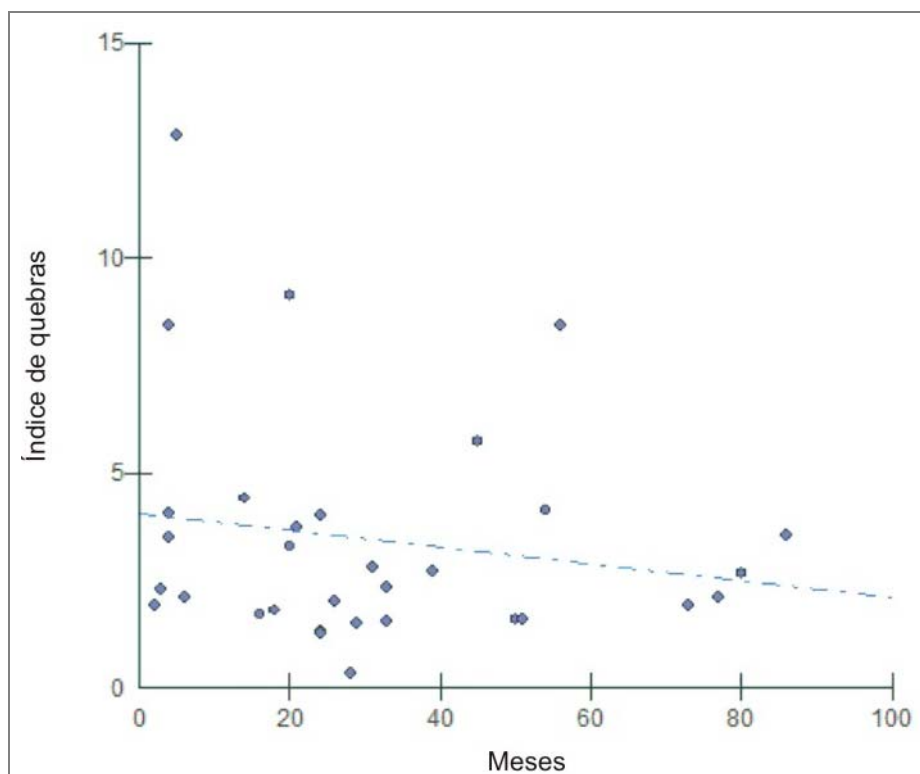


GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS ÍNDICES DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS E RETA DE REGRESSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO (MESES) DE REPETIÇÃO DO EXAME

5.5 PACIENTES COM E SEM ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Conforme os dados do quadro 2, dos 130 pacientes que constituíram a amostra, 75 (57,69%) não apresentaram alterações cromossômicas. A idade média destes pacientes ao diagnóstico foi de: $8,73 \pm 4,92$ anos, 35 (47%) do sexo masculino e 40 (53%) do sexo feminino. Quarenta e quatro (58,67%) pacientes eram brancos, 16 (21,33%) negros, 13 (17,33%) mulatos, um (1,33%) índio e um oriental. O índice de quebras cromossômicas foi, em média de $3,42 \pm 2,80$ por paciente. Nove (12%) apresentaram situação hematológica grau I, 43 (57%) grau II e 23 (31%) grau III. A maioria (46=61,3%) dos 75 pacientes foi submetida ao TMO, um (1,3%) apresentou aplasia medular e de 28 não se obteve informações.

A idade média ao diagnóstico dos 55 (42,31%) pacientes que apresentaram alterações cromossômicas foi igual a: $11,33 \pm 5,75$ anos, 28 (50,91%) do sexo masculino e 27 (49,71%) do sexo feminino. Trinta (54,5%) eram brancos, 18 (32,7%) mulatos e 7 (12,7%) negros. O índice de quebras cromossômicas foi, em média, de $3,66 \pm 2,78$.

Seis (11%) apresentaram situação hematológica grau I, 31 (56,4%) grau II e 18 (32,7%) grau III. Vinte e seis (47,3%) pacientes foram submetidos ao TMO (5 deles desenvolveram SMD e um LMA, todos foram à óbito), 11(20%) apresentaram aplasia medular, três (5,5%) pancitopenia, um (1,8%) desenvolveu LMA e foi à óbito e de 14 (25,5%) não se obteve informação.

A diferença entre as médias das idades dos pacientes dos dois grupos foi estatisticamente significativa ($t=2,77; P<0,01$), o mesmo não se observando entre as médias do índice de quebras cromossômicas ($t=0,04; P>0,90$). O número de pacientes sem e com alterações cromossômicas se distribuíram igualmente nos diferentes graus (I, II e III) de situação hematológica ($\chi^2=0,08; P>0,95$)

Em ambos os grupos, sem e com alterações cromossômicas, 53(71%) e 33(60%) dos pacientes permaneciam vivos em janeiro de 2008 (quando foi concluída a coleta dos dados), com média de sobrevida, desde o diagnóstico, igual a $56,08\pm 21,28$ e $53,14\pm 35,06$ meses, respectivamente ($t'=0,43; <tc=2,03$). Ao diagnóstico apresentaram, respectivamente, em média $8,87\pm 5,20$ e $9,15\pm 4,92$ anos de idade ($t=0,25; P>0,8$). O índice de quebras cromossômicas foi, em média, igual a $3,67\pm 3,23$ nos 53 pacientes vivos sem alterações cromossômicas, e igual a $3,70\pm 1,26$ nos 33 pacientes vivos com alterações cromossômicas ($t'=0,06 < tc=2,0$). A situação hematológica dos primeiros era: grau I=9, grau II=34 e grau III=10; nos vivos com alterações cromossômicas, os mesmos valores foram respectivamente iguais a 3,24 e 6 ($\chi^2=1,27; P>0,70$). Dos 53 pacientes sem alterações cromossômicas 27(51%) foram submetidos ao TMO, um (1,9%) apresentou aplasia medular e de 25 (47%) não se obteve informações. Nos 33 pacientes vivos com alterações cromossômicas, 15 (45,5%) foram submetidos ao TMO, (4 deles com aplasia medular e um que desenvolveu SMD foi à óbito), 6 (18,2%) apresentaram aplasia medular, 2 (6%) apresentaram pancitopenia, e de 10 (30,3%) não se obteve informações.

Dos 75 pacientes sem alterações cromossômicas, 22 (29%) foram a óbito e dos 55 pacientes com alterações cromossômicas, também 22 (40%) foram a óbito. Ao diagnóstico, os 22 pacientes do primeiro grupo tinham idade média de $8,41\pm 4,26$ anos e nos do segundo grupo a idade média ao diagnóstico foi igual a $14,59\pm 6,94$

anos ($t=3,55;P<0,01$). O índice de quebras cromossômicas foi, em média, igual a $2,84\pm 1,34$ nos 22 pacientes sem alterações cromossômicas e a $4,34\pm 4,19$ nos 22 pacientes com alterações cromossômicas que foram a óbito ($t=1,44;P>0,10$). A situação hematológica dos pacientes sem e com alterações cromossômicas que foram a óbito foi, respectivamente igual a: grau I= zero e 3, grau II=9 e 7, grau III=13 e 12 ($\chi^2_1=0,10;P>0,70$; os pacientes com graus I e II foram agrupados numa mesma classe). Dezenove (86%) sem alterações cromossômicas foram submetidos ao TMO e de 3 (14%) não se obteve informações. Já, dos 22 pacientes com alterações cromossômicas que foram a óbito, 11 (50%) foram submetidos ao TMO (dos quais 4 desenvolveram SMD, um LMA e um GVHD), 5 (23%) apresentaram aplasia medular, um pancitopenia, um evoluiu para LMA e de 4 (18%) não se obteve informações. O gráfico 6 apresenta as curvas de sobrevivência dos pacientes sem e com alterações cromossômicas, que expressa a probabilidade de sobrevivência em função do tempo (meses) em que ocorreram os óbitos. Observa-se que para os pacientes sem alterações cromossômicas a probabilidade foi igual a 0,74 no 101.º mês (quando ocorreu o último óbito neste grupo) e igual a 0,56 no 82.º mês (quando ocorreu o último óbito) para os pacientes com alterações cromossômicas. O log rank test indicou que a diferença entre as mesmas é estatisticamente significativa ($\chi^2_1=8,24;P<0,01$).

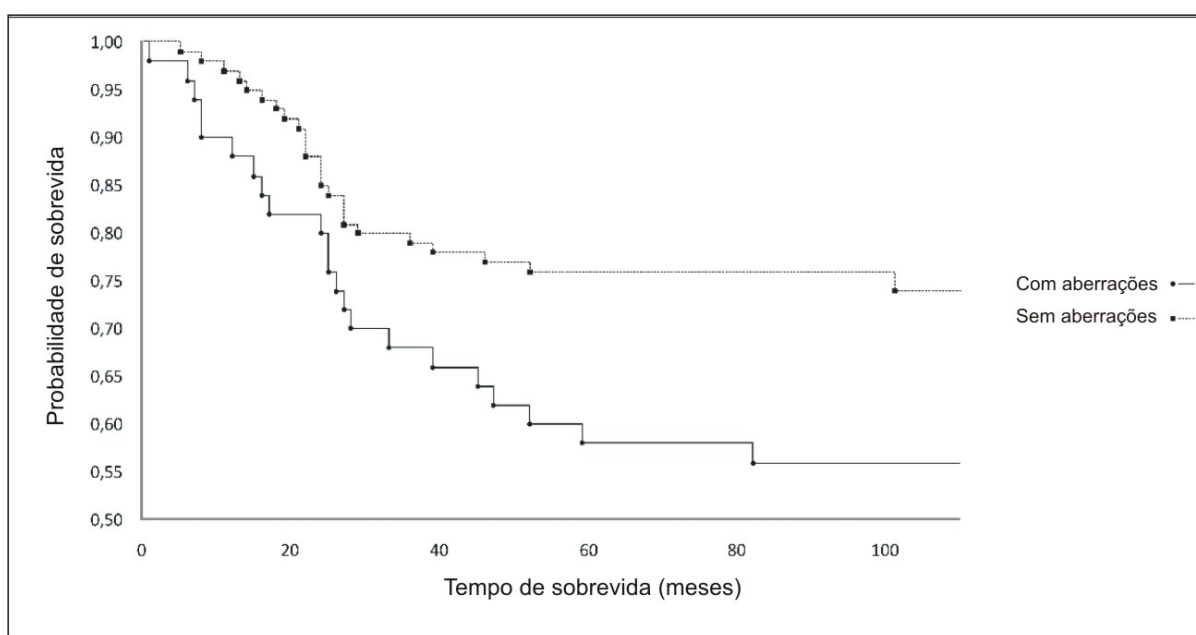


GRÁFICO 6 - CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES SEM E COM ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Foram comparados os parâmetros clínicos, hematológico e citogenéticos dos 22 pacientes com alterações cromossômicas que foram a óbito e dos 33 com alterações cromossômicas que permaneciam vivos em janeiro de 2008 (quando foram concluídas as coletas de dados). Nos pacientes a óbito a idade média ao diagnóstico foi igual a $14,59 \pm 6,94$ anos e dos vivos, igual a $9,15 \pm 4,92$ anos ($t=3,18; P<0,01$). O índice de quebras cromossômicas foi, em média, igual a $4,34 \pm 4,19$ nos pacientes a óbito e igual a $3,20 \pm 1,26$ nos vivos ($t'=1,24 < tc=2,07$). A situação hematológica ao diagnóstico dos pacientes que foram a óbito e dos vivos foi, respectivamente, igual a grau I= 3 e 3; grau II= 7 e 24 e grau III= 12 e 6 ($\chi^2_1= 7,92; P<0,01$), os pacientes com graus I e II foram agrupados numa mesma classe). Dos pacientes que foram a óbito, 11(50%) foram submetidos ao TMO (dos quais 4 desenvolveram MDS, um LMA e um GVHD), 5 (23%) apresentaram aplasia medular, um (4,5%) apresentou pancitopenia, um evoluiu para LMA e de 4 (18%) não se obteve informações. Dos vivos, 15 (45,5%) foram submetidos ao TMO (4 deles com aplasia medular e um desenvolveu MDS), 6 (18,2%) apresentaram aplasia medular, 2 (6%) apresentaram pancitopenia e de 10 (30,3%) não se obteve informações.

As tabelas e gráficos a seguir apresentam a distribuição das alterações numéricas e estruturais nos pacientes que foram a óbito (tabela 6 e gráfico 7) e dos pacientes vivos (tabela 7 e gráfico 8). Nos primeiros, 5 (22,7%) pacientes apresentaram só alterações numéricas, 10 (45,5%) somente estruturais e 7 (31,8%) numéricas e estruturais. Nos 33 pacientes vivos, 14 (42,4%) apresentaram somente alterações numéricas, 17 (51,5%) somente estruturais e 2 (6,1%) numéricas e estruturais. A diferença de alterações numéricas nos óbitos (263 = 57%) e nos vivos (201 = 43%) foi estatisticamente significativa ($\chi^2_1= 8,28; P<0,01$), o mesmo foi observado com as alterações estruturais: óbitos = 374 (71%); vivos = 155 (29%) ($\chi^2_1= 90,6; P<0,001$). As freqüências de alterações numéricas, estruturais e numéricas mais estruturais, não se distribuíram igualmente nos pacientes que foram a óbito e nos vivos ($\chi^2_2= 6,93; P<0,05$), o mesmo observando-se com o total de alterações numéricas e estruturais nos óbitos e nos vivos ($\chi^2_1= 21,12; P<0,001$).

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS NOS PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO

C	NUMÉRICAS							ESTRUTURAIS				
	M	M/TP	T	T/TP	TP	TP/ Total N	TP/TG	n	n/TG	n/ Total E	TG	TG/Total
1	-	-	2	100	2	0,76	2	147	98	39,3	149	23,39
2	-	-	13	100	13	4,94	68	6	32	1,6	19	2,98
3	4	67	2	33	6	2,28	83	29	17	7,75	35	5,49
4	-	-	2	100	2	0,76	100	-	-	-	2	0,3
5	3	100	-	-	3	1,14	4	66	96	17,64	69	10,83
6	-	-	2	100	2	0,76	8	24	92	6,41	26	4,08
7	15	83	3	17	18	6,84	56	14	44	3,74	32	5,02
8	7	50	7	50	14	5,32	67	7	33	1,87	21	3,29
9	9	64	5	36	14	5,32	78	4	22	1,06	18	2,82
10	8	73	3	27	11	4,18	100	-	-	-	11	1,72
11	6	67	3	33	9	3,42	60	6	40	1,6	15	2,35
12	-	-	21	100	21	9,12	48	22	52	5,88	43	6,75
13	17	89	2	11	19	7,22	73	7	27	1,87	26	4,08
14	12	80	3	20	15	5,7	100	-	-	-	15	2,35
15	-	-	3	100	3	1,14	100	-	-	-	3	0,47
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	8	73	3	27	11	4,18	65	6	35	1,6	17	2,66
18	3	50	3	50	6	2,28	100	-	-	-	6	0,94
19	-	-	5	100	5	1,9	33	10	67	2,67	15	2,35
20	21	100	-	-	21	7,98	87	3	13	0,8	24	3,76
21	38	95	2	5	40	15,2	100	-	-	-	40	6,27
22	6	67	3	33	9	3,42	100	-	-	-	9	1,41
X	4	21	15	79	19	7,22	79	5	21	1,33	24	3,76
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mar	-	-	-	-	-	-	-	18	100	4,81	18	2,82
TOTAL	161	61,22%	102	38,78%	263			374			637	
F(%)		25,27%		16,01%			41,28%		58,71%			

NOTA: C = cromossomo; M = monossomias; T = trissomias; TP = total parcial; n = número de alterações estruturais; TG = total geral; Total N = total alterações numéricas; Total E = total alterações estruturais.

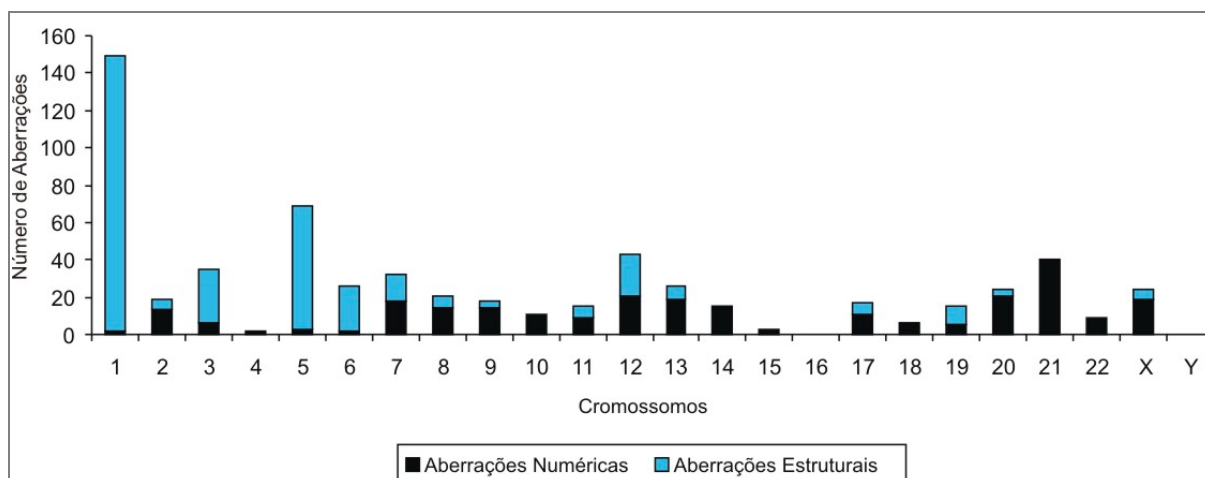


GRÁFICO 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS POR CROMOSSOMO NOS PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS NOS PACIENTES VIVOS

C	NUMÉRICAS					ESTRUTURAIS				
	M	T	TP	TP/Total	TP/TG	n	n/TG	n/Total E	TG	TG/Total
1	-	25	25	12,43	31	56	69	36,12	81	22,75
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	6	6	2,98	100	-	-	-	6	1,68
4	-	-	-	-	-	4	100	2,58	4	1,12
5	-	8	8	3,98	80	2	20	1,29	10	2,8
6	11	-	11	5,47	73	4	27	2,58	15	4,21
7	-	-	-	-	-	22	100	14,19	22	6,17
8	8	-	8	3,98	25	24	75	15,48	32	8,98
9	4	-	4	1,99	100	-	-	-	4	1,12
10	-	-	-	-	-	4	100	2,58	4	1,12
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	4	-	4	1,99	100	-	-	-	4	1,12
13	3	-	3	1,49	100	-	-	-	3	0,84
14	4	-	4	1,99	100	-	-	-	4	1,12
15	34	-	34	16,91	74	12	26	7,74	46	12,92
16	4	-	4	1,99	100	-	-	-	4	1,12
17	3	-	3	1,49	67	6	33	3,87	9	2,52
18	6	-	6	2,98	100	-	-	-	6	1,68
19	6	-	6	2,98	100	-	-	-	6	1,68
20	3	-	3	1,49	100	-	-	-	3	0,84
21	10	-	10	4,98	100	-	-	-	10	2,8
22	42	-	42	20,89	100	-	-	-	42	11,79
X	16	-	16	7,96	100	-	-	-	16	4,49
Y	4	-	4	1,99	100	-	-	-	4	1,12
mar	-	-	-	-	-	19	100	12,25	19	5,33
TOTAL	162	39	201			155			356	
%	45,50%	10,95%			56,46%		43,54%			

NOTA: C = cromossomo; M = monossomias; T = trissomias; TP = total parcial; n = número de alterações estruturais; TG = total geral; Total N = total alterações numéricas; Total E = total alterações estruturais.

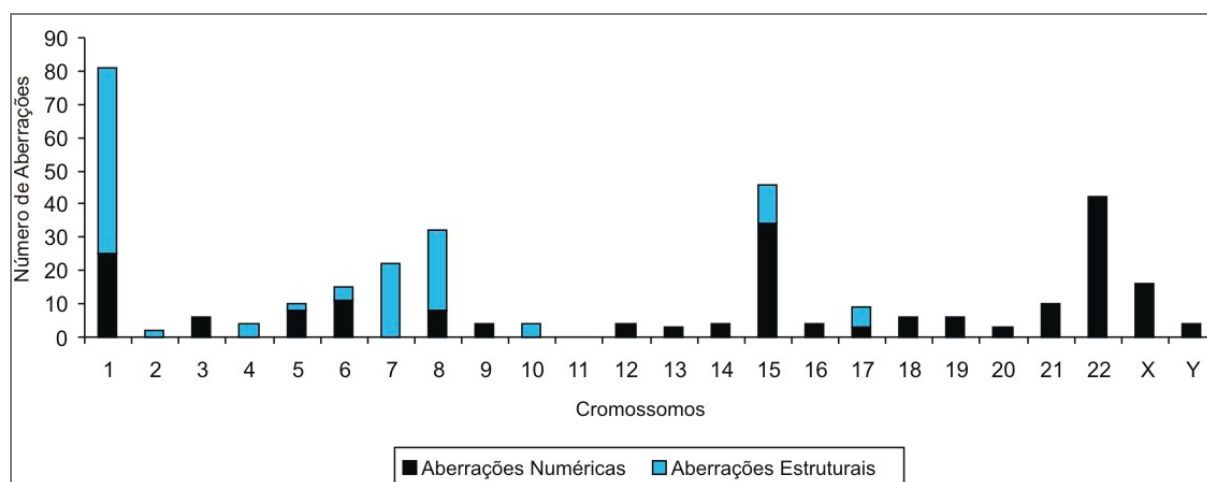


GRÁFICO 8 - DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS POR CROMOSSOMO NOS PACIENTES VIVOS

As alterações numéricas foram detectadas em 12 (55%) dos 22 pacientes que foram a óbito e em 16 (48,5%) dos 33 pacientes vivos. O número de pacientes com monossomias, trissomias e de ambos os tipos de alterações em cada grupo foi, respectivamente, igual a 8 (67%), 1(8%), 3 (25%) e 13 (81,2%), 1 (6,3%) e 2 (12,5%). As monossomias (323) foram mais freqüentes do que as trissomias (141) nos dois grupos, observando respectivamente, 161 e 102 nos pacientes que foram a óbito e 162 e 39 nos pacientes vivos. As mesmas não se distribuíram igualmente nos dois grupos de pacientes ($\chi^2_1 = 20,23$; $P < 0,001$). Em média, observou-se $13,42 \pm 11,37$ monossomias, $8,5 \pm 16,13$ trissomias e $21,92 \pm 24,75$ do total de alterações numéricas nos pacientes que foram a óbito. Os mesmo valores para os pacientes vivos foram: $10,13 \pm 10,03$; $2,44 \pm 5,50$ e $12,56 \pm 12,85$. As diferenças não foram estatisticamente significantes para nenhuma das comparações ($t = 0,80$; $P > 0,40$, $t' = 1,25 < t_c = 2,20$ e $t' = 1,20 < t_c = 2,19$, respectivamente para monossomias, trissomias e para o total das alterações numéricas).

Nos pacientes que foram a óbito, o cromossomo que apresentou mais alterações numéricas foi o 21 com 40 (15,21%) alterações, sendo 38 monossomias e 2 trissomias. Nos demais cromossomos as alterações não foram superiores a 8%. Os pacientes n.^{os} 43 e 41, foram os que mais apresentaram alterações, 29,66% e 25,86%; 40 e 22 monossomias e 38 e 46 trissomias, respectivamente. Estes pacientes tinham, ao diagnóstico, 31 e 12 anos de idade, respectivamente, foram a óbito aos 16 e 33 meses após o diagnóstico; o índice de quebras cromossômicas foi igual a 7,92 e 8,46 e o grau de situação hematológica foi II e I. Ambos desenvolveram SMD após TMO. Nos cromossomos Y e 16 não foram detectadas alterações numéricas.

Nos pacientes vivos os cromossomos com mais freqüência de alterações numéricas foram o n. 22 com 42 (20,90%) monossomias, o n. 15 com 34 (16,92%) monossomias e o n. 1 com 25 (12,44%) monossomias. Nos demais cromossomos a freqüência de alterações numéricas não foi superior a 8%. O paciente n. 104 foi o que apresentou maior número de alterações (27,86%) sendo 42 monossomias e 14

trissomias. Este paciente ao diagnóstico tinha 5 anos de idade, sobreviveu em janeiro de 2008 de 47 meses, apresentava situação hematológica grau II e desenvolveu SMD após TMO. Nos cromossomos 4, 7, 10 e 11 não foram observadas alterações numéricas.

As alterações estruturais foram observadas em 17 (77,3%) dos pacientes que foram a óbito e em 19 (57,6%) dos 33 pacientes vivos, com média, respectivamente, de $21,71 \pm 14,63$ e $8,42 \pm 11,40$ ($t = 3,08$; $P < 0,01$) Nos primeiros, alterações no cromossomo 1 foram as mais frequentes, estando presentes em 8 (36,4%) dos 22 pacientes. As duplicações (105) e triplicações (17) foram as alterações mais comuns, representando em conjunto, 122 (83%) das 147 alterações neste cromossomo, seguindo-se 23 (15,6%) translocações e duas (1,4%) deleções. Identificou-se três diferentes duplicações no braço curto, envolvendo as regiões p11 a p21 e duplicações e triplicações no braço longo de q11 a q44. O segundo cromossomo que mais apresentou alterações estruturais nos pacientes que foram a óbito foi o número 5, tendo sido detectadas 66 (17,64%) alterações em 6 (27,3%) dos 22 pacientes. As deleções (26 = 39%) foram as mais frequentes, observadas principalmente em q13q33 (19 = 73%). Os pacientes com maior número de alterações estruturais foram os de número 56 (11,22%), 109 (10,70%) e 101 (10,42%). Os pacientes tinham ao diagnóstico, respectivamente, 14, 25 e 13 anos de idade, foram a óbito aos 12, 26 e 45 meses após o diagnóstico, e o índice que quebras cromossômicas foi 1,98, 1,72 e 1,92 e o grau da situação hematológica II, I e III. O primeiro paciente (n. 56) apresentou aplasia medular tendo sido submetido ao TMO, o segundo (n.109) apresentou pancitopenia e do paciente n.101 não se obteve informação da causa específica do óbito. Os cromossomos 4, 10, 14, 15, 16, 18, 21, 22 e Y não apresentaram alterações estruturais.

Nos 33 pacientes vivos com alterações estruturais as mesmas foram identificadas em 19 (57,6%) deles. Como aconteceu nos pacientes que foram a óbito, o cromossomo 1 foi o mais frequentemente envolvido, tendo sido observado alterado em 6 (18,2%) dos pacientes. As triplicações (26) e duplicações (13) foram as mais comuns, representando, em conjunto, 39 (69,6%) das 56 alterações neste cromossomo, seguindo-se de 9 (16,1%) translocações e 8 (14,3%) presença de material adicional

de origem desconhecida (add). Observou-se duas diferentes triplicações no braço longo, no segmento entre as regiões q21 a q32 e a duplicação no mesmo braço foi entre q22 e q44. O segundo cromossomo que mais apresentou alterações foi o número 8 com 24 (15,48%) em um (3,03%) dos pacientes com uma única alteração, add (8)(p23).

O cromossomo número 7 foi o terceiro com mais alterações (22/156 = 14,19%) observados em 4 (12,12%) dos 33 pacientes. Somente foram detectadas deleções e a região q31 (18/22 = 82%) foi a principalmente envolvida. Os pacientes que mais apresentaram alterações foram os números 83 (30,96%), 82 (12,9%) e 37 (12,25%). Estes pacientes tinham ao diagnóstico respectivamente, 5, 17 e 13 anos de idade; 43, 118 e 25 meses de sobrevivência em janeiro de 2008, e o índice de quebras cromossômicas foi igual a 3,92, 3,33 e 2,80; situação hematológica igual a grau II (nos três). Um (n.83) apresentou aplasia e dos outros dois (n.^{os} 82 e 37) não se obteve informações sobre a evolução clínica. Os cromossomos 2, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21 22, X e Y não apresentaram alterações estruturais.

Como nos 55 pacientes com alterações cromossômicas (Tabelas 2 e 4), avaliamos também nos 22 que foram a óbito e nos 33 pacientes vivos, as alterações cromossômicas individualmente (tabelas 8 e 9). Os resultados mais significativos confirmaram os obtidos quando se analisou o total de alterações nestes dois grupos. Os pacientes que foram a óbito apresentaram uma maior frequência de alterações cromossômicas do que os vivos ($\chi^2_1 = 9,90$; $P < 0,01$). Também, o número de pacientes com até duas e com 3 ou mais alterações cromossômicas não se distribuíu igualmente nos que foram a óbito (4 e 9, respectivamente) e nos vivos (16 e 7, respectivamente) ($\chi^2_1 = 22,46$; $P < 0,001$). Observou-se que o valor do χ^2 parcial (15,13), representando 67% do valor do χ^2 total, ocorreu nos pacientes que foram a óbito com 3 ou mais alterações.

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS NOS PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO

C	NUMÉRICAS							ESTRUTURAIS				
	M	M/TP	T	T/TP	TP	TP/Total N	TP/TG	n	n/TG	n/Total E	TG	TG/Total
1	-	-	1	100	1	2	7	13	93	30,95	14	15,21
2	-	-	2	100	2	4	67	1	33	2,39	3	3,26
3	1	50	1	50	2	4	67	1	33	2,39	3	3,26
4	-	-	1	100	1	2	100	-	-	-	1	1,08
5	1	100	-	-	1	2	14	6	86	14,29	7	7,6
6	-	-	1	100	1	2	17	5	83	11,9	6	6,52
7	4	80	1	20	5	10	71	2	29	4,77	7	7,6
8	2	67	1	33	3	6	75	1	25	2,39	4	4,34
9	2	67	1	33	3	6	75	1	25	2,39	4	4,34
10	2	67	1	33	3	6	100	-	-	-	3	3,26
11	2	67	1	33	3	6	60	2	40	4,77	5	5,43
12	-	-	2	100	2	4	50	2	50	4,77	4	4,34
13	2	67	1	33	3	6	75	1	25	2,39	4	4,34
14	2	67	1	33	3	6	100	-	-	-	3	3,26
15	-	-	1	100	1	2	100	-	-	-	1	1,08
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	2	67	1	33	3	6	75	1	25	2,39	4	4,34
18	1	50	1	50	2	4	100	-	-	-	2	2,17
19	-	-	1	100	1	2	33	2	67	4,77	3	3,26
20	2	100	-	-	2	4	67	1	33	2,39	3	3,26
21	2	67	1	33	3	6	100	-	-	-	3	3,26
22	2	67	1	33	3	6	100	-	-	-	3	3,26
X	1	50	1	50	2	4	67	1	33	2,39	3	3,26
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mar	-	-	-	-	-	-	-	2	100	4,77	2	2,17
Total	28	56	22	44	50			42			92	
F(%)	30,43%		23,91%		54,35%			45,65%				

NOTA: C = cromossomo; M = monossomias; T = trissomias; TP = total parcial; n = número de alterações estruturais; TG = total geral; Total N = total alterações numéricas; Total E = total alterações estruturais.

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS NOS PACIENTES VIVOS

C	NUMÉRICAS					ESTRUTURAIS				
	M	T	TP	TP/Total N	TP/TG	n	n/TG	n/Total E	TG	TG/Total
1	-	2	2	5,88	29	5	71	25	7	12,96
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	1	1	2,94	50	1	50	5	2	3,7
4	-	-	-	-	-	1	100	5	1	1,85
5	-	1	1	2,94	50	1	50	5	2	3,7
6	2	-	2	5,88	67	1	33	5	3	5,55
7	-	-	-	-	-	2	100	10	2	3,7
8	2	-	2	5,88	67	1	33	5	3	5,55
9	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
10	-	-	-	-	-	1	100	5	1	1,85
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
13	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
14	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
15	5	-	5	14,7	71	2	29	10	7	12,96
16	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
17	1	-	1	2,94	33	2	67	10	3	5,55
18	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
19	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
20	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
21	2	-	2	5,88	100	-	-	-	2	3,7
22	7	-	7	20,58	100	-	-	-	7	12,96
X	2	-	2	5,88	100	-	-	-	2	3,7
Y	1	-	1	2,94	100	-	-	-	1	1,85
mar	-	-	-	-	-	3	100	15	3	5,55
Total	30	4	34			20			54	
%	88,23%	11,77%	62,96%			37,04%				

NOTA: C = cromossomo; M = monossomias; T = trissomias; TP = total parcial; n = número de alterações estruturais; TG = total geral; Total N = total alterações numéricas; Total E = total alterações estruturais.

6 DISCUSSÃO

A instabilidade cromossômica é uma característica de doenças designadas no seu conjunto de síndromes de quebras cromossômicas ou doenças de reparo de DNA. São caracterizadas pelo aumento da frequência de quebras e trocas cromossômicas que ocorrem espontaneamente ou quando expostas aos agentes que causam danos ao DNA. Em geral, são autossômicas recessivas e apresentam uma tendência aumentada em desenvolver malignidades. A Anemia de Fanconi é caracterizada por anormalidades somáticas, falência da medula óssea e susceptibilidade ao câncer. A hipersensibilidade dos linfócitos AF aos agentes alquilantes, identificando os pacientes AF, possibilita o diagnóstico, através do teste de quebras cromossômicas, utilizando o diepoxibutano (DEB) ou a mitomicina C (MMC) (BAKHSI et al., 2006).

O teste diagnóstico de sensibilidade ao DEB é amplamente utilizado, e desde sua descrição em 1976 por Auerbach e Wolman, permanece como consenso, para a definição diagnóstica da AF. O desenvolvimento de outras técnicas, para o diagnóstico, como por exemplo, a análise de mutações já conhecidas na AF, ainda está em fase experimental e são utilizadas atualmente somente como complemento do diagnóstico (PEARSON et al., 2001).

Os efeitos deletérios da fragilidade cromossômica na evolução hematológica da doença, observada pelas alterações cromossômicas espontâneas, têm sido estudado, pela localização destas regiões em sítios frágeis, oncogenes e pontos de quebras envolvidos em rearranjos já descritos no câncer, particularmente nas leucemias (FUNDIA; GORLA.; LARRIPA, 1994). A falência da medula óssea caracterizada pela redução da produção efetiva de eritrócitos, granulócitos e plaquetas maduras leva a uma pancitopenia no sangue periférico. Estas doenças podem ser adquiridas, herdadas (mas não necessariamente presentes no nascimento) ou congênitas (presentes no nascimento). A Anemia de Fanconi é a pancitopenia constitucional melhor conhecida, que pode apresentar tardiamente as manifestações hematológicas, as quais, na

grande maioria das vezes, evoluem para neoplasias hematológicas benignas ou malignas (D'ANDREA; FORD, 2004).

A relevância das alterações cromossômicas clonais em células da medula óssea de pacientes AF é controversa. Alter (1993) relatou que embora os pacientes apresentem alterações clonais, o quadro clínico permanece estável, não progredindo para doenças malignas. Outros autores admitem que um clone anormal é o primeiro passo na progressão para mielodisplasias, ou para leucemia mielóide aguda e também admitem que a ocorrência de alterações cromossômicas clonais possa indicar uma fase mais agressiva da própria doença (AUERBACH; ALLEN, 1991; BERGER; JONVEAUX, 1996).

O estudo citogenético de células da medula óssea de pacientes AF é de importância não só para o estabelecimento mais efetivo de uma relação entre determinadas alterações e a doença de interesse diagnóstico, como também para contribuir para o melhor conhecimento do significado das mesmas na progressão para doenças malignas, de importância para o diagnóstico e prognóstico das mesmas, e metodologicamente por se constituir em uma abordagem inicial capaz de indicar a localização cromossômica de genes envolvidos na gênese e progressão da doença.

Neste trabalho, analisamos citogeneticamente células da medula óssea de 130 pacientes portadores da AF, após confirmação do diagnóstico pelo teste do DEB. Destes, 75 (57,69%) pacientes não apresentaram anormalidades cromossômicas clonais e 55 (42,31%) apresentaram. Esta frequência está de acordo com os dados da literatura, que descrevem a frequência das alterações cromossômicas clonais em células da medula óssea em torno de 40% dos pacientes com AF (ALTER et al., 2000).

As alterações cromossômicas clonais não ocorreram ao acaso em todos os cromossomos do genoma ($\chi^2_{23}=1.160,01$; $P<0,001$). A não casualidade da ocorrência de alterações cromossômicas clonais é um fato estabelecido em doenças hematológicas (HEIM; MITELMAN, 1995), o que determina que o estudo das mesmas seja obrigatório como auxiliar diagnóstico, com repercussões terapêuticas e prognósticas.

Informações sobre as alterações cromossômicas (tanto através da citogenética clássica como molecular) em células da medula óssea de pacientes AF, são relativamente pouco freqüentes quando comparadas com as de outras doenças hematológicas e, em geral, de neoplasias de tecidos sólidos.

O cromossomo 1 foi o mais frequentemente envolvido nas alterações cromossômicas em nossa análise. Material adicional em ambos os braços do cromossomo 1 (principalmente duplicações em 1q) tem sido descrito tanto no diagnóstico da AF como em estágios pré SMD ou LMA. Duplicações envolvendo o braço longo do cromossomo 1, embora freqüentes em pacientes AF, são descritas em poucos trabalhos, em geral de casos isolados. Neste trabalho, observamos duplicação, em ambos os braços do cromossomo 1 (126=62% das 203 alterações estruturais deste cromossomo) sendo mais freqüentes as do braço longo, identificadas em 4 (7,3%) dos 55 pacientes com alterações cromossômicas, representando 88 (43,34%) das duplicações neste cromossomo. As bandas cromossômicas envolvidas nas duplicações foram: 1q11, 1q12, 1q22 e 1q23. Dos pacientes com alterações estruturais em 1q, um (1,82%) evoluiu para SMD (73), outro para LMA (47) e outros três apresentaram aplasia medular (83, 99, 12).

Rearranjos cromossômicos nas bandas 1q21-q23, onde está localizado o gene *FCGR2B*, são freqüentes em alterações observadas em malignidades hematológicas. São identificados durante evolução tumoral e com outras alterações cromossômicas como as que envolvem os genes *BCL2* (18q21) e o gene *MYC* (8q24), estes últimos têm papel importante na progressão tumoral. Callanan et al. (2000) analisaram linfomas foliculares com quebras cromossômicas em 1q21-q23 e identificaram três casos com a $t(14;18)(q32;q21)$ que eram acompanhados de uma translocação balanceada $t(1;22)(q22;q11)$. A clonagem molecular de uma linhagem celular derivada de um destes casos e o mapeamento por FISH identificaram o gene *FCGR2B*, que codifica uma proteína imunoreceptora. Os mesmos autores demonstraram a super-expressão do produto gênico como a principal consequência da $t(1;22)$ devido à justaposição do gene com a cadeia lambda da Imunoglobulina, indicando que este gene pode ser

importante na progressão do linfoma folicular e, por analogia, em outras neoplasias hematológicas.

Na revisão de 58 casos realizada por Berger e Jonveaux (1996), 25 (43,1%) pacientes apresentavam alterações no cromossomo 1, com quebras, frequentemente localizadas em 1p36, 1q12 e em 1q21 (cada uma em seis casos); sete envolviam duplicações/triplicações em 1q. Alter et al. (2000) descreveram, entre os 41 casos analisados, 3 (7,32%) com duplicações do braço longo do cromossomo 1 envolvendo as bandas 1q12, 1q21, e 1q24, e todos evoluíram para SMD.

Babu Rao et al. (2001) descreveram em células da medula óssea de um paciente de 16 anos de idade o cariótipo 46,XY,dup(1)(q21q32),add(11)(q23) em 60% das células analisadas.

Em um estudo prévio do nosso grupo, Oliveira et al. (2002) analisaram células da medula óssea de um paciente com AF que apresentou dois cariótipos distintos: 46,XY,dup(1)(q21q42) na primeira amostra, em 10 das 20 células analisadas, e 46,XY,del(1)(q32) em duas das 40 células analisadas em uma amostra coletada, sete meses após o paciente ter desenvolvido LMA. Esta deleção do cromossomo 1 ainda não havia sido descrita na literatura. Em pacientes com AF não são raras as descrições da não detecção de um clone previamente identificado ou o aparecimento de novos clones relacionados ou não com os primeiros descritos (ALTER et al., 2000). Estes achados podem ser devidos a problemas metodológicos uma vez que nos estudos citogenéticos de células da medula óssea, através do bandeamento GTG, por exemplo, em geral, 20 a 30 metáfases são analisadas, não se detectando clones aberrantes que possam ter uma menor frequência (MAAREK et al., 1996). Também pode ocorrer que num determinado momento a medula óssea contenha uma população de células originadas de uma pequena linhagem que é substituída em períodos subsequentes por outras populações celulares sem alterações ou com clones diferentes, originadas de outras linhagens (BERGER; BUSSEL; SCHENMETZLERLER, 1977; ALTER et al., 2000).

A triplicação no braço longo do cromossomo 1 foi a segunda alteração mais frequente na nossa amostra, encontrada em 4 (7,27%) dos 55 pacientes com

alterações cromossômicas e representa 21,18% das alterações encontradas neste cromossomo. Esta alteração já foi descrita por Ferro et al. (2001), em células da medula óssea de uma paciente de 38 anos de idade com AF. Além da triplicação 1(q12-21q31-q32), estes autores observaram add(11)(p15) e add(21)(q22). Para esclarecer a origem deste material adicional nos cromossomos 11 e 21, foi realizado FISH utilizando sonda *painting* para o cromossomo 3, identificando-se o cariótipo: 46,XY, trp(1)(q12-21q31-q32), der(11)t(3;11)(?;p15), der(21)t(3;21)(?;q22)[21].

A duplicação do braço curto foi observada em 3 (5,45%) dos 55 pacientes com alterações cromossômicas, em 30 (14,78%) células analisadas. As bandas cromossômicas envolvidas foram 1p11-p33. Na literatura disponível, esta duplicação tem sido pouco relatada. Thurston et al. (1999) analisaram através da citogenética clássica, 13 amostras da medula óssea de nove pacientes AF, dos quais, um apresentou cariótipo 46,XX,dup(1)(p22p34),add(18)(p11.3), o qual evoluiu para SMD, nos demais observou-se cariótipo normal.

Na região 1p11-p21 está localizado o gene *RHOC* (*Ras homolog gene family, member C*). A super-família RAS compreende um grande grupo de proteínas envolvidas em transdução de sinal, proliferação e regulação de actina do citoesqueleto. Madaule e Axel (1985) identificaram uma nova família de gene RAS, constituída pelos genes *RHO*, cujos produtos apresentam várias propriedades em comum, os autores sugeriram que proteínas destas famílias podem compartilhar funções em diferentes vias.

Observamos também a presença de material adicional no braço curto do cromossomo 1 em dois (3,64%) dos 55 pacientes com alterações cromossômicas, e representa 3,94% das alterações encontradas neste cromossomo. As bandas envolvidas nesta alteração foram: 1p22 e 1p36. Devido a dificuldades metodológicas, como a má qualidade das células analisadas, não foi possível esclarecer a origem deste material adicional, que pode ser a duplicação do segmento do braço curto deste cromossomo. Para a elucidação da origem deste material, seria necessário o uso de técnicas de citogenética molecular, como FISH, por exemplo, não disponível no momento da análise.

Na região 1p36 está localizado o gene *TAp73*, homólogo ao *TP53*, conhecido por estar envolvido na apoptose celular. Seu produto atua na resposta ao stress oxidativo, sendo um efetor à jusante na via do *TP53* (WANG et al., 2007). Na região 1p22, está localizado o gene *GFI1* (fator de crescimento independente). Zeng et al. (2004) demonstraram que este gene é diferentemente expressado em células tronco hematopoéticas, e que sua perda resulta em uma alteração significativa na produção nas células tronco e precursoras.

Três translocações envolvendo o cromossomo 1 foram identificadas em nossa amostra, em 3 (5,45%) dos 55 pacientes com alterações estruturais: $t(1;5)(p36;q23)$ (3=1,47%), $t(1;12)(q21q13)$ (20=9,85%) e a $t(1;15)(q10q10)$ (9= 4,43%). A $t(1;5)$ foi também identificada em um paciente por Maarek et al. (1996) em um paciente (8,33%) dos 12 analisados, porém o ponto de quebra no cromossomo 5q31, diferiu do nosso estudo, o qual foi 5q23.

O cromossomo 5, foi o segundo mais envolvido em alterações cromossômicas em nossa análise. De todos os pacientes com alteração no cromossomo 5, somente um (n.73) evoluiu para MDS. A deleção no braço longo (5q13-q34) foi a alteração mais freqüente, observada em 2 (3,63%) dos 55 pacientes com alterações, correspondendo a 30,88% das alterações envolvendo este cromossomo. Somente um trabalho na literatura envolvendo o cromossomo 5 em AF foi encontrado, onde Huret et al. (1988) descreveram um paciente com a deleção do braço longo do cromossomo 5, com evolução clonal envolvendo os cromossomos 1, 2 e 6. Na região 5q13-q34 está localizado o gene *RASA1*. A família RAS está envolvida no controle da proliferação e diferenciação celular.

A translocação $t(5;5)(p13;q35)$ foi a segunda alteração estrutural mais freqüente neste cromossomo (20=29,41%), observada em um (1,82%) dos 55 pacientes com alterações cromossômicas. Maarek et al. (1996), descreveram um caso com translocação $t(1;5)(p36;q31)$, porém esta translocação difere no ponto de quebra no cromossomo 5.

Translocações envolvendo o cromossomo 5 foram descritas na literatura, porém, na maioria, são relatos de casos isolados em AF: Bourgeois e Hill (1977), analisaram 150 células de um paciente que evoluiu para LMA e em todas foi observada a $t(5;18)$; Alter et al. (2000) descreveram outro caso com translocação envolvendo o 5, a $t(5;22)(q?;q?)$ em 20 células analisadas e com evolução deste paciente para LMA.

A duplicação do braço longo do cromossomo 5 foi observada em um (1,82%) dos 55 pacientes com alterações, correspondendo a 20,58% das alterações neste cromossomo, seguida da deleção do braço curto, $del(5p)$ em um (1,82%) paciente, correspondendo a 10,29% das alterações e a duplicação do braço curto, $dup(5p)$ em um (1,82%) paciente, correspondendo a 4,41% das alterações envolvendo o 5.

Entre as alterações numéricas envolvendo o cromossomo 5 observou-se que estas ocorreram em somente 2 (3,63%) dos 55 pacientes com alterações: um com trissomia e outro com monossomia (2,37% do total de 464 alterações numéricas); Berger et al. (1993) descreveram dois casos com alteração numérica envolvendo este cromossomo, um com trissomia em 25 (96,15%) das células, e o segundo com monossomia observada em 12 (60%) das células analisadas.

O cromossomo 7 foi o terceiro (5,4%) mais frequentemente envolvido em alterações citogenéticas na nossa amostra. Detectou-se deleções nas bandas 7q22, 7q31, 7q32, 7q35. Na região 7q22 estão localizados os genes *PRKAR2B* e *MET* que codificam duas proteínas com função tirosina-quinase, *DRA* que produz uma proteína transportadora de sulfato e o gene *CAPZA2* que codifica uma proteína envolvida no metabolismo dos filamentos de actina (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=176912>). Na região 7q31 está localizado o gene *ING3*, fator de crescimento 3, pertencente a uma família de genes responsáveis por fatores de transcrição e proteínas que regulam a estrutura da cromatina. A perda da heteroziguidade (LOH) em 7q31 que tem sido frequentemente detectada em cânceres humanos, sugere a existência de um gene supressor de tumor nesta região (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=607493>). Nas demais regiões,

7q32 e 7q35 não há descrição na literatura de genes relevantes na Anemia de Fanconi, nem em neoplasias malignas.

A descrição das alterações cromossômicas do cromossomo 7 não indicam de forma consistente a sua importância na etiologia e no desenvolvimento da AF, porém, vários estudos (JOHANSSON.; MERTENS; MITELMAN, 1993; Le BEAU et al., 1996; FISCHER et al., 1997; LIANG et al., 1998; TOSI et al., 1999) sugerem que deleções neste cromossomo, principalmente as que envolvem o braço longo contribuem para a transformação leucemogênica ou outras malignidades. A detecção de deleções no braço longo do cromossomo 7, sugere que no mesmo estejam localizados genes supressores tumorais (FISCHER et al., 1997; JOHNSON; COTTER, 1997), mais especificamente em 7q11, 7q22 e 7q31 (LIANG et al., 1998).

Na região 7q11 está localizado o gene *RFC2* (*Replication factor C*). A proteína BCRA1 é parte de um grande complexo de subunidades protéicas, chamado BASC, o qual tem função de supressores de tumor, identificando danos ao DNA e de transdutores de sinais. Entre as proteínas de reparo deste complexo estão a ATM, BLM, MSH2, MSH6, MLH1, RAD50, MRE11, NBS1, RFC1, RFC2 e RFC4 (WANG et al., 2000). Estes autores sugeriram que o BASC pode servir como um sensor de estruturas de DNA anormais e/ou ainda como um regulador pós-reparo de replicação

Alterações clonais no cromossomo 7 têm sido frequentemente descritas em células da medula óssea de pacientes AF em diferentes estágios da doença incluindo evoluções clínicas para SMD e LMA. A monossomia do cromossomo 7 ou deleções em 7q são anormalidades observadas em desordens mielóides, que se desenvolvem após terapias com agentes alquilantes (SMD/LMA secundárias) (HEIM; MITELMAN, 1995). Clinicamente, estas alterações são associadas a alta susceptibilidade a infecções, resposta pobre a quimioterapia e curto tempo de sobrevida (FISCHER et al., 1997).

Alter et al. (2000) descreveram a deleção em 7q em um paciente com evolução clínica para SMD, em dois períodos distintos: ao diagnóstico no ano de 1997 em 15 (68%%) das 22 células analisadas, e no ano seguinte, em 1998,

observada em 3 (30%) das 10 células analisadas. Maarek et al. (1996) descreveram em um paciente com evolução clínica para SMD a deleção em 7q em 14(100%) das células analisadas. Berger et al. (1980) descreveram um caso com deleção 7q em 63 (100%) das células analisadas, com evolução para LMA-M6.

A frequência das alterações numéricas envolvendo o cromossomo 7 na nossa amostra foi 3,87% (18 alterações) do total das 464 alterações numéricas observadas, sendo que as monossomias (83,33%), observadas em 4 (7,27%) dos 55 pacientes com alterações foram mais frequentes que as trissomias (16,66%), observadas em um paciente (2%). As monossomias têm sido descritas na literatura em pacientes AF, com ou sem evolução clínica para neoplasias. Dois dos 12 casos estudados por Maarek et al. (1996) apresentaram a monossomia do 7 como única alteração em 13 (48,14%) das 27 células analisadas, sem evolução clínica para neoplasias, e um paciente, com evolução para SMD, identificaram a monossomia do 7 em 19 (100% das células analisadas). Stivrins et al. (1984), Berger, Le Coniat e Schaison (1993) e Alter et al. (2000), descreveram 4 casos com monossomia do cromossomo 7 também como única alteração em cada paciente, onde todos evoluíram para LMA.

Thurston et al. (1999) analisaram, por FISH, 13 amostras de 9 pacientes com AF, que não apresentaram a monossomia do 7 pela análise citogenética convencional. A monossomia do 7 foi observada em 3,44% dos núcleos interfásicos analisados, sugerindo que esta técnica deva ser utilizada na detecção precoce desta anormalidade, já que a citogenética convencional só analisa células em metáfases. A monossomia do 7 está associada a um prognóstico desfavorável e progressão para leucemia, e sua detecção precoce pode indicar uma intervenção clínica mais efetiva, como o transplante de medula óssea, para prevenir ou retardar a leucemogênese.

A presença de material adicional no braço curto do cromossomo 8, add(8p) foi observada em um (1,82%) paciente, seguida da deleção no braço longo, del(8q)(q22), observada em um (2%) paciente do total dos 55 pacientes com alterações. Na região 8q22 está localizado o gene *TP53/INP1*, que regula a apoptose

dependente da p53 através da fosforilação da p53 na ser43, servindo de um cofator na ativação desta proteína. O paciente que apresentou a del(8)(q22) evoluiu para SMD.

Não encontramos na literatura nenhum relato de alterações estruturais envolvendo o cromossomo 8 em pacientes AF, somente são descritas alterações numéricas. Standen et al. (1989); Berger, Le Coniat e Schaison (1993) e Alter et al. (2000), descreveram 5 pacientes com alterações numéricas, 4 com monossomia e um com trissomia. Thompson, Standen e Geddes (1991) descreveram em cinco pacientes a trissomia do cromossomo 8, observada em 213 (96,38%) das 221 células analisadas. O único relato na literatura de monossomia do cromossomo 8 foi descrito por Auerbach (1992), em um paciente em evolução para LMA.

No cromossomo 3 observamos duplicação do braço longo em um (1,82%) paciente e a presença de material adicional nesta mesma região, também em um (2%) dos 55 pacientes com alterações. A duplicação do braço longo, dup(3q) foi descrita por Berger, Bussel e Schenmetzlerler (1977) em um paciente que desenvolveu leucemia. Em 1980, estes mesmos autores relataram outro caso com triplicação do braço longo do 3, em 63 (100%) das células analisadas, com posterior evolução clínica para LMA-M6. O paciente número 45 da nossa análise evoluiu para LMA. Das alterações numéricas foram detectadas: 8 (66,67%) foram trissomias e 4 (43,33%) monossomias. Não há relatos na literatura descrevendo alterações numéricas neste cromossomo em pacientes AF.

Tönnies et al. (2003) sugeriram o uso de técnicas de citogenética molecular para detectar trissomias e tetrassomias parciais sutis em 3q. Em seu trabalho estes autores relataram um estudo feito em 53 pacientes com AF, onde 18 (34=72%) destes revelaram trissomias e tetrassomias parciais no braço longo do cromossomo 3, observadas com o uso da técnicas de citogenética molecular, FISH e CHG, indicando uma freqüência elevada de alterações em 3q. As alterações encontradas foram na sua totalidade mosaicos com alterações sutis devido a translocações não balanceadas da região distal 3q com vários outros cromossomos. Em 16 dos 18 pacientes com ganhos em 3q, foram realizadas análises em série pela citogenética convencional, os

autores observaram em todos um considerável aumento de clones com anormalidades em 3q. Estes dados sugerem que ganhos em 3q conferem uma vantagem proliferativa ou um aumento de sobrevida nas células alteradas da medula óssea.

Quatro genes envolvidos em SMD e LMA estão localizados em 3q: *MLF1*, mielodisplasia-leucemia fator 1, *MDS1*, síndrome mielodisplásica associada à seqüência 1, *EVI1*, gene murino mielóide leucemia associado e o gene *EAP*, proteína Epstein-Bar associada (YONEDA-KATO et al., 1996; TESTONI et al., 1999). Tönnies et al. (2003) determinaram a relevância clínica destes achados através da comparação dos dados clínicos e citogenéticos e relataram que há uma vantagem de sobrevida significativa para pacientes sem anormalidades em 3q, e sugeriram um sistema de avaliação de todos os pacientes com AF, através da citogenética molecular para detectar estas alterações, o mais precoce possível, pois no caso de alterações em 3q, a decisão de uma intervenção mais agressiva e precoce é importante, já que estas representam um fator de risco adverso.

No cromossomo 6 as alterações estruturais foram observadas em 7 (12,72%) pacientes dos 55 com alterações, sendo que a deleção no braço longo do 6, del(6q) foi a mais freqüente, sendo observada em 6 (10,90%) pacientes dos 55 com alterações. Não há trabalhos na literatura descrevendo esta alteração em pacientes AF, somente estão descritas deleções envolvendo o braço curto, del(6p) (ALTER et al., 2000; MAAREK et al., 1996). Outros dois trabalhos relatam a translocação, em dois pacientes, entre os cromossomos 1 e 6, t(1;6) e evolução para LMA (HURET et al., 1988; FERTI et al., 1996). No nosso trabalho observamos a translocação envolvendo os cromossomos 6 e 17, t(6;17) em um paciente (2%).

A presença de material adicional no braço curto do cromossomo 6, add(6p) foi observada em um (1,82%) paciente dos 55 com alterações na nossa amostra. Na região 6p22 está localizado o gene *E2F3* (*E2F transcription factor 3*), o qual é um membro da família E2F de fatores de transcrição, e sua transcrição é induzida pelo gene *MYC*. No estudo de Leone et al. (2001), utilizando fibroblastos embrionários de ratos, com os genes da família E2F deletados individualmente, a habilidade do *MYC*

em induzir a fase S foi prejudicada na ausência de E2F2 e E2F3, mas não na ausência de E2F1 e E2F4. Em constraste, a habilidade do MYC induzir a apoptose foi notavelmente reduzida em células deletadas para E2F1 mas não em E2F2 ou E2F3. Os autores propuseram que a indução das atividades específicas E2F é um componente essencial da via MYC que controla a proliferação celular.

Na região 6q21 está localizado o gene *TCBA1* (*T-cell lymphoma breakpoint-associated target 1*), o qual tem sido descrito rearranjado em células de pacientes com linfoma e leucemia. Yue et al. (2006) descreveram a formação de genes de fusão em leucemias envolvendo o *TCBA1*, sugerindo um papel importante deste gene na tumorigênese. Não há relatos descrevendo alterações numéricas neste cromossomo na literatura.

A deleção em del(12p) observada em 1 (1,82%) paciente dos 55 com alterações, foi descrita por Maarek et al. (1996) em 9 células de um paciente que desenvolveu SMD. Alter et al. (2000) também a descreveram em 21 células de um paciente que desenvolveu SMD e evoluiu para LMA. Na região 12p12 está localizado o gene *BCLG* (*apoptosis regulator BCGL*) o qual faz parte da família de genes *BCL2*. Guo, Godzik e Reed (2001) demonstraram que a superexpressão deste gene e de suas variantes induzem à apoptose celular. Não há relatos na literatura descrevendo alterações numéricas do cromossomo 12 em pacientes AF.

Observamos em um (1,82%) paciente dos 55 com alterações, a presença de um cromossomo derivativo da translocação t(1;12), der(12)t(1;12). Esta alteração ainda não foi descrita na literatura em pacientes AF.

A presença de material adicional no braço longo do cromossomo 15, add(15q) foi observada em 1 (2%) paciente dos 55 com alterações. Na região 15q26 está localizado o gene *MDS1*, o qual tem sido descrito envolvido em translocações cromossômicas em leucemias (FEARS et al., 1996). A presença do cromossomo derivativo da translocação t(1;15), foi observada em 1 (2%) paciente dos 55 com alterações. Não há relatos na literatura de alterações, tanto numéricas quanto estruturais, em pacientes AF envolvendo este cromossomo.

Somente foram observadas alterações numéricas envolvendo os cromossomos 21 e 22 na nossa análise. Alterações do cromossomo 21 foram observadas em 5 (3,84%) dos 130 casos, num total de 50 (5%) das 993 alterações. Na literatura há vários relatos desta alteração como nos trabalhos descritos por Berger, Bussel e Schenmetzlerler (1975), Maarek et al. (1996), Thurston et al. (1999), Alter et al. (2000), que avaliaram um total de 11 casos, dos quais seis (54,55%) apresentaram trissomia, três (27,27%) monossomias e duas eram add(21)(q22). Em apenas dois (18,19%) destes pacientes a análise citogenética foi realizada na fase de SMD e nas demais (81,81%) na fase de AF. Como acontece com o cromossomo 7 as alterações numéricas do cromossomo 21 são frequentes em pacientes AF.

A trissomia do cromossomo 21, depois da do 8, é a alteração autossômica mais comum em LMA e SMD. Embora as implicações prognósticas da trissomia do 21 em desordens mielóides permaneçam inconclusivas, modelos hipotéticos foram desenvolvidos para explicar a contribuição desta alteração na leucemogênese. Admite-se que tenha um efeito na dosagem gênica através da presença de um aumento do número de cópias de certos genes, que conferem um potencial neoplásico pela excessiva proliferação celular (SACCHI, 1992).

Jeandidier et al. (2006) analisaram 107 pacientes com várias doenças hematológicas e anormalidades estruturais adquiridas no braço longo do cromossomo 21. As anormalidades foram subclassificadas em 10 grupos, de acordo com a localização dos pontos de quebra em 21q e pelo tipo de anormalidade. A região 21q22 esteve envolvida em alterações detectadas em 72 pacientes, onze novas translocações envolvendo esta região com as bandas 1q25, 2p21, 2q31, 3p21, 3p23, 4q31 e 6p24 foram observadas. Duplicações, triplicações, amplificações e cromossomos isodividentes também foram observados. Jeandidier et al. (2006) mostrou a distribuição dos pontos de quebra no braço longo do cromossomo 21 em malignidades hematológicas e também a diversidade dos rearranjos envolvendo este cromossomo.

Todas as 51 alterações do cromossomo 22, observadas em 9 (6,92%) dos 130 casos, foram numéricas. Alterações envolvendo o cromossomo 22 em AF são

descritas em menor frequência do que as do cromossomo 21. Somente Maarek et al. (1996) e Thurston et al. (1999) observaram dois casos com trissomia do cromossomo 22, sem evolução clínica para SMD/LMA. Tanto as trissomias quanto as monossomias do cromossomo 22 são descritas com frequência elevada em tumores de tecidos sólidos, como o câncer de mama. Pandis et al. (1998) não esclarecem se esta frequência aumentada significa uma função específica para estas alterações ou se é meramente uma das manifestações de um aumento geral da complexidade cariotípica.

No cromossomo X, as alterações estruturais foram observadas em 1 (1,82%) dos 55 pacientes com alterações. A $\text{del}(X)(q11)$ ainda não foi descrita em pacientes AF, somente alterações envolvendo o braço curto estão descritas: Tootian et al. (2006), analisaram um paciente com $\text{add}(X)(p?)$ e Alter et al. (2000), descreveram a presença de um cromossomo derivativo, $\text{der}(X)t(X;3)(p22;q13)$, observado em 64 células analisadas, em 2 exames distintos e com evolução clínica para MDS. Alterações numéricas foram observadas em nossa análise, sendo que as monossomias (20=57%) foram mais frequentes que as trissomias (15=43%). Alter et al. (2000) descreveram um caso com trissomia deste cromossomo em um paciente AF, nas 70 células analisadas, seguidas das trissomias de 8 e do 21, com evolução clínica para SMD.

Alterações envolvendo os cromossomos 9 (2,2%), 13 (2,9%), 17 (2,6%), 19 (2,1%) e 20 (2,7%) foram observados respectivamente, em 5 (9%), 5 (9%), 6 (10%), 4 (7%) e 6 (10%) dos 55 pacientes com alterações. Alguns trabalhos descreveram o envolvimento destes cromossomos em pacientes AF: Carbone et al. (1984) analisaram 1 caso que apresentou trissomia do cromossomo 9 e a $t(17;?)(p12;?)$ o qual desenvolveu aplasia medular; Maarek et al. (1996) analisaram 20 pacientes e 6 apresentaram as seguintes alterações: $\text{del}(9)(q11)$ (SMD), trissomia do 13 (2 casos-SMD), $\text{add}(13)(q34)$, $\text{del}(13)(q21-q22)$, monossomia do 17 (SMD), $\text{add}(17)(q25)$ (SMD), $\text{del}(17)(q22)$ e monossomia do cromossomo 20. O gene *TP53* localizado em 17p13, atua em resposta a diversos estresses celulares regulando genes que induzem o atraso no ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA e alterações no metabolismo. A atividade da proteína p53 é geralmente perdida nos tumores humanos, seja por mutação do

gene, seja por perda da sinalização da via de reparo da qual a proteína participa (VOUSDEN; LANE, 2007).

Alterações envolvendo os cromossomos 2 (1,9%), 4 (0,6%), 10 (1,5%), 11(1,5%), 14 (1,9%), 16 (0,4%), 18 (1,2%) e Y (0,4%) foram observadas respectivamente, em 3 (5,5%), 2 (3,6%), 4 (7%), 4 (7%), 4 (7%), um (1,82%), 3 (5,5%) e um (1,82%) dos 55 pacientes com alterações. Alguns trabalhos na literatura descreveram alterações nestes cromossomos em pacientes AF: Berger et al. (1980) analisaram dois pacientes e um deles apresentou a dup(2)(q24q36) em 39 células analisadas na fase de pré-leucemia; Carbone et al. (1984) descreveram um caso com trissomia do cromossomo 16; Huret et al. (1988) analisaram um paciente com +der(2)t(1;2) em 5 células e este paciente evoluiu para anemia refratária; Thompson et al. (1991) descreveram um caso com monossomia do Y em 3 células analisadas; Maarek et al. (1996) analisaram 20 pacientes e nove apresentaram as seguintes alterações: der(11)t(1;11), t(1;2)(p33;q36), der(18)t(18;?), t(7;18)(q31;p11) que desenvolveu LMA, add(10)(p15), add(4)(q35), der(18)t(12;18) que desenvolveu SMD, add(2)(q37) que desenvolveu SMD e monossomia do Y; Alter et al. (2000) analisaram 16 casos e sete apresentaram as seguintes alterações: add(14)(p11), inv(16)(p11q11), der(2)t(1;2) o qual desenvolveu MDS, der(11)t(1;11), add(2)(q33), del(11)(q21q25) o qual desenvolveu MDS e der(18)t(1;18) que desenvolveu LMA. Sugita et al. (2000) analisaram um paciente com t(11;16)(q23;p13) em 20 células analisadas e evolução para LMA. Babu Rao et al. (2001) analisaram 1 caso com add(11)(q23) com evolução para LMA e Ferro et al. (2001) também analisaram um caso com evolução para SMD, com add(11)(p15) em 21 células analisadas.

Cromossomos marcadores foram observados em 5 (9%) dos 55 pacientes com alterações. Vários trabalhos descreveram a presença de cromossomos marcadores em pacientes AF: Berger et al. (1980) descreveram um paciente com pré-leucemia com marcador em 24 células; Auerbach et al. (1982) analisaram um paciente com 2 marcadores distintos em 11 células já na fase de LMA; Berger, Le Coniat e Schaison (1993) avaliaram um paciente com evolução para LMA com marcador em 13 células;

Maarek et al. (1996) descreveram um paciente com evolução para LMA com marcador em 7 células analisadas; a seguir, estes mesmos autores publicaram a presença de marcadores em dois pacientes, em 52 e 38 células analisadas, respectivamente, sendo que os dois evoluíram para SMD.

Como registramos na página 94 (em resultados), os resultados mais significativos foram confirmados quando analisamos as alterações cromossômicas individualmente comparativamente aos da análise do número total de alterações, indicando mais uma vez a não causalidade de ocorrência das alterações cromossômicas ($\chi^2_{23}=63,81$; $P<0,001$) e o envolvimento preferencial dos mesmos cromossomos (1, 5, 7 e 22) e dos mesmos pacientes (41 e 43) entre os com maior frequência de alterações cromossômicas.

Embora o índice de quebras cromossômicas seja um parâmetro de indiscutível eficiência, como demonstrado por centros hematológicos de reconhecimento internacional, para o diagnóstico de pacientes AF, de acordo com os nossos dados, o mesmo não se caracterizou de relevância com um indicador da evolução clínica e do cariótipo dos pacientes. Não se observou diferenças estatisticamente significantes quando se comparou as médias dos mesmos dos diferentes graus da situação hematológica (apesar do coeficiente de regressão indicar um valor significativo), nos diferentes períodos de tempo em que se realizou o exame de um mesmo paciente, nos pacientes sem e com alterações cromossômicas, nos vivos sem e com alterações cromossômicas, nos sem e com alterações cromossômicas que foram a óbito e nos pacientes com alterações cromossômicas, vivos e que foram a óbito.

Como mencionado acima, a análise do índice de quebras cromossômicas em função do grau de situação hematológica, indicou que as variações deste índice dependem do grau de situação hematológica ($b=3,03\pm 0,42$. $t=3,10$; $P<0,01$). Considerando este resultado, foi de interesse avaliar se os valores deste índice poderiam se constituir num marcador da evolução clínica dos pacientes. Para isto, a média seria o valor mais favorável a ser considerado. Obviamente que a comparação entre as mesmas para os nossos dados seria mais apropriada, estatisticamente, pela análise

da variância, entretanto o teste de Bartlett não indicou um valor significativo ($\chi^2_{2\text{corr}}=7,30;P<0,05$) entre os quadrados médios das três amostras (graus I, II e III). Embora o teste F (razão entre os quadrados médios das amostras) tenha apresentado valores estatisticamente significantes entre os mesmos dos graus IIIxI e IIxI, na análise (pelo teste *t*) das diferenças entre as médias destas amostras, não se observou valores estatisticamente significantes.

O grau II de situação hematológica foi mais freqüente nos pacientes vivos, com ou sem alterações cromossômicas. Nos pacientes que foram a óbito, tanto com ou sem alterações cromossômicas, o grau III foi o mais freqüente. Nos vivos com alterações cromossômicas o grau II foi o mais freqüente. Embora as comparações, nos grupos acima, das distribuições do número de pacientes com diferentes graus de situação hematológica, não tenham apresentado valores estatisticamente significantes, o grau mais elevado (III), indicativo de situação hematológica mais desfavorável foi, como o esperado, mais freqüente nos pacientes que foram a óbito, independente da presença ou ausência de alterações cromossômicas. Este resultado, na nossa amostra, fica bem caracterizado quando se compara a distribuição do número de pacientes com os diferentes graus (I, II e III) entre os que foram a óbito (3,16 e 25, respectivamente) e os vivos (12, 58 e 16, respectivamente), independente de se com ou sem alterações cromossômicas. O teste do Qui ao quadrado indicou um valor de 19,71; $P<0,001$. Os χ^2 parciais nos pacientes com grau III representaram 68% (13,47/19,71) do χ^2 total demonstrando excesso e falta, conforme o esperado, de pacientes com este grau nos que foram a óbito e nos vivos, respectivamente.

Com referência à idade dos pacientes, observou-se que os com alterações cromossômicas que foram a óbito apresentavam, ao diagnóstico, em média, idade maior, com significância estatística, do que a dos pacientes que também foram a óbito, mas sem alterações cromossômicas e a dos vivos com alterações cromossômicas. O mesmo foi observado quando se comparou a idade média dos 55 (incluindo 22 que foram a óbito) pacientes que apresentaram alterações cromossômicas com a dos 75 (incluindo 22 que foram a óbito) pacientes sem alterações cromossômicas.

Portanto, estes dados são indicativos que os óbitos com alterações cromossômicas estão associados a uma maior idade média dos pacientes ao diagnóstico. Enfatize-se que a maior diferença (6,18 anos) entre as idades médias dos grupos comparados ocorreu entre a dos pacientes que foram a óbito com alterações cromossômicas ($14,59 \pm 6,94$) e a dos pacientes que foram a óbito sem alterações cromossômicas ($8,41 \pm 4,25$) e a destes foi semelhante a dos 53 pacientes vivos sem alterações cromossômicas ($8,87 \pm 5,20$) ($t=0,37; P>0,70$). Dados da literatura indicam que pacientes AF apresentam um risco aumentado de desenvolver neoplasias malignas, principalmente na segunda década de vida, freqüentemente LMA (D'ANDREA; GROMPE, 1997) e, usualmente, com clones cariotipicamente anormais em células da medula óssea (AUERBACH, 1992; BUTTURINI et al., 1994). Os nossos dados demonstram que tanto as alterações numéricas como as estruturais e o total de alterações cromossômicas foram mais freqüentes (com diferenças estatisticamente significantes) nos pacientes que foram a óbito (idade média= $14,59 \pm 6,94$ anos) do que nos vivos (idade média= $9,15 \pm 4,92$ anos), corroborando os dados já descritos.

As alterações cromossômicas, numéricas e estruturais, foram mais freqüentes, com diferenças estatisticamente significantes, nos pacientes que foram a óbito do que nos vivos. Entre as estruturais, as do cromossomo 1 foram as mais freqüentes em ambos os grupos e das numéricas as dos cromossomos 21 e 22 foram as mais freqüentes, nos pacientes que foram a óbito e nos vivos, respectivamente. Estes resultados foram confirmados quando analisamos as alterações cromossômicas estruturais individualmente, enquanto que entre as numéricas, as dos cromossomos 7 e 22 foram as mais freqüentes, nos pacientes que foram a óbito e nos vivos respectivamente. *Análises sobre a ocorrência destas alterações em pacientes AF já foram apresentadas no início desta Discussão.*

Dos 130 pacientes AF analisados neste trabalho, sete (5,38%) evoluíram para SMD ou LMA. Todos apresentaram alterações cromossômicas, sendo que seis (85,7%) foram a óbito, quatro (67%) com SMD e dois (33%) com LMA. Dos sete, o único (14,3%) paciente vivo que apresentou alteração cromossômica evoluiu para SMD.

Portanto, fica evidente, de acordo com as informações apresentadas neste trabalho, que pacientes AF com alterações cromossômicas apresentam o pior prognóstico. Dos seis pacientes a óbito acima referidos, o n. 13 com SMD e óbito aos 25 meses após o diagnóstico, 24 anos de idade, IQ de 5,40 e situação hematológica grau II, apresentou somente alterações estruturais nos cromossomos 1 e 6; o paciente n. 41 com SMD e óbito aos 33 meses, 12 anos de idade, IQ de 8,46 e situação hematológica grau I, foi o que apresentou, entre os óbitos, a segunda maior frequência de alterações numéricas ($68/263=25,86\%$), principalmente nos cromossomos 3, 7 e 11, não apresentando alterações estruturais; o paciente n. 43 com SMD e óbito aos 16 meses, 31 anos de idade, IQ de 7,92, situação hematológica grau II, foi o que mais apresentou alterações numéricas ($78/263=29,66\%$) entre os óbitos, principalmente monossomias do cromossomo 21, sendo que as estruturais ocorreram no cromossomo 8, além de 11 cromossomos marcadores; o paciente n. 45 com LMA e óbito aos 52 meses, com 14 anos de idade, IQ de 1,24 e situação hematológica grau III apresentou alterações numéricas somente no cromossomo 11 e estruturais nos cromossomos 3 e 19.; o paciente n. 47 com LMA e óbito aos 17 meses, com 16 anos de idade, IQ de 15,33, situação hematológica grau III, não apresentou alterações numéricas e as estruturais foram observadas somente no cromossomo 1; o paciente n. 73 com SMD e óbito aos 28 meses, com 29 anos de idade, IQ de 1,80, situação hematológica grau II apresentou somente alterações estruturais nos cromossomos 1 e 5 e o paciente n. 104, único vivo dos sete que desenvolveram MDS ou LMA, com 5 anos de idade. IQ de 3,32, situação hematológica grau II, apresentou a maior frequência ($56/201=27,86\%$) de alterações numéricas entre os vivos e não apresentou alterações estruturais. As informações acima dos seis pacientes com SMD ou LMA que foram a óbito, foram comparadas com as dos 16 pacientes com alterações cromossômicas que também foram a óbito mas sem terem desenvolvido MDS ou LMA. Os meses após o diagnóstico em que os pacientes foram a óbito, a idade do paciente no óbito e o índice de quebras cromossômicas foram, em média, superiores nos pacientes com MDS ou LMA, porém com significância estatística somente para a idade

do paciente no óbito ($21,00 \pm 8,10$ e $12,19 \pm 5,44$. $t = 2,96$; $P < 0,01$). Este resultado está de acordo com apresentado acima, enfatizando que os pacientes AF com maior idade ao diagnóstico apresentam um pior prognóstico. O grau III de situação hematológica foi o mais freqüente nos pacientes sem SMD ou LMA (56%). Em um dos quatro pacientes que apresentou MDS detectou-se monossomia do cromossomo 7, uma das quatro alterações cromossômicas (monossomias dos cromossomos 5 e 7 e deleções no braço longo destes cromossomos) mais freqüentemente descritas tanto em pacientes adultos como pediátricos com SMD (BORGONOVO et al., 2005). Deve-se considerar, no entanto, que a análise carotípica de todos os pacientes, incluído os com SMD, foi realizada ao diagnóstico quando ainda não se tinha indicação da evolução clínica.

7 CONCLUSÕES

As alterações cromossômicas clonais dos cromossomos 1, 5 e 7 estiveram entre as cinco mais freqüentemente observadas neste trabalho. Esta informação está de acordo com os resultados descritos na literatura em pacientes AF, analisados nesta fase ou com evolução clínica para SMD ou LMA.

O índice de quebras cromossômicas não se caracterizou como um parâmetro indicativo de evolução clínica dos pacientes.

A situação hematológica grau III, indicativo de situação hematológica mais desfavorável, foi mais freqüente nos pacientes que foram a óbito, independente da presença ou ausência de alterações cromossômicas.

A presença de alterações cromossômicas nos pacientes AF é um importante indicativo de pior prognóstico o que pode ser observado por: maior freqüência de alterações clonais nos pacientes que foram a óbito do que nos vivos; idade, em média, mais elevada ao diagnóstico; maior freqüência de mortalidade e menor probabilidade de sobrevida.

Dos 130 pacientes AF analisados neste trabalho, sete (5,38%) evoluíram para MDS ou LMA, todos apresentaram alterações cromossômicas e seis (85,7%) deles foram a óbito. Portanto, fica evidente, de acordo com as informações apresentadas neste trabalho, que pacientes AF com alterações cromossômicas apresentam o pior prognóstico.

REFERÊNCIAS

- ALTAY, C.; ALIKAŞIFOĞLU, M.; KARA, A.; TUNÇBILEK, E.; OZBEK, N.; SCHROEDER-KURTH, T. M. Analysis of 65 Turkish patients with congenital aplastic anemia (Fanconi anemia and non-Fanconi anemia): Hacettepe experience. **Clin Genet**, v.51, n.5, p.296-302, 1997.
- ALTER, B. P. Fanconi Anemia and its variability. **Br J Haematol**, v.85, p.9-14, 1993.
- ALTER, B. P. Bone marrow failure syndromes in children. **Pediatr Clin North Am**, v.49, n.5, p.973-88, 2002.
- ALTER, B. P. Cancer in Fanconi anemia. **Cancer**, v.97, p.425-440, 2003.
- ALTER, B. P.; CARUSO, J. P.; DRACHTMAN, R. A.; UCHIDA, T.; VELAGALETI, G. V.; ELGHETANY, M. T. Fanconi Anemia: Myelodysplasia as a Predictor of Outcome. **Cancer Genet Cytogenet**, v.117, n.2, p.125-131, 2000.
- APOSTOLOU, S.; WHITMORE, S. A.; CRAWFORD, J.; LENNON, G.; SUTHERLAND, G. R.; CALLEN, D. F.; IANZANO, L.; SAVINO, M.; DAPOLITO, M.; NOTARANGELO, A.; MEMEO, E.; PIEMONTESE, M. R.; ZELANTE, L.; SAVOIA, A.; GIBSON, R. A.; TIPPING, A. J.; MORGAN, N. V.; HASSOCK, S.; JANSEN, S.; DRAVEL, T. J.; VANBERKE, L. C.; PRONK, J. C.; EASTON, D. F.; MATHEW, C. G.; LEVRAN, O.; VERLANDER, P. C. Positional cloning of the Fanconi Anaemia Group C gene. **Nat Genet**, v.14, p.324-328, 1996.
- AUERBACH, A. D. Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. **Leukemia**, v.6, (suppl. 1), p.1-4, 1992.
- AUERBACH, A. D. Fanconi anemia diagnosis and diepoxibutante (DEB) test. **Exp Hematol**, v.21, p.731-733, 1993.
- AUERBACH, A. D.; WOLMAN, S. R. Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. **Nature**, v.261, p.494-496, 1976.
- AUERBACH, A. D.; ADLER, B.; CHAGANTI, R. S. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. **Pediatrics**, v.67, n.1, pp.128-135, 1981.
- AUERBACH, A. D.; WEINER, M. A.; WARBURTON, D.; YEBOA, K.; LU, L.; BROXMEYER, H. E. Acute myeloid leukemia as the first hematologic manifestation of Fanconi anemia. **Am J Hematol**, v.12, n.3, p.289-300, 1982.
- AUERBACH, A. D.; ROGATKO, A.; SCHROEDER-KURTH, T. M. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxubutane sensitivity. **Blood**, v.73, p.391-296, 1989.
- AUERBACH, A. D.; ALLEN, R. G. Leukemia and preleukemia in Fanconi Anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. **Cancer Genet Cytogenet**, v.51, n.1, p.1-12, 1991.

- AUERBACH, A. D.; GREENBAUM, J.; PUJARA, K.; BATISH, S. D.; BITENCOURT, M. A.; KOKEMOHR, I.; SCHNEIDER, H.; LOBITZC, S.; PASQUINI, R.; GIAMPIETRO, P. F.; HANENBERG, H.; LEVRAN O; INTERNATIONAL FANCONI ANEMIA REGISTRY. Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. **Hum Mutat**, v.21, n.2, p.158-68, 2003.
- BABU RAO, V. B.; KERKETTA, L.; GHOSH, K.; MOHANTY, D. A46,XY,dup(1)(q21q32), add(11)(q23) karyotype in a case of Fanconi anemia. **Leuk Res**, v.25, p.347-348, 2001.
- BAGBY, G. C.; ALTER, B. P. Fanconi anemia. **Semin Hematol**, v.43, n.3, p.147-156, 2006.
- BAGBY, G. C.; LIPTON, J. M.; SLOAND, E. M.; SCHIFFER, C. A. Marrow Failure. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.318-328, 2004.
- BAKHSHI, S.; JOENJE, H.; SCHINDLER, D.; OOSTRA, A.; MOHAMED, A. N.; MADGY, D.; RAVINDRANATH, Y.; ABELLA, E. A case report of a patient with microcephaly, facial dysmorphism, mitomycin-c-sensitive lymphocytes, and susceptibility to lymphoma. **Cancer Genet Cytogenet**, v.164, p.168-171, 2006.
- BARTRAM, C.M. DNA Repair: pathways and defects. **Eur J Pediatric**, v.135, n.2, p.121-8, 1980.
- BEIGUELMAN, B. **Curso prático de estatística**. Ribeirão Preto (SP): Sociedade Brasileira de Genética, 1988.
- BERGER, R.; BUSSEL, A.; SCHENMETZLERLER, C. Cytogenetics studies in four cases of Fanconi's anemia. **Nouv Rev Fr Hematol**, v.15, n.5, p.539-50, 1975.
- BERGER, R.; BUSSEL, A.; SCHENMETZLERLER, C. Somatic segregation and Fanconi anemia. **Clin Genet**, v.11, n.6, p.409-12, 1977.
- BERGER, R.; BERNHEIM, A.; Le CONIAT, M.; VECCHIONE, D.; SCHAISON, G. Chromosomal studies of leukemia and preleukemia Fanconi's anemia patients. **Hum Genet**, v.56, p.59-62, 1980.
- BERGER, R.; Le CONIAT, M.; SCHAISON, G. Chromosome abnormalities in bone marrow of Fanconi anemia patients. **Cancer Genet Cytogenet**, v.65, n.1, p.47-50, 1993.
- BERGER, R.; JONVEAUX, P. Clonal chromosome abnormalities in Fanconi anemia. **Hematol Cell Ther**, v.38, n.4, p.291-6, 1996.
- BESSHO, F.; MIZUTANI, S.; HAYASHI, Y.; MORIWAKI, K.; YOKOTA, S.; INABA, T. Chronic myelomonocytic leukemia with chromosomal changes involving 1p36 and hepatocellular carcinoma in a case of Fanconi's anemia. **Eur J Haematol**, v.42, n.5, p.492-5, 1989.
- BEWICK, V; CHEEK, L.; BALL, J. Statistic review 12. Survival analysis. **Crit Care**, v.8, p.389-394, 2004.
- BLOOM, G. E.; WARNER, S.; GERALD, P. S.; DIAMOND, L. K. Chromosome abnormalities in constitutional aplastic anemia. **N Engl J Med**, v.274, p.8-14, 1966.
- BLOOMFIELD, C. D.; BRUNNING, R. D. Acute leukemia as a terminal event in nonleukemia hematopoietic disorders. **Semin Oncol**, v.3, p.297-316, 1976.

BOGLIOLO, M.; CABRÉ, O.; CALLÉN, E.; CASTILLO, V.; CREUS, A.; MARCOS, R.; SURRALLÉS, J. The Fanconi anemia genome stability and tumor suppressor network. **Mutagenesis**, v.17, n.6, p.529-538, 2002.

BORGONOVO, T.; RIBEIRO, E. M.; CORNÉLIO, D. A.; SCHMIDBRAZ, A. T.; JAMUR, V. R.; WUICIK, L.; VEIGA, L. B.; EHMKE, N.; PASQUINI, R.; CAVALLI, I. J. Cytogenetic study of Brazilian patients with Myelodysplastic Syndrome (MDS). **Genet Mol Biol**, v.28, n.4, p.654-660, 2005.

BOURGEOIS, C. A.; HILL, F. G. H. Fanconi anaemia leading to acute myelomonocytic leukemia. Cytogenetics studies. **Cancer**, v.39, p.1163-1167, 1977.

BUTTURINI, A.; GALE, R. P.; VERLANDER, P. C.; ADLER-BRECHER, B.; GILLIO, A. P.; AUERBACH, A. D. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. **Blood**, v.84, n.5, p.1650-1655, 1994.

CALLANAN, M. B.; LE BACCON, P.; MOSSUZ, P.; DULEY, S.; BASTARD, C.; HAMOUDI, R.; DYER, M. J.; KLOBECK, G.; RIMOKH, R.; SOTTO, J. J.; LEROUX, D. The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.4, n.97, p.309-14, 2000.

CARBONE, P.; BARBATA, G.; MIRTO, S.; GRANATA, G. Inherited aplastic anemia with abnormal clones in bone marrow and increased endoreduplication in peripheral lymphocytes. **Cancer Genet Cytogenet**, v.13, p.259-266, 1984.

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.2001-252.

DACIE, J. V.; GILPIN, A. Refractory anaemia (Fanconi type). Its incidence in three members of one family, with in one case a relationship to chronic haemolytic anaemia with nocturnal haemoglobinuria (Marchiafava-Micheli disease or "nocturnal haemoglobinuria"). **Arch Dis Child**, v.19, p.155, 1994.

D'ANDREA, A. D.; GROMPE, M. Molecular biology of FA: Implication for diagnosis and therapy. **Blood**, v.90, n.5, p.1725-1736, 1997.

D'ANDREA, A. D.; GROMPE, M. The Fanconi anemia/BRCA pathway. **Nat Rev Cancer**, v.3, p.23-24, 2003.

D'ANDREA, A. D.; FORD, R. The constitutional aplastic anemia. In: BEHRMAN, R. M.; JENSON, H. B. (Eds.). **Nelson Textbook of Pediatrics**. 17 th ed. Saunders: Philadelphia; 2004. p.1642-4.

de WINTER, J. P.; WAISFISZ, Q.; ROOIMANS, M. A.; van BERKEL, C. G.; BOSNOYAN-COLLINS, L.; ALON, N.; CARREAU, M.; BENDER, O.; DEMUTH, I.; SCHINDLER, D.; PRONK, J. C.; ARWERT, F.; HOEHN, H.; DIGWEED, M.; BUCHWALD, M.; JOENJE, H. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. **Nat Genet**, v.20, n.3, p.281-283, 1998.

de WINTER, J. P.; LÉVEILLÉ, F.; van BERKEL, C. G.; ROOIMANS, M. A.; van DER WEEL, L.; STELTENPOOL, J.; DEMUTH, I.; MORGAN, N. V.; ALON, N.; BOSNOYAN-COLLINS, L.; LIGHTFOOT, J.; LEEGWATER, P. A.; WAISFISZ, Q.; KOMATSU, K.; ARWERT, F.; PRONK, J. C.; MATHEW, C. G.; DIGWEED, M.; BUCHWALD, M.; JOENJE, H. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. **Am J Hum Genet**, v.67, p.1306-1308, 2000a.

de WINTER, J. P.; ROOIMANS, M. A.; van der WEEL, L.; van BERKEL, C. G.; ALON, N.; BOSNOYAN-COLLINS, L.; de GROOT, J.; ZHI, Y.; WAISFISZ, Q.; PRONK, J. C.; ARWERT, F.; MATHEW, C. G.; SCHEPER, R. J.; HOATLIN, M. E.; BUCHWALD, M.; JOENJE, H. The Fanconi anemia protein FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. **Nat Genet**, v.24, n.1, p.15-16, 2000b.

de WINTER, J. P.; van der WEEL, L.; de GROOT, J.; STONE, S.; WAISFISZ, Q.; ARWERT, F.; SCHEPER, R. J.; KRUYT, F. A.; HOATLIN, M. E.; JOENJE, H. The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. **Hum Mol Genet**, v.9, p.2665-2674, 2000c.

DOKAL, I. The genetics of Fanconi's anaemia. **Bailliere's Best Pract Res Clin Haematol**, v.13, (Issue 3), p.407-425, 2000.

DOSIK, H.; HSU, L. Y.; TODARO, G. J.; LEE, S. L.; HIRSCHHORN, K.; SELIRIO, E. S.; ALTER, A. A. Leukemia in Fanconi's Anemia: Cytogenetic and Tumor Virus Susceptibility Studies. **Blood**, v.36, n.3, p.341-351, 1970.

DOSIK, H.; STEIER, W.; LUBINIECKI, A. Inherited aplastic anaemia with increased andoreduplications: a new syndrome of Fanconi's anaemia variant? **Br J Haematol**, v.41, n.1, p.77-82, 1979.

DUCKWORTH-RYSIECKI, G.; CORNISH, K.; CLARKE, C. A.; BUCHWALD, M. Identification of two complementation groups in Fanconi anaemia. **Somat Cell Mol Genet**, v.11, p.35-41, 1985.

DUTRILLAUX, B.; FOSSE, A. M. Use of BrdU in the study of cell in normal and abnormal subjects. **Ann genet**, v.19, n.2, p.95, 1976.

DUTRILLAUX, B.; AURIAS, A.; DUTRILLAUX, A. M.; BURIOT, D.; PRIEUR, M. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi Anemia. **Hum Genet**, v.62, n.4, p.327-332, 1982.

ELMORE, E.; SWIFT, M. Growth of cultured cells from patients with Fanconi anemia. **J Cell Physiol**, v.87, n.2, p.229-233, 1975.

FAIVRE, L.; GUARDIOLA, P.; LEWIS, C.; DOKAL, I.; EBELL, W.; ZATTERALE, A.; ALTAY, C.; POOLE, J.; STONES, D.; KWEE, M. L.; van WEEL-SIPMAN, M.; HAVENGA, C.; MORGAN, N.; de WINTER, J.; DIGWEED, M.; SAVOIA, A.; PRONK, J.; de RAVEL, T.; JANSEN, S.; JOENJE, H.; GLUCKMAN, E.; MATHEW, C. G. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. **Blood**, v.96, n.13, p.4064-4070, 2000.

FANCONI, G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (FA). I. Clinical aspects. **Semin Hematol**, v.4, n.3, p.233-240, 1967.

FEARS, S.; MATHIEU, C.; ZELEZNIK-LE, N.; HUANG, S.; ROWLEY, J. D.; NUCIFORA, G. Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. **Proc Nat Acad Sci**, v.93, p.1642-1647, 1996.

FERRO, M. T.; VAZQUEZ-MAZARIEGO, Y.; RAMIRO, S.; SANCHEZ-HOMBRE, M. C.; VILLALON, C.; GARCIA-SAGREDO, J. M.; ULIBARRENA, C.; SASTRE, J. L.; ROMAN, C. S. Triplication of 1q in Fanconi anemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v.127, p.38-41, 2001.

FERTI, A.; PANANI, A.; DERVENOULAS, J.; RAPTIS, S. A. Cytogenetic findings in a Fanconi anemia patient with AML. **Cancer Genet Cytogenet**, v.90, p.182-183, 1996.

FISCHER, K.; FRÖHLING, S.; SCHERER, S. W.; McALLISTER BROWN, J.; SCHOLL, C.; STILGENBAUER, S.; TSUI, L. C.; LICHTER, P.; DÖHNER, H. Molecular cytogenetic delineation of deletions and translocation involving chromosome band 7q22 in myeloid leukemias. **Blood**, v.89, n.6, p.2036-41, 1997.

FUNDIA, A.; GORLA, N.; LARRIPA, I. Spontaneous chromosome aberrations in Fanconi's anemia patients are located at fragile sites and acute myeloid leukemia breakpoints. **Hereditas**, v.120, n.1, p.47-50, 1994.

GARCIA-HIGUERA, I.; TANIGUCHI, T.; GANESAN, S.; MEYN, M. S.; TIMMERS, C.; HEJNA, J.; GROMPE, M.; D'ANDREA, A. D. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in common pathway. **Mol Cell**, v.7, p.249-262, 2001.

GERMAN, J. Genes wich increase chromosomal instability in somatic cells and predispose to cancer. **Prog Med Genet**, v.8, p.61-101, 1972.

GIBSON, R. A.; BUCHWALD, M.; ROBERTS, R. G.; MATHEW, C. G. Characterization of the exon structure of the Fanconi anaemia group C gene by vectorette PCR. **Hum Mol Genet**, v.2, p.35-38, 1993.

GIBSON, R. A.; FORD, D.; JANSEN, S.; SAVOIA, A.; HAVENGA, C.; MILNER, R. D.; de RAVEL, T. J.; COHN, R. J.; BALL, S. E.; ROBERTS, I. Genetic mapping of the FACC gene and linkage analysis in Fanconi anaemia families. **J Med Genet**, v.31, n.11, p.868-871, 1994.

GLUCKMAN, E.; DEVERGIE A, SCHAISON G, BUSSEL A, BERGER R, SOHIER J, BERNARD J. Bone Marrow Transplantation in Fanconi anaemia. **British Journal of Haematology**, v.45, n.4, p.557-564, 1980.

GODTHELP, B. C.; van BUUL, P. P.; JASPERS, N. G.; ELGHALBZOURI-MAGHRANI, E.; van DUIJN-GOEDHART, A.; ARWERT, F.; JOENJE, H.; ZDZIENICKA, M. Z. Cellular characterization of cells from the Fanconi anemia complementation group, FA-D1/BRCA2. **Mutat Res**, v.10, n.601, p.191-201, 2006.

GREGORY, J. J.; WAGNER, J. E.; VERLANDER, P. C.; LEVRAN, O.; BATISH, S. D.; EIDE, C. R.; STEFFENHAGEN, A.; HIRSCH, B.; AUERBACH, A. D. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion im lymphohematopoietic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 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. **Semin Cancer Biol**, v.13, p.77-82, 2003.

GROMPE, M.; D'ANDREA, A. Fanconi anemia and DNA repair: **Hum Mol Genet**, v.10, p.2253-2259, 2001.

GROSS, M.; HANENBERG, H.; LOBITZ, S.; FRIEDL, R.; HERTERICH, S.; DIETRICH, R.; GRUHN, B.; SCHINDLER, D.; HOEHN, H. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. **Cytogenet Genome Res**, v.98, p.126-130, 2002.

GUARDIOLA, P.; PASQUINI, R.; DOKAL, I.; ORTEGA, J. J.; van WEEL-SIPMAN, M.; MARSH, J. C.; BALL, S.E.; LOCATELLI, F.; VERMYLEN, C.; SKINNER, R.; LJUNGMAN, P.; MINIERO, R.; SHAW, P. J.; SOUILLET, G.; MICHALLET, M.; BEKASSY, A. N.; KRIVAN, G.; DI BARTOLOMEO, P.; HEILMANN, C.; ZANESCO, L.; CAHN, J. Y.; ARCESE, W.; BACIGALUPO, A.; GLUCKMAN, E. 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.

GUO, B.; GODZIK, A.; REED, J. C. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. **J Biol Chem**, v.276, p.2780-2785, 2001.

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

GURTAN, A. M.; STUCKERT, P.; D'ANDREA, A. D. The WD-40 repeats of Fanconi are required for Fanconi anemia core complex assembly. **J Biol Chem**, v.281, n.16, p.10896-10905, 2006.

HECTH, F. Fragile sites, cancer chromosome breakpoints and oncogenes all cluster light G bands. **Cancer Genet Cytogenet**, v.31, p.17-24, 1988.

HEIM, S.; MITELMAN, F. **Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1995.

HEINRICH, M. C.; HOATLIN, M. E.; ZIGLER, A. J.; SILVEY, K. V.; BAKKE, A. C.; KEEBLE, W. W.; ZHI, Y.; REIFSTECK, C. A.; GROMPE, M.; BROWN, M. G.; MAGENIS, R. E.; OLSON, S. B.; BAGBY, G. C. DNA cross-linker-induced G2/M arrest in Group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. **Blood**, v.91, n.1, p.275-287, 1998.

HIRSCHHORN, R. In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. **J Med Genet**, v.40, p.721-728, 2003.

HOWLETT, N. G.; TANIGUCHI, T.; OLSON, S.; COX, B.; WAISFISZ, Q.; De DIE-SMULDERS, C.; PERSKY, N.; GROMPE, M.; JOENJE, H.; PALS, G.; IKEDA, H.; FOX, E. A.; D'ANDREA, A. D. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. **Science**, v.297, p.606-609, 2002.

HUCK, K.; HANENBERG, H.; GUDOWIUS, S.; FENK, R.; KALB, R.; NEVELING, K.; BETZ, B.; NIEDERACHER, D.; HAAS, R.; GÖBEL, U.; KOBBE, G.; SCHINDLER, D. Delayed diagnosis and complications of Fanconi anaemia at advanced age – a paradigm. **Br J Haematol**, v.133, p.188-197, 2006.

HURET, J. L.; BENZ, E.; GUILHOT, F.; BRIZARD, A.; TANZER, J. Fluctuation of a clone 46,XX,i (7q) in bone marrow in a Fanconi anaemia. **Hum Genet**, v.74, p.98-100, 1986.

HURET, J. L.; TANZER, J.; GUILHOT, F.; FROCRAIN-HERCHKOVITCH, C.; SAVAGE, J. R. Karyotype evolution in the bone marrow of a patient with Fanconi anemia: breakpoints in clonal abnormalities of this disease. **Cytogenet Cell Genet**, v.48, p.224-227, 1988.

HUSSAIN, S.; WITT, E.; HUBER, P. A.; MEDHURST, A. L.; ASHWORTH, A.; MATHEW, C. G.; Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. **Hum Mol Genet**, v.12, n.19, p.2503-10, 2003.

IANZANO, L.; D'APOLITO, M.; CENTRA, M.; SAVINO, M.; LEVRAN, O.; AUERBACH, A. D.; CLETON-JANSEN, A. M.; DOGGETT, N. A.; PRONK, J. C.; TIPPING, A. J.; GIBSON, R. A.; MATHEW, C. G.; WHITMORE, S. A.; APOSTOLOU, S.; CALLEN, D. F.; ZELANTE, L.; SAVOIA, A. The genomic organization of the Fanconi Anemia group A (FAA) gene. **Genomics**, v.41, p.309-314, 1997.

ISHIDA, R.; BUCHWALD, D. M. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA-cross-linking agents. **Cancer Res**, v.42, n.10, p.4000-4006, 1982.

JAKOBS, P. M.; FIDDLER-ODELL, E.; REIFSTECK, C.; OLSON, S.; MOSES, R. E.; GROMPE, M. Complementation group assignments in Fanconi anemia fibroblast cell lines from North America. **Somat Cell Molec Genet**, v.23, p.1-7, 1997.

JEANDIDIER, E.; DASTUGUE, N.; MUGNERET, F.; LAFAGE-POCHITALOFF, M.; MOZZICONACCI, M. J.; HERENS, C.; MICHAUX, L.; VERELLEN-DUMOULIN, C.; TALMANT, P.; CORNILLET-LEFEBVRE, P.; LUQUET, I.; CHARRIN, C.; BARIN, C.; COLLONGE-RAME, M. A.; PÉROT, C.; Van den AKKER, J.; GRÉGOIRE, M. J.; JONVEAUX, P.; BARANGER, L.; ECLACHE-SAUDREAU, V.; PAGÈS, M. P.; CABROL, C.; TERRÉ, C.; BERGER, R.; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). Abnormalities of the long arm of chromosome 21 in 107 patients with hematopoietic disorders: a collaborative retrospective study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. **Cancer Genet Cytogenet**, v.166, n.1, p.1-11, 2006.

JOENJE, H.; ARWERT, F.; ERIKSSON, A. W.; de KONING, H.; OOSTRA, A. B. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. **Nature**, v.290, n.5802, p.142-143, 1981.

JOENJE, H.; LO TEN FOE, J. R.; OOSTRA, A. B.; van BERKEL, C. G.; ROOIMANS, M. A.; SCHROEDER-KURTH, T.; WEGNER, R. D.; GILLE, J. J.; BUCHWALD, M.; ARWERT, F. Classification of Fanconi anemia patients by Complementation Analysis: Evidence for a Fifth genetic Subtype. **Blood**, v.86, n.6, p.2156-2160, 1995.

JOENJE, H.; OOSTRA, A. B.; WIJKER, M.; di SUMMA, F. M.; van BERKEL, C. G.; ROOIMANS, M. A.; EBELL, W.; van WEEL, M.; PRONK, J. C.; BUCHWALD, M.; ARWERT, F. Evidence for at least eight Fanconi Anemia genes. **Am J Hum Genet**, v.61, n.4, p.940-944, 1997.

JOENJE, H.; LEVITUS, M.; WAISFISZ, Q.; D'ANDREA, A.; GARCIA-HIGUERA, I.; PEARSON, T.; van BERKEL, C. G.; ROOIMANS, M. A.; MORGAN, N.; MATHEW, C. G.; ARWERT, F. Complementation Analysis in Fanconi Anemia: Assignment of the reference FA-H Patient to group a. **Am J Hum Genet**, v.67, n.3, p.759-762, 2000.

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

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

JOHANSSON, B.; MERTENS, F.; MITELMAN, F. Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. **Genes Chromosomes Cancer**, v.8, n.4, p.205-18, 1993.

JOHNSON, E.; COTTER, F. E. Monosomy 7 and 7q- associated with myeloid malignancy. **Blood Rev**, v.11, p.46-55, 1997.

KIDSON, C. Diseases of DNA repair. **Clin Haematol**, v.9, n.1, p.141-57, 1980.

KOSULL, H.; AULA, P. Nonrandom distribution of chromosome breaks in Fanconi's anaemia. **Cytogenet Cell Genet**, v.12, p.423-434, 1973.

KRUYT, P. A. E.; DIJKMANS, L. M.; van den BERG, T. K.; JOENJE, H. Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in In lymphoblastoid cell lines. **Blood**, v.87, n.3, p.938-48, 1996.

KUPFER, G. M.; NAF, D.; D'ANDREA, A. D. Molecular biology of Fanconi anemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.11, n.6, p.1045-1061, 1997.

KUPFER, G. M.; YAMASHITA, T.; NAF, D.; SULIMAN, A.; ASANO, S.; D'ANDREA, A. D. The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2. **Blood**, v.90, n.3, p.1047-54, 1997a.

KUPFER, G. M.; NÄF, D.; SULIMAN, A.; PULSIPHER, M.; D'ANDREA, A. D. The Fanconi anemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex. **Nat Genet**, v.17, p.487-490, 1997b.

KUTLER, D. I.; SINGH, B.; SATAGOPAN, J.; BATISH, S. D.; BERWICK, M.; GIAMPIETRO, P. F.; HANENBERG, H.; AUERBACH, A. D. 20-years perspectives on the International Fanconi Anemia Register (IFAR). **Blood**, v.101, p.1249-1256, 2003.

LACKINGER, D.; RUPPITSCH, W.; RAMIREZ, M. H.; HIRSCH-KAUFFMANN, M.; SCHWEIGER, M. Involvement of the Fanconi anemia protein FA-C in repair process of oxidative DNA damages. **FEBS Letters**, v.440, n.12, p.103-106, 1998.

Le BEAU, M. M.; ESPINOSA, R.; DAVIS, E. M.; EISENBART, J. D.; LARSON, R. A.; GREEN, E. D. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. **Blood**, v.88, n.6, p.1930-5, 1996.

LEONE, G.; SEARS, R.; HUANG, E.; REMPEL, R.; NUCKOLLS, F.; PARK, C. H.; GIANGRANDE, P.; WU, L.; SAAVEDRA, H. I.; FIELD, S. J.; THOMPSON, M. A.; YANG, H.; FUJIWARA, Y.; GREENBERG, M. E.; ORKIN, S.; SMITH, C.; NEVINS, J. R. Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. **Mol Cell**, v.8, p.105-113, 2001.

- LEVITUS, M.; ROOIMANS, M. A.; STELTENPOOL, J.; COOL, N. F.; OOSTRA, A. B.; MATHEW, C. G.; HOATLIN, M. E.; WAISFISZ, Q.; ARWERT, F.; de WINTER, J. P.; JOENJE, H. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. **Blood**, v.103, p.2498-2503, 2004.
- LEVITUS, M.; WAISFISZ, Q.; GODTHELP, B. C.; de VRIES, Y.; HUSSAIN, S.; WIEGANT, W. W.; ELGHALBZOURI-MAGHRANI, E.; STELTENPOOL, J.; ROOIMANS, M. A.; PALS, G.; ARWERT, F.; MATHEW, C. G.; ZDZIENICKA, M. Z.; HIOM, K.; De WINTER, J. P.; JOENJE, H. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. **Nat Genet**, v.37, n.9, p.934-935, 2005.
- LEVRAN, O.; DIOTTI, R.; PUJARA, K.; BATISH, S. D.; HANENBERG, H.; AUERBACH, A. D. Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Human Mutati**, v.25, n.142-149, 2005.
- LIANG, H.; FAIRMAN, J.; CLAXTON, D. F.; NOWELL, P. C.; GREEN, E. D.; NAGARAJAN, L. Molecular anatomy of chromosome 7q deletions in myeloid neoplasms: Evidence for multiple critical loci. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.3781-3785, 1998.
- LISKER, R.; COBO de GUTIERREZ, A. Cytogenetic studies in Fanconi's Anemia. Description of a case with bone marrow clonal evolution. **Clin Genet**, v.5, p.72-76, 1974.
- LIU, J. M.; BUCHWALD, M.; WALSH, C. E.; YOUNG, N. S. Fanconi anemia and novel strategies for therapy. **Blood**, v.84, n.12, p.3995-4007, 1994.
- LO TEN FOE, J. R.; ROOIMANS, M. A.; BOSNOYAN-COLLINS, L.; ALON, N.; WIJKER, M.; PARKER, L.; LIGHTFOOT, J.; CARREAU, M.; CALLEN, D. F.; SAVOIA, A.; CHENG, N. C.; van BERKEL, C. G.; STRUNK, M. H.; GILLE, J. J.; PALS, G.; KRUYT, F. A.; PRONK, J. C.; ARWERT, F.; BUCHWALD, M.; JOENJE, H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anemia gene, FAA. **Nat Genet**, v.14, n.3, p.320-323, 1996.
- MAAREK, O.; JONVEAUX, P.; Le CONIAT, M.; DERRE, J.; BERGER, R. Fanconi anemia and bone marrow clonal chromosome abnormalities. **Leukemia**, v.10, n.11, p.1700-1704, 1996.
- MADAULE, P.; AXEL, P. A novel ras-related gene family. **Cell**, v.41, n.1, p.31-40, 1985.
- MAGDALENA, N. I. R. **Estudo das variações de seqüência do gene FANCA da Anemia de Fanconi**. 1999. Tese (Doutorado) - Departamento de Genética - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.
- MAGDALENA, N.; PILONETTO, D. V.; BITENCOURT, M. A.; PEREIRA, N. F.; RIBEIRO, R. C.; JENG, M.; PASQUINI, R. Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the FANCA 3788-3790del mutation. **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.5, p.669-673, 2005.
- MEDHURST, A. L.; LAGHMANI, el H.; STELTENPOOL, J.; FERRER, M.; FONTAINE, C.; de GROOT, J.; ROOIMANS, M. A.; SCHEPER, R. J.; MEETEI, A. R.; WANG, W.; JOENJE, H.; de WINTER, J. P. Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway. **Blood**, v.108, n.6, p.2072-2080, 2006.
- MEISSNER, L. F.; TAHER, A.; SHAHIDI, N. T. Chromosome changes and leukemic transformation in Fanconi's anemia. **Monograph**, p.253-71, 1978.

MEETEI, A. R.; de WINTER, J. P.; MEDHURST, A. L.; WALLISCH, M.; WAISFISZ, Q.; van de VRUGT, H. J.; OOSTRA, A. B.; YAN, Z.; LING, C.; BISHOP, C. E. et al. A novel ubiquitina ligase is deficient in Fanconi Anemia. **Nat Genet**, v.35, n.2, p.165-170, 2003.

MEETEI, A. R.; LEVITUS, M.; XUE, Y.; MEDHURST, A. L.; ZWAAN, M.; LING, C.; ROOIMANS, M. A.; BIER, P.; HOATLIN, M.; PALS, G.; de WINTER, J. P.; WANG, W.; JOENJE, H. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. **Nat Genet**, v.36, n.11, p.1219-1224, 2004.

MEETEI, A. R.; MEDHURST, A. L.; LING, C.; XUE, Y.; SINGH, T. R.; BIER, P.; STELTENPOOL, J.; STONE, S.; DOKAL, I.; MATHEW, C. G.; HOATLIN, M.; JOENJE, H.; de WINTER, J. P.; WANG, W. A human ortholog of archeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. **Nat Genet**, v.37, n.9, p.958-963, 2005.

MONTES DE OCA, R.; ANDREASSEN, P. R.; MARGOSSIAN, S. P.; GREGORY, R. C.; TANIGUCHI, T.; WANG, X.; HOUGHTALING, S.; GROMPE, M.; D'ANDREA, A. D. Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2 with chromatin. **Blood**, v.105, n.3, p.1003-1009, 2005.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELIMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocyte cultures from human peripheral blood. **Exp Cell Res**, v.20, p.613-616, 1960.

NAKANISHI, K.; YANG, Y. G.; PIERCE, A. J.; TANIGUCHI, T.; DIGWEED, M.; D'ANDREA, A. D.; WANG, Z. Q.; JASIN, M. Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.102, n.4, p.1110-1115, 2005.

NILSON, L. R. Chronic pancytopenia with multiple congenital abnormalities (Fanconi's anaemia). **Acta Paediatr**, v.49, p.518, 1960.

NOWELL, P. C.; BESA, E. C. Prognostic significance of a single chromosome abnormalities in preleukemic states. **Cancer Genet Cytogenet.**, v.42, p.1-7, 1989.

OLIVEIRA, N. I. S. S. **Estudo citogenético em células da medula óssea de pacientes com Anemia de Fanconi**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Genética - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

OLIVEIRA, N. I.; RIBEIRO, E. M.; RAIMONDI, S. C.; BITTENCOURT, M. A.; PASQUINI, R.; CAVALLI, I. J. Two different karyotypes with 1q abnormalities in a patient with Fanconi anemia. **Leuk Res**, v.26, p.1047-1049, 2002.

PACE, P.; JOHNSON, M.; TAN, W. M.; MOSEDALE, G.; SNG, C.; HOATLIN, M.; de WINTER, J.; JOENJE, H.; GERGELY, F.; PATEL, K. J. FANCE: the link between Fanconi anemia complex assembly and activity. **EMBO J**, v.21, n.13, p.3414-3423, 2002.

PANDIS, N.; TEIXEIRA, M. R.; ADEYINKA, A.; RIZOU, H.; BARDI, G.; MERTENS, F.; ANDERSEN, J. A.; BONDESON, L.; SFIKAS, K.; QVIST, H.; APOSTOLIKAS, N.; MITELMAN, F.; HEIM, S. Cytogenetic comparison of primary tumors and lymph node metástases in breast câncer patients. **Genes Chromosomes Cancer**, v.22, p.122-9, 1998.

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.

PEARSON, T.; JANSEN, S.; HAVENGA, C.; STONES, D. K.; JOUBERT, G. Fanconi Anemia: a statistical evaluation of cytogenetic results obtained from South African families. **Cancer Genet Cytogenet**, v.126, p.52-55, 2001.

POLL, E. H.; ABRAHAMS, P. J.; ARWERT, F.; ERIKSSON, A. W. Host-cell reactivation of cis-diamminedichloroplatinum (II)-treated SV40 DNA in normal human, Fanconi anaemia and xeroderma pigmentosum fibroblasts. **Mut Res**, v.132, n.5-6, p.181-187, 1984.

PORFIRIO, B.; SMEETS, D.; BECKERS, L.; CAPOROSSI, D.; TEDESCHI, B.; VERNOLE, P.; JOENJE, H.; NICOLETTI, B.; DALLAPICCOLA, B. Fragile sites and chromosome instability: the distribution of breaks induced by cis-diamine-dichloro-platinum (II) in Fanconi anemia lymphocyte cultures. **Hum Genet**, v.86, n.3, p.256-260, 1991.

PRONK, J. C.; GIBSON, R. A.; SAVOIA, A.; WIJKER, M.; MORGAN, N. V.; MELCHIONDA, S.; FORD, D.; TEMTAMY, S.; ORTEGA, J. J.; JANSEN, S. et al. Localization of the Fanconi anemia complementation group A gene to chromosome 16q24.3. **Nat Genet**, v.11, n.3, p.338-340, 1995.

PULSIPHER, M.; KUPFER, G. M.; NAF, D.; SULIMAN, A.; LEE, J. S.; JAKOBS, P.; GROMPE, M.; JOENJE, H.; SIEFF, C.; GUINAN, E.; MULLIGAN, R.; D'ANDREA, A. D. Subtyping analysis of Fanconi anemia by immunoblotting and retroviral gene transfer. **Molecular Medicine**, v.4, p.468-479, 1998.

RAHMAN, N.; SEAL, S.; THOMPSON, D.; KELLY, P.; Renwick, A.; ELLIOTT, A.; REID, S.; SPANOVA, K.; BARFOOT, R.; CHAGTAI, T.; JAYATILAKE, H.; MCGUFFOG, L.; HANKS, S.; EVANS, D. G.; ECCLES, D.; EASTON, D. F.; STRATTON, M. R. PABL2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nat Genet**, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/naturegenetics>>. Acesso em: 15 jul. 2008.

RAIMONDI, S. C.; CHANG, M. N.; RAVINDRANATH, Y.; BEHM, F. G.; GRESIK, M. V.; STEUBER, C. P.; WEINSTEIN, H. J.; CARROLL, A. J. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. **Blood**, v.1, n.94, p.3707-16, 1999.

RATHBUN, R. K.; FAULKNER, G. R.; OSTROSKI, M. H.; CHRISTIANSON, T. A.; HUGHES, G.; JONES, G.; CAHN, R.; MAZIARZ, R.; ROYLE, G.; KEEBLE, W.; HEINRICH, M. C.; GROMPE, M.; TOWER, P. A.; BAGBY, G. C. Inactivation of the Fanconi Anemia Group C Gene Augments Interferon- γ -induced Apoptotic Responses Hematopoietic cells. **Blood**, v.90, n.3, p.974-985, 1997.

RATHBUN, R. K.; CHRISTIANSON, T. A.; FAULKNER, G. R.; JONES, G.; KEEBLE, W.; O'DWYER, M.; BAGBY, G. C. Interferon- γ -induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. **Blood**, v.96, n.13, p.4204-4211, 2000.

- REID, S.; SCHINDLER, D.; HANENBERG, H.; BARKER, K.; HANKS, S.; KALB, R.; NEVELING, K.; KELLY, P.; SEAL, S.; FREUND, M.; WURM, M.; BATISH, S. D.; LACH, F. P.; YETGIN, S.; NEITZEL, H.; ARIFFIN, H.; TISCHKOWITZ, M.; MATHEW, C. G.; D'AUERBACH, A.; RAHMAN, N. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. **Nat Gen**, v.39, n.2, p.162-194, 2007.
- REY, J. P.; SCOTT, R.; MULLER, H. Apoptosis is not involved in the hypersensitivity of Fanconi anemia cells to mitomycin C. **Cancer Genet Cytogenet**, v.75, n.1, p.67-71, 1994.
- RIDET, A.; GUILLOUF, C.; DUCHAUD, E.; CUNDARI, E.; FIORE, M.; MOUSTACCHI, E.; ROSSELLI, F. Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. **Cancer Res**, v.57, n.9, p.1722-30, 1997.
- RISINGER, M. A.; GRODEN, J. Crosslinks and crosstalk: Human cancer syndromes and DNA repair defects. **Cancer Cell**, v.6, p.539-545, 2004.
- ROGATKO, A.; AUERBACH, A. D. Segregation analysis with uncertain ascertainment. Application to Fanconi Anemia. **Am J Hum Genet**, v.224, p.889-897, 1988.
- 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.
- ROSSELLI, F.; RIDET, A.; SOUSSI, T.; DUCHAUD, E.; ALAPETITE, C.; MOUSTACCHI, E. P53-dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. **Oncogene**, v.10, n.1, p.9-17, 1995.
- RUPPITSCH, W.; MEISLITZER, C.; WEIRICH-SCHWAIGER, H.; KLOCKER, H.; SCHEIDEREIT, C.; SCHWEIGER, M.; HIRSCH-KAUFFMANN, M. The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia. **Hum Genet**, v.99, p.710-719, 1997.
- SAAR, K.; SCHINDLER, D.; WEGNER, R. D.; REIS, A.; WIENKER, T. F.; HOEHN, H.; JOENJE, H.; SPERLING, K.; DIGWEED, M. Localization of Fanconi anaemia gene to chromosome 9p. **Eur J Hum Genet**, v.6, n.5, p.501-508, 1998.
- SACCHI, N. Down syndrome and chromosome 21 abnormalities in leukemia. **Baillière's Clin Haematol**, v.5, p.815-831, 1992.
- SAGASETA DE ILURDOZ, M.; MOLINA, J.; LEZÁUN, I.; VALIENTE, A.; DURÁN, G. Updating Fanconi's anaemia. **An Sist Sanit Navar**, v.26, n.1, p.63-78, 2003.
- SALA-TREPAT, M.; ROUILLARD, D.; ESCARCELLER, M.; LAQUERBE, A.; MOUSTACCHI, E.; PAPADOPOULOU, D. Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. **Exp Cell Res**, v.260, n.2, p.208-215, 2000.
- SANTOS, C. C.; GVISH, H.; BUCHWALD, M. Fanconi Anemia revisited: old ideas and new advances. **Stem cells**, v.12, p.142-153, 1994.
- SASAKI, M. S. Is Fanconi's anemia defective in a process essential to the repair of DNA cross links? **Nature**, v.257, p.501-503, 1975.

SASAKI, M. S. Chromosome aberration formation and sister chromatid exchange in relation to DNA repair in human cells. **Basic Life Sci**, v.15, p.285-313, 1980.

SCHERES, V. M. J. C. Identification of two robertsonian translocation with a Giemsa banding technique. **Hum Genet**, v.15, p.253-256, 1972.

SCHROEDER, T. M.; ANSCHUTZ, F.; KNOPP, A. Spontane chromosome aberrationen bei familiaerer Panmyelopathie. **Humagenetik**, v.1, p.194-196, 1964.

SCHROEDER, T. M.; GERMAN, J. Bloom's syndrome and Fanconi's anemia: demonstration of two distinctive patterns of chromosome disruption and rearrangement. **Humangenetik**, v.25, p.299-306, 1974.

SCHROEDER, T. M.; TILGEN, D.; KRÜGER, J.; VOGEL, F. Formal genetics of Fanconi's anemia. **Hum Genet**, v.32, n.3, p.257-288, 1976.

SCHULER, D.; KISS, A.; FABIAN, F. Chromosomal peculiarities and "in vitro" examinations in Fanconi's anemia. **Hum Genet**, v.7, p.314-322, 1969.

SHAFFER, L. G.; TOMMERUP, N. (Eds.). **ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Basel, Switzerland: S. Karger; 2005.

SHIMAMURA, A. Inherited bone marrow failure syndromes: molecular features. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.63-71, 2006.

SHIMAMURA, A.; MONTES DE OCA, R.; SVENSON, J. L.; HAINING, N.; MOREAU, L. A.; NATHAN, D. G.; D'ANDREA, A. D. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. **Blood**, v.100, n.13, p.4649-4654, 2002.

SMOGORZEWSKA, A.; MATSUOKA, S.; VINCIGUERRA, P.; McDONALD, E. R.; HUROV, K. E.; LUO, J.; BALLIF, B. A.; GYGI, S. P.; HOFMANN, K.; D'ANDREA, A. D.; ELLEDGE, S. J. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. **Cell**, v.129, p.1-3, 2007.

SOBECK, A.; STONE, S.; COSTANZO, V.; de GRAAF, B.; REUTER, T.; de WINTER, J.; WALLISCH, M.; AKKARI, Y.; OLSON, S.; WANG, W.; JOENJE, H.; CHRISTIAN, J. L.; LUPARDUS, P. J.; CIMPRICH, K. A.; GAUTIER, J.; HOATLIN, M. E. Fanconi anemia proteins are required to prevent accumulation of replication-associated DNA double-strand breaks. **Mol Cell Biol**, v.26, n.2, p.425-437, 2006.

SOULIER, J.; LEBLANC, T.; LARGHERO, J.; DASTOT, H.; SHIMAMURA, A.; GUARDIOLA, P.; ESPEROU, H.; FERRY, C.; JUBERT, C.; FEUGEAS, J. P.; HENRI, A.; TOUBERT, A.; SOCIÉ, G.; BARUCHEL, A.; SIGAUX, F.; D'ANDREA, A. D.; GLUCKMAN, E. 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.

STANDEN, G. R.; HUGHES, I. A.; GEDDES, A. D.; JONES, B. M.; WARDROP, C. A. Myelodysplastic syndrome with trisomy 8 in a adolescent with Fanconi anemia and selective IgA deficiency. **Am J Hematol**, v.31, p.280-283, 1989.

STIVRINS, T. J.; DAVIS, R. B.; SANGER, W.; FRITZ, J.; PURTILO, D. T. Transformation of Fanconi's anemia to acute nonlymphocytic leukemia associated with emergence of monosomy 7. **Blood**, v.64, p.173-176, 1984.

STRATHDEE, C. A.; DUNCAN, A. M.; BUCHWALD, M. Evidence for at least four Fanconi anemia by functional complementation. **Nat Genet**, v.1, p.196, 1992.

STRATHDEE, C. A.; GAVISH, H.; SHANNON, W. R.; BUCHWALD, M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. **Nature**, v.356, p.763-767, 1992.

SUGITA, K.; TAKI, T.; HAYASHI, Y.; SHIMAOKA, H.; KUMAZAKI, H.; INOUE, H.; KONNO, Y.; TANIWAKI, M.; KUROSAWA, H.; EGUCHI, M. MLL-CBP fusion transcript in a therapy-related acute myeloid leukemia with the t(11;16)(q23;p13) which developed in acute lymphoblastic leukemia patient with Fanconi anemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v.27, n.3, p.264-9, 2000.

SWIFT, M. R. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. **Nature**, v.230, p.370-373, 1971.

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

TANIGUCHI, T.; GARCIA-HIGUERA, I.; ANDREASSEN, P. R.; GREGORY, R. C.; GROMPE, M.; D'ANDREA, A. D. S-phase specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2 with BRCA1 and RAD51. **Blood**, v.100, n.7, p.2414-2420, 2002.

TESTONI, N.; BORSARU, G.; MARTINELLI, G.; CARBONI, C.; RUGGERI, D.; OTTAVIANI, E.; PELLICONI, S.; RICCI, P.; PASTANO, R.; VISANI, G.; ZACCARIA, A.; TURA, S. 3q21 and 3q26 cytogenetic abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features. **Haematologica**, v.84, n.8, p.690-4, 1999.

THOMPSON, P. W.; STANDEN, G. R.; GEDDES, A. D. transient t(Y;1)(q12;q21) in a patient with Fanconi anemia and myelodysplastic Syndrome. **Cancer Genet Cytogenet**, v.52, p.201-202, 1991.

THURSTON, V. C.; CEPERICH, T.M.; VANCE, G. H.; HEEREMA, N.A. Detection of monosomy 7 in bone marrow by fluorescence in situ hybridization – A study of Fanconi anemia patients and review of the literature. **Cancer Genet Cytogenet**, v.109, n.2, p.154-160, 1999.

TIMME, T. L.; MOSES, R. E. Review: Disease with DNA Damage-Processing Defects. **Am J Med Sci**, v.295, n.1, p.40-48, 1998.

TIMMERS, C.; TANIGUCHI, T.; HEJNA, J.; REIFSTECK, C.; LUCAS, L.; BRUUN, D.; THAYER, M.; COX, B.; OLSON, S.; D'ANDREA, A. D.; MOSES, R.; GROMPE, M. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. **Mol Cell**, v.7, p.241-248, 2001.

TÖNNIES, H.; HUBER, S.; KÜHL, J. S.; GERLACH, A.; EBELL, W.; NEITZEL, H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. **Blood**, v.101, n.10, p.3872-3874, 2003.

TOOTIAN, S.; MAHJOUBI, F.; RAHNAMA, M.; HORMOZIAN, F.; MORTEZAPOUR, F.; RAZAZIAN, F.; MANOOCHHEHRI, F.; ZAMANIAN, M.; NASIRI, F.; SOLEYMANI, S.; SEYEDMORTAZ, L. Cytogenetic investigation in Iranian patients suspected with Fanconi Anemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.28, n.12, p.834-836, 2006.

TOSI, S.; SCHERER, S. W.; GIUDICI, G.; CZEPULKOWSKI, B.; BIONDI, A.; KEARNEY, L. Delineation of multiple deleted regions in 7q in myeloid disorders. **Genes Chromosomes Cancer**, v.25, n.4, p.384-92, 1999.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.4, p.275-283, 2007.

WAGNER, J. E.; TOLAR, J.; LEVRAN, O.; SCHOLL, T.; DEFFENBAUGH, A.; SATAGOPAN, J.; BEN-PORAT, L.; MAH, K.; BATISH, S. D.; KUTLER, D. I.; MacMILLAN, M. L.; HANENBERG, H.; AUERBACH, A. D. 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.; SAAR, K.; MORGAN, N. V.; ALTAY, C.; LEEGWATER, P. A.; de WINTER, J. P.; KOMATSU, K.; EVANS, G. R.; WEGNER, R. D.; REIS, A.; JOENJE, H.; ARWERT, F.; MATHEW, C. G.; PRONK, J. C.; DIGWEED, M. The Fanconi anemia group E gene FANCE, maps to chromosome 6p. **Am J Hum Genet**, v.64, n.5, p.1400-1405, 1999.

WANG, W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. **Nat Rev Genet**, v.8, n.10, p.735-48, 2007.

WANG, Y.; CORTEZ, D.; YAZDI, P.; NEFF, N.; ELLEDGE, S. J.; QIN, J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. **Genes Dev**, v.14, p.927-939, 2000.

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.

WANG, J.; LIU, Y. X.; HANDE, M. P.; WONG, A. C.; JIN, Y. J.; YIN, Y. TAp73 is a downstream target of p53 in controlling the cellular defense against stress. **J Biol Chem**, v.282, n.40, p.29152-62, 2007.

WHITNEY, M. A.; JAKOBS, P.; KABACK, M.; MOSES, R. E.; GROMPE, M. The Ashkenazi Jewish Fanconi anemia mutation: incidence among patients and carrier frequency in the at-risk population. **Hum Mutat**, v.3, p.339-341, 1994.

WHITNEY, M.; THAYER, M.; REIFSTECK, C.; OLSON, S.; SMITH, L.; JAKOBS, P. M.; LEACH, R.; NAYLOR, S.; JOENJE, H.; GROMPE, M. Microcell mediated chromosome transfer maps the Fanconi anemia group D gene to chromosome 3p. **Nat Genet**, v.11, n.3, p.341-343, 1995.

XIA, B.; DORSMAN, J. C.; AMEZIANE, N.; de VRIES, Y.; ROOIMANS, M. A.; SHENG, Q.; PALS, G.; ERRAMI, A.; GLUCKMAN, E.; LLERA, J.; WANG, W.; LIVINGSTON, D. M.; JOENJE, H.; de WINTER, J. P. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. **Nat Genet**, v.39, n.2, p.159-161, 2007.

YONEDA-KATO, N.; LOOK, A. T.; KIRSTEIN, M. N.; VALENTINE, M. B.; RAIMONDI, S. C.; COHEN, K. J.; CARROLL, A. J.; MORRIS, S. W. The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. **Oncogene**, v.18, n.12, p.265-75, 1996.

YOSHIDA, M. C. Suppression of spontaneous and mitomycin C-induced chromosome aberrations in Fanconi's anemia by cell fusion with normal human fibroblasts. **Hum Genet**, v.55, n.2, p.223-226, 1980.

YOUSSOUFIAN, H. Localization of Fanconi anemia C protein to the cytoplasm of mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, n.17, p.7975-7979, 1994.

YUE, Y.; STOUT, K.; GROSSMANN, B.; ZECHNER, U.; BRINCKMANN, A.; WHITE, C.; PILZ, D. T.; HAAF, T. Disruption of TCBA1 associated with a de novo t(1;6)(q32.2;q22.3) presenting in a child with developmental delay and recurrent infections. **J Med Genet**, v.43, p.143-147, 2006.

ZAKRZEWSKI, S.; SPERLING, K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. **Hum Genet**, v.56, n.1, p.81-84, 1980.

ZANIS-NETO, J.; RIBEIRO, R. C.; MEDEIROS, C.; ANDRADE, R. J.; OGASAWARA, V.; HÜSH, M.; MAGDALENA, N.; FRIEDRICH, M. L.; BITENCOURT, M. A.; BONFIM, C.; PASQUINI, R. Bone Marrow Transplantation for patients with Fanconi anemia: a study of 224 cases from a single institution. **Bone Marrow Transplant**, v.15, n.2, p.293-298, 1995.

ZANIS-NETO, J.; FLOWERS, M. E.; MEDEIROS, C. R.; BITENCOURT, M.; BONFIM, C. Low-dose cyclophosphamide conditioning for haematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors in patients with Fanconi anemia. **Br J Haematol**, v.130, p.99-106, 2005.

ZENG, H.; YÜCEL, R.; KOSAN, C.; KLEIN-HITPASS, L.; MÖRÖY, T. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. **EMBO J**, v.23, p.4116-4125, 2004.