

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**DANIELA VANDRESEN PILONETTO**

**PROPOSTA DE UMA ESTRATÉGIA PARA A INVESTIGAÇÃO MOLECULAR  
EM PACIENTES BRASILEIROS COM ANEMIA DE FANCONI**

**CURITIBA**

**2014**

**DANIELA VANDRESEN PILONETTO**

**PROPOSTA DE UMA ESTRATÉGIA PARA A INVESTIGAÇÃO MOLECULAR  
EM PACIENTES BRASILEIROS COM ANEMIA DE FANCONI**

**Tese apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Doutora, no Curso  
de Pós-Graduação em Medicina Interna e  
Ciências da Saúde, Departamento de  
Clínica Médica, Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini  
Coorientadora: Dra. Noemi Farah Pereira**

**CURITIBA**

**2014**

Pilonetto, Daniela Vandresen  
Proposta de uma estratégia para a investigação molecular em pacientes  
brasileiros  
com Anemia de Fanconi / Daniela Vandresen Pilonetto. -- Curitiba, 2014.  
120 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Noemi Farah Pereira

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de  
Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Anemia de Fanconi. 2. Mutação-genética. 3. Mosaicismo. I. Pasquini, Ricardo.  
II. Título.

NLM WH 175



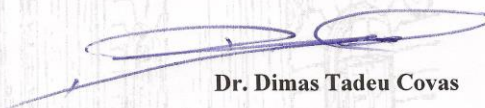
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
= MESTRADO e DOUTORADO =


## PARECER

Aos sete dias do mês de outubro do ano de dois mil e quatorze, a banca examinadora constituída pelos Professores: **Dr. Dimas Tadeu Covas** (Professor titular da FM da USP - RP e Diretor-Presidente da FH - RP), **Dra. Sara Teresinha Olalla Saad** (Professora Titular da Disciplina de Hematologia na UE de Campinas), **Dr. João Bosco Oliveira** (Diretor de Pesquisa do IMIP e Professor do HCP - Pernambuco), **Prof. Dr. José Cláudio Casali da Rocha** (Pesquisador Sênior do INC e Professor da PUC) e **Dr. Ricardo Pasquini** (Professor Titular e Sênior da UFPR - orientador), exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **DANIELA VANDRESEN PILONETTO** do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, nível Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: **“PROPOSTA DE UMA ESTRATÉGIA PARA A INVESTIGAÇÃO MOLECULAR EM PACIENTES BRASILEIROS COM ANEMIA DE FANCONI”**. A Banca examinadora considerou que a aluna apresentou trabalho adequado para tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação** sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutora em Medicina Interna**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomenda a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

  
**Dra. Sara Teresinha Olalla Saad**

  
**Dr. João Bosco Oliveira**

  
**Dr. Dimas Tadeu Covas**

  
**Dr. José Cláudio Casali da Rocha**

  
**Dr. Ricardo Pasquini**

*Dedico este trabalho a todos os pacientes e seus familiares que buscam encontrar na ciência a cura de suas doenças e que sofrem por perder aqueles que amam.*

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

À Dr.<sup>a</sup> Noemi Farah Pereira, coorientadora desta tese, pela importante colaboração nas diversas etapas deste estudo, tornando viável a sua realização, pelas correções e sugestões e pelo exemplo de dedicação e competência profissional.

À Dr.<sup>a</sup> Carmem Maria Sales Bonfim, médica responsável pelo Ambulatório em Anemia de Fanconi do HC-UFPR, pelas sugestões e correções e pelo importante e imprescindível trabalho realizado no atendimento a estes pacientes que possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Lisandro Lima Ribeiro, médico do Ambulatório em Anemia de Fanconi do HC-UFPR, pela ajuda e companheirismo em momentos difíceis da minha vida e pela dedicação profissional e carinho para com os pacientes que fizeram parte deste estudo.

Ao Dr. Marco Antonio Bitencourt, médico do Serviço de Transplante de Células Tronco Hematopoética do HC-UFPR, pelo atendimento a muitos dos pacientes envolvidos, pelas sugestões, correções e pelo incentivo à realização deste estudo.

À minha colega Karina Casagrande, pelo excelente trabalho realizado e pelo companheirismo e amizade que tornaram os dias de trabalho muito mais agradáveis.

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

Ao Dr. Hans Gille e suas colaboradoras Lianne Kerkhoven e Karijn Floor, pelo treinamento na *Vrije Universiteit – VU Medical Center* em Amsterdam e pela importante participação na análise dos resultados deste estudo.

A equipe da citogenética em especial às colegas Roseli Rocio da Silva e Miriam Lacerda Barbosa, pela realização das análises citogenéticas.

A todos os meus colegas do Laboratório de Imunogenética, pelo incentivo e pela colaboração na realização deste estudo.

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

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

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

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

A minha querida afilhada Júlia e meu querido Fioravante pequeninos em tamanho, mas enormes exemplos de superação, os quais agradeço por fazerem parte da minha vida.

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

## RESUMO

Anemia de Fanconi (AF) é uma doença autossômica recessiva e, em raros casos, ligada ao X, com grande heterogeneidade genética resultante de diferentes mutações em genes cujos produtos estão envolvidos nas vias de reparo do DNA, sendo que 16 subtipos genéticos já foram identificados. A variabilidade fenotípica desta doença dificulta o diagnóstico clínico, sendo necessários testes laboratoriais para sua confirmação. A possível influência do genótipo AF nas manifestações clínicas, como falência progressiva da medula óssea, leucemias e câncer, pode ser melhor definida se a mutação dentro de um subtipo genético for identificada. A pesquisa de mutações é complexa em função do número de genes associados e da variedade de alterações deletérias e não deletérias em cada gene. Os objetivos deste estudo foram identificar o subtipo genético dos pacientes brasileiros com AF, desenvolver uma estratégia de diagnóstico molecular aplicável à rotina clínica e correlacionar os genótipos encontrados com os fenótipos observados. Foram incluídos 255 pacientes AF, atendidos no ambulatório de Anemia de Fanconi do HC/UFPR, entre 1995 e 2012. Foi desenvolvido um teste de triagem para a identificação de 11 mutações frequentes nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* dos pacientes AF brasileiros. Nos casos identificados somente em heterozigose a segunda mutação envolvida foi investigada pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) e (ou) sequenciamento do DNA. Utilizando o teste de triagem proposto foi possível identificar alterações em 128 dos 255 pacientes (50,2%). Foram encontradas mutações no *FANCA* em 89/255 pacientes, no *FANCC* em 11/255 e no *FANCG* em 28/255. Em 71/128 pacientes foram encontradas mutações em homozigose e em 57/128 em heterozigose composta. Em quatro destes 57 a segunda mutação foi identificada ainda na triagem, em 51/57 foi necessário utilizar o MLPA e sequenciamento, e em dois pacientes não foi identificada a segunda mutação. Um total de 52 mutações diferentes foi encontrado, sendo 22 novas alterações ainda não descritas na literatura. O método proposto foi eficiente, pois permitiu a subtipificação genética de 126/255 (49,4%) pacientes. O uso desta estratégia possibilitou diminuir em 29,4% a necessidade do sequenciamento, além de dirigi-lo para um único gene em 20,0% dos casos heterozigotos. A redução do custo e do tempo torna viável a pesquisa de mutações como ferramenta para diagnóstico molecular da AF entre brasileiros. A análise da associação das mutações c.3788-3790delTCT e c.1077-2A>G com o fenótipo e às manifestações clínicas se restringiu aos dados disponíveis, porém foi limitada pelas dificuldades inerentes ao conteúdo dos prontuários. O uso desta estratégia de tipificação molecular em um maior número de pacientes permitirá a investigação mais ampla do efeito destas mutações na evolução clínica da AF.

**Palavras-chave:** Anemia de Fanconi. Mutação-genética. Genes AF.



## ABSTRACT

Fanconi Anemia (FA) is an autosomal recessive or X-linked disease, with wide genetic heterogeneity resulting from different mutations in genes which products are involved in DNA repair pathways and 16 genetic subtypes have been identified. The phenotypic variability makes clinical diagnosis difficult and laboratory tests are necessary for confirmation. The possible influence of genotype in clinical manifestations such as progressive bone marrow failure, leukemia and cancer may be better understood if the mutations within a genetic subtype are identified. The mutation's investigation is complex due to the number of associated genes and the variety of deleterious and non-deleterious mutations in each gene. The aims of this study were to identify genetic subtypes of Brazilian patients with FA, to develop a strategy for molecular diagnosis applicable to clinical routine, and to correlate genotypes with phenotypes. 255 patients from Fanconi Anemia Outpatient Clinic of HC/UFPR, from 1995 to 2012 were included. The initial strategy was a screening test which included eleven frequent mutations in FA Brazilian patients. In the heterozygous cases the second mutation was investigated by MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification), and/or DNA sequencing. Using the proposed screening test, mutations were identified in 128 out of 255 patients (50.2%). *FANCA* mutations were found in 89/255 patients, *FANCC* in 11/255 patients and *FANCG* in 28/255 patients. 71/128 patients showed homozygous mutations and 57/128 were found in heterozygosis. In four out of 57 heterozygous the second mutation was identified in the screening test, in 51/57 MLPA and sequencing were required. In two patients the second mutation involved was not identified. A total of 52 different mutations were found, 22 of them are new mutations not previously described. The proposed method was effective because it allowed the genetic subtyping of 126/255 (49.4%) patients. Using this strategy a 29.4% decrease in sequencing demand was observed as well as sequencing was driven to a single gene in 20.0% when heterozygous. Cost and time reduction makes it feasible to search for mutations as a tool for molecular diagnosis of FA Brazilian patients. Analysis of association of the mutations c.3788\_3790delTCT and c.1077-2A> G with the phenotype and the clinical manifestations was restricted to the available data, but limited by the difficulties relative to the content of the medical records. The use of this molecular typing strategy in a larger number of patients will allow more extensive investigation of the effect of these mutations in the clinical evolution of FA.

**Keywords:** Fanconi Anemia. Genetic Mutation. FA genes.

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SUBTIPOS GENÉTICOS DA ANEMIA DE FANCONI .....	34
QUADRO 2 - GRAUS DO COMPROMETIMENTO MEDULAR NA AF .....	44
QUADRO 3 - PAINEL INICIAL PARA A TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES AF BRASILEIROS .....	47
QUADRO 4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES PELOS MÉTODOS PCR E PCR-ARMS .....	50
QUADRO 5 - ENSAIOS DE RESTRIÇÃO PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NA AF .....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS 126 PACIENTES COM MUTAÇÕES DEFINIDAS.....	45
TABELA 2 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS EM 128 DOS 255 PACIENTES PELO TESTE DE TRIAGEM.....	56
TABELA 3 - MUTAÇÕES DETECTADAS NOS GENES <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> E <i>FANCG</i> EM 128 PACIENTES.....	58
TABELA 4 - NOVAS MUTAÇÕES DETECTADAS NOS GENES <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> E <i>FANCG</i> .....	60
TABELA 5 - RESULTADOS DA SEGREGAÇÃO DOS ALELOS NA FAMÍLIA ...	61
TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS 126 PACIENTES AF NAS REGIÕES GEOGRÁFICAS POR SUBTIPO GENÉTICO.....	64
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DAS MUTAÇÕES c.3788_3790delTCT E c.1077 - 2A>G NAS REGIÕES DO BRASIL.....	64
TABELA 8 - ASSOCIAÇÃO DAS MUTAÇÕES c.3788_3790delTCT E c.1077-2A> G COM O FENÓTIPO E AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES AF.....	65

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF E OUTRAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS NA VIA AF/BRCA .....	31
FIGURA 2 -	DISTRIBUIÇÃO DOS 255 PACIENTES POR REGIÃO DO PAÍS .....	43
FLUXOGRAMA 1 -	ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA A INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES EM PACIENTES BRASILEIROS COM AF .....	46
FIGURA 3 -	EXEMPLO DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO c.2853_19del 19 .....	48
FIGURA 4 -	EXEMPLO DE PCR-ARMS .....	49
FIGURA 5 -	EXEMPLO DE ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO APÓS A PCR .....	51
GRÁFICO 1 -	DISTRIBUIÇÃO DOS 126 PACIENTES AF DE ACORDO COM OS SUBTIPOS GENÉTICOS .....	63

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF	- Anemia de Fanconi
ALDH2	- Enzima aldeído desidrogenase 2
BRCA1	- <i>Breast Cancer Suscetibility Gene 1</i>
BRCA2	- <i>Breast Cancer Suscetibility Gene 2</i>
BRIP1	- <i>BRCA1-interacting protein 1</i>
DEB	- Diepoxibutano
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DP	- Desvio padrão
EGFP	- <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ERCC1	- <i>Excision repair cross-complementation group 1</i>
ERCC4	- <i>Excision repair cross-complementation group 4</i>
EtBr	- <i>Ethidium bromide</i>
FAAPs	- <i>Fanconi Anemia Associated Polypeptides</i>
GD	- Grande deleção
GVGD	- <i>Grantham Variation (GV) e Grantham Deviation (GD)</i>
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigens</i>
HPV	- <i>Human Papilloma Virus</i>
HR	- <i>Homologous repair</i>
IFAR	- <i>International Fanconi Anemia Registry</i>
iPS	- <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
LMA	- Leucemia Mielóide Aguda
SMD	- Síndrome mielodisplásica
MHF 1 e 2	- <i>M histone-fold heterodimer</i>
MLPA	- <i>Multiplex ligation probe amplification</i>
MMC	- Mitomicina C
MRE11	- Proteína reparadora do DNA com atividade nuclease, pode também designar o complexo de proteínas: MRE11, Rad50 e NSB1/Xrs2
MUS81-EME1	- Complexo de endonucleases estrutura-específica que atua na recuperação de forquilhas de replicação paralisadas
NAD <sup>+</sup>	- <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> (oxidado)
NADH	- <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> (reduzido)
NADPH	- <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase</i>
NER	- <i>Nucleotide Excision Repair</i>
NHEJ	- <i>Non-homologous end joining</i>
NSB	- <i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>

PALB2	- <i>Partner and Localizer of BRCA2</i>
pb	- Pares de bases
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR- ARMS	- <i>Amplification Refractory Mutation System- PCR</i>
PCR-RFLP	- <i>PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PHD finger	- <i>Plant homeodomain finger</i>
PHF9	- <i>PHD Finger Protein 9</i>
POLYPHEN2	- <i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
RAD51	- Proteína reparadora do DNA com atividade nuclease
SIFT	- <i>Sorting Intolerant from Tolerant</i>
SLX1	- Subunidade de endonucleases estrutura-específica
SLX4	- Subunidade de endonucleases estrutura-específica; <i>FANCP</i>
SMD	- Síndrome Mielodisplásica
SNPs	- Polimorfismos de nucleotídeo único
TCTH	- Transplante de células tronco hematopoéticas
TLS	- <i>Translesion synthesis</i>
UB	- Ubiquitina
UBE2T	- <i>Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2T</i>
USP1	- <i>Ubiquitin Specific Peptidase1</i>
UV	- <i>Unclassified Variants</i>
XPF	- <i>Xeroderma Pigmentosum Group F</i>
XRCC9	- <i>X-ray repair, complementing defective, in chinese hamster, 9; FANCG</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	OBJETIVO GERAL .....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
3.1	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA ANEMIA DE FANCONI .....	20
3.1.1	Anormalidades hematológicas e falência progressiva da medula óssea ...	21
3.1.2	Predisposição ao câncer.....	22
3.2	MOSAICISMO.....	23
3.3	INCIDÊNCIA DA ANEMIA DE FANCONI .....	25
3.4	FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA DE FANCONI .....	25
3.4.1	Fontes de danos ao DNA.....	26
3.4.1.1	Fontes endógenas .....	26
3.4.1.2	Agentes exógenos .....	27
3.4.2	Manutenção da integridade do genoma pela ativação da via AF/BRCA ...	27
3.4.3	Formação do complexo principal de proteínas AF.....	27
3.4.4	Monoubiquitinação do complexo intermediário FANCD2-FANCI.....	28
3.4.5	Reparo do DNA por recombinação homóloga .....	29
3.4.6	Atuação das proteínas AF no reparo por recombinação homóloga.....	29
3.4.7	Envolvimento das proteínas AF em outros mecanismos de reparo do DNA .....	32
3.4.7.1	Junção de terminações não homólogas .....	32
3.4.7.2	Excisão de nucleotídeos e síntese de DNA translesão (TLS).....	32
3.4.8	Papel do mecanismo AF/BRCA em novas alternativas para tratamento ...	33
3.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA DE FANCONI.....	35
3.5.1	Testes de instabilidade cromossômica .....	35
3.5.2	<i>Western blot</i> para detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 .....	36
3.5.3	Análise do prolongamento das fases G2/M do ciclo celular por citometria de fluxo.....	37
3.5.4	Ensaio de complementação ou subtipificação da AF.....	37

3.5.5	Pesquisa de mutações.....	38
3.5.6	Estratégias para o diagnóstico molecular da AF aplicável a rotinas clínicas.....	38
3.6	CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO .....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1	CASUÍSTICA .....	43
4.2	MÉTODOS.....	46
4.2.1	Extração do DNA.....	47
4.2.2	Seleção de mutações para a triagem dos genes <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> e <i>FANCG</i> .....	47
4.2.3	Métodos utilizados na triagem de mutações em <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> e <i>FANCG</i> .....	48
4.2.3.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	48
4.2.3.2	Sistema de Amplificação de Mutação Refratária (PCR-ARMS).....	49
4.2.3.3	Análise de fragmentos de restrição após a PCR (PCR- RFLP) .....	50
4.2.4	Métodos para identificação da segunda mutação patogênica .....	52
4.2.4.1	Triagem de deleções no gene <i>FANCA</i> por MLPA.....	52
4.2.4.2	Sequenciamento do DNA.....	53
4.2.5	Métodos estatísticos .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
5.1	MUTAÇÕES IDENTIFICADAS UTILIZANDO OS TESTES DE TRIAGEM PARA OS GENES <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> E <i>FANCG</i> .....	55
5.2	INVESTIGAÇÃO DA SEGUNDA MUTAÇÃO NOS 53 PACIENTES HETEROZIGOTOS UTILIZANDO OS MÉTODOS DE MLPA E SEQUENCIAMENTO .....	56
5.3	NOVAS MUTAÇÕES DETECTADAS ENTRE OS 126 PACIENTES INVESTIGADOS .....	59
5.4	SEGREGAÇÃO DAS MUTAÇÕES NAS FAMÍLIAS DOS PACIENTES AF....	60
5.5	DISTRIBUIÇÃO DOS 126 PACIENTES INVESTIGADOS NOS SUBTIPOS GENÉTICOS.....	62
5.6	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS PACIENTES COM AF NOS QUAIS FORAM IDENTIFICADAS MUTAÇÕES .....	63
5.7	EFEITO DAS MUTAÇÕES AF NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA.....	64
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>



<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE 1 - DADOS FENOTÍPICOS, DEMOGRÁFICOS E AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS RELATIVAS AOS 126 PACIENTES SUBTIPIFICADOS .....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE 2 - DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NOS 87 PACIENTES COM ALTERAÇÕES NO GENE <i>FANCA</i>.....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE 3 - DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NOS 11 PACIENTES COM ALTERAÇÕES NO GENE <i>FANCC</i>.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE 4 - DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NOS 28 PACIENTES COM ALTERAÇÕES NO GENE <i>FANCG</i> .....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE 5 - DISTRIBUIÇÕES DE FREQUENCIAS DOS DADOS FENOTÍPICOS E DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS 126 PACIENTES DE ACORDO COM AS MUTAÇÕES IDENTIFICADAS .....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE 6 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS FENOTÍPICOS E DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS 126 PACIENTES DE ACORDO COM AS MUTAÇÕES IDENTIFICADAS .....</b>	<b>106</b>
<b>APÊNDICE 7 - ESTIMATIVA DE CUSTOS COM REAGENTES E INSUMOS PARA SUBTIPIFICAÇÃO GENÉTICA DE 100 PACIENTES....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO CEP/HC/UFPR .....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES.....</b>	<b>118</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome de instabilidade genômica que afeta múltiplos órgãos, e que se caracteriza por anormalidades congênitas, suscetibilidade aumentada ao câncer e falência progressiva da medula óssea, sendo esta a maior causa de morbidade e mortalidade dos pacientes (CROSSAN; PATEL, 2012; KEE; D'ANDREA, 2012).

A AF é causada por mutações bialélicas ou em raros casos ligada ao X (*FANCB*), em pelo menos um dos 16 genes descritos (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG/XRCC9*, *FANCI*, *FANCJ/BRIP1*, *FANCL/PHF9*, *FANCM*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51C*, *FANCP/SLX4* e *FANCQ/XPF-ERCC4* (VAZ *et al.*, 2010; STOEPKER *et al.*, 2011; KEE; D'ANDREA, 2012; BOGLIOLO *et al.*, 2013).

Investigações a respeito da patogênese molecular subjacente à AF revelam um mecanismo celular que atua na manutenção da integridade do genoma envolvendo as proteínas AF. Mutações deletérias ocorridas nos genes que codificam estas proteínas geram disfunções neste mecanismo de reparo do DNA e resultam em muitas das características clínicas e celulares observadas na AF (DEANS; WEST, 2011; KOTTEMANN; SMOGORZEWSKA, 2013; GARAYCOECHEA; PATEL, 2014).

A variabilidade fenotípica dificulta o diagnóstico clínico, sendo necessária a complementação por métodos laboratoriais. Células AF apresentam hipersensibilidade a agentes indutores de ligações cruzadas do DNA. Com base nesta característica foram desenvolvidos testes de instabilidade cromossômica, ainda hoje utilizados para diagnóstico da AF (AUERBACH, 1993; OOSTRA *et al.*, 2012).

Um diagnóstico rápido e preciso desta doença é essencial uma vez que afeta significativamente as decisões no tratamento e no monitoramento dos pacientes. Essa necessidade levou ao desenvolvimento de métodos laboratoriais que possibilitam a definição dos subtipos genéticos pela identificação dos genes e das mutações envolvidas na AF (CASTELLA *et al.*, 2011a; AMEZIANE *et al.*, 2012; GILLE *et al.*, 2012).

A Unidade de Hematologia, Hemoterapia e Oncologia (UHHO) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), na qual está inserido o Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO), tem uma grande casuística de

pacientes com AF e uma experiência de mais de 30 anos no atendimento clínico e laboratorial, tendo realizado até dezembro de 2013 um total de 312 transplantes em 280 pacientes. O ambulatório de Anemia de Fanconi realiza mais de 400 atendimentos por ano e tem aproximadamente 200 pacientes em acompanhamento em um programa de atendimento sistematizado aos pacientes com AF. Diante da experiência deste elevado número de casos, foi considerado relevante implantar métodos que permitam uma ampla caracterização destes pacientes.

O presente estudo propõe uma estratégia para a investigação molecular de pacientes brasileiros, iniciando pela triagem de mutações nos genes que apresentam maior frequência na AF (*FANCA*, *FANCC* e *FANCG*). Os casos não conclusivos devem ser investigados pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*), seguido da análise da sequência dos genes.

Esta estratégia possibilitará a caracterização molecular destes pacientes buscando a redução do tempo de execução e do custo, tornando viável o uso da pesquisa de mutações como ferramenta para o diagnóstico dos pacientes brasileiros com AF.

As informações obtidas com a investigação molecular podem viabilizar o aconselhamento genético às famílias, a identificação de portadores, o desenvolvimento de testes genéticos pré-natais e a realização de estudos para correlacionar o genótipo identificado com o fenótipo e as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o subtipo genético de pacientes brasileiros com Anemia de Fanconi e desenvolver uma estratégia de diagnóstico molecular aplicável à rotina clínica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer os métodos para a triagem de mutações mais frequentemente encontradas nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* entre pacientes AF brasileiros.
- Analisar a sequência dos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* por técnicas de MLPA e sequenciamento para a identificação de mutações novas ou de menor frequência nos pacientes brasileiros.
- Identificar a frequência das mutações investigadas nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* para estabelecer uma nova estratégia de subtipificação genética de pacientes AF brasileiros.
- Investigar a influência de mutações específicas sobre o fenótipo e as características clínicas apresentadas pelos pacientes com Anemia de Fanconi.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Em 1927 o pediatra suíço, Guido Fanconi descreveu uma família na qual três irmãos apresentavam microcefalia, hiperpigmentação da pele e desenvolveram anemia grave com macrocitose e pancitopenia, que foi a causa de óbito desses pacientes entre os cinco e sete anos de vida. Desde 1931, pacientes com combinações variadas dessas características são classificados como portadores de Anemia de Fanconi (FANCONI, 1967; HAYS; MEYER; VAN DE VRUGT, 2012).

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA ANEMIA DE FANCONI

É consensual entre os autores a grande heterogeneidade clínica da AF. Alguns pacientes apresentam um fenótipo relativamente discreto, com desenvolvimento normal do esqueleto, alterações hematológicas subclínicas e sobrevida de mais de 30 anos. Outros mostram manifestações fenotípicas mais expressivas, com anormalidades esqueléticas graves, aparecimento precoce das disfunções da medula óssea e câncer, que são as causas de óbito na primeira década de vida (CROSSAN; PATEL, 2012; KEE; D'ANDREA, 2012; GARAYCOECHEA; PATEL, 2014).

A idade média ao diagnóstico é de 6,5 anos sendo semelhante em ambos os gêneros feminino e masculino, porém pode variar desde o nascimento até a idade adulta. Mesmo diante dos avanços no tratamento e no conhecimento da fisiopatologia desta doença, a sobrevida média é de 23 anos (AUERBACH, 2009; SHIMAMURA; ALTER, 2010; CROSSAN; PATEL, 2012).

Pacientes AF podem apresentar diversas anormalidades ao nascer incluindo baixa estatura, pigmentação anormal da pele (manchas café com leite e hipopigmentação), malformações dos rins, do coração e do esqueleto, especialmente envolvendo os polegares, que podem estar ausentes, supranumerários ou hipoplásico e o braço, ocorrendo em geral hipoplasia ou ausência do rádio. Podem apresentar ainda, microcefalia, fenda palpebral estreita, deficiência auditiva, hipogonadismo, fertilidade reduzida e atraso no desenvolvimento mental. O grau de comprometimento varia

desde o desenvolvimento fetal normal até anormalidades graves que podem levar ao aborto espontâneo ou à morte ao nascer. Alguns pacientes são fisicamente normais, o que faz com que a ausência de malformações não exclua o diagnóstico (KUTLER *et al.*, 2003b; KEE; D'ANDREA, 2012).

Estudos indicam que na AF ocorre aumento da apoptose dependente de p53 durante a embriogênese devido à incapacidade de as proteínas AF repararem danos ao DNA. Esta morte celular inapropriada pode resultar em malformações congênitas durante o desenvolvimento embrionário (CROSSAN; PATEL, 2012).

### 3.1.1 Anormalidades hematológicas e falência progressiva da medula óssea

Anormalidades hematológicas representam as manifestações clínicas mais prevalentes na AF, em torno de 75% a 90% dos pacientes desenvolvem insuficiência da medula óssea. Em geral, os pacientes com AF apresentam contagens normais em sangue periférico ao nascimento, mas passam a apresentar pancitopenia progressiva em torno dos sete anos de vida. A primeira indicação de disfunção da medula óssea é a macrocitose seguida da redução das contagens celulares em sangue periférico (trombocitopenia, leucopenia e anemia), sendo a medula óssea inicialmente normocelular, tornando-se progressivamente hipoplásica (TULPULE *et al.*, 2010).

Células progenitoras da medula óssea de fetos AF também apresentam níveis elevados de p53 e p21, o que pode levar a depleção das reservas hematopoéticas embrionárias. O desenvolvimento de moléculas inibidoras de p53 poderia restabelecer a apoptose das células hematopoéticas em níveis normais. No entanto, o risco aumentado de incidência de leucemias é ainda o maior obstáculo (CECCALDI *et al.*, 2012; KEE; D'ANDREA, 2012).

### 3.1.2 Predisposição ao câncer

Além da falência progressiva da medula óssea, a predisposição ao câncer é outra característica marcante da AF especialmente Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Síndrome Mielodisplásica (SMD). O risco de ocorrência de LMA na AF é aproximadamente 700 a 800 vezes mais elevado do que na população em geral (ROSENBER *et al.*, 2003). Segundo Alter *et al.* (2010) a incidência acumulada de LMA é de 10% aos 20 a 30 anos e SMD é de 40% aos 50 anos.

A probabilidade de desenvolver tumores sólidos, particularmente Carcinoma de Células Escamosas, envolvendo especialmente cabeça, pescoço, esôfago e região ano-genital, também está aumentada. Pacientes AF tem uma incidência de câncer de células escamosas de cabeça e pescoço de 500 a 700 vezes maior do que a população geral, e há uma incidência acumulada de 14% deste tipo de câncer aos 40 anos. A maioria dos tumores associados com AF desenvolve-se após os 14 anos de vida (KUTLER *et al.*, 2003a; ALTER *et al.*, 2005; ALTER *et al.*, 2010; AUERBACH, 2009; PASQUINI; ZANIS-NETO, 2003; SALUM *et al.*, 2006).

Rosenberg *et al.* (2005) compararam a ocorrência de Câncer de Células Escamosas em pacientes AF que receberam transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) e pacientes com AF da mesma idade não transplantados. Foi observada uma probabilidade 4,4 vezes maior de desenvolver câncer de células escamosas após o transplante. A doença do enxerto contra o hospedeiro representou um fator de risco elevado para o desenvolvimento deste tipo de câncer enquanto que pacientes com doador aparentado totalmente compatível tinham uma probabilidade de 60% de estarem vivos e sem câncer após dez anos ou mais do TCTH.

Existe a hipótese dos tumores de cabeça e pescoço e tumores ginecológicos estarem associados à infecções por HPV (*Human Papilloma Virus*). Em um estudo norte-americano, 85% dos tumores investigados foram positivos para HPV, porém em um estudo europeu foi observada a associação com HPV em somente 10% dos casos de tumores sólidos. Ainda assim, é recomendada a vacinação da população de pacientes AF (KUTLER, 2003; VAN ZEEBURG *et al.*, 2008; DEANS; WEST, 2011).

O câncer de mama também ocorre, o que é condizente com o fato de pelo menos cinco dos genes AF estarem associados ao câncer de mama familiar: *BRCA2/FANCD1*, *BACH1/FANCJ*, *PALB2/FANCN*, *RAD51C/FANCO* e *SLX4/FANCP* (KUPFER, 2013).

Essa predisposição tão aumentada ao câncer deve-se à grande instabilidade genética das células AF que as torna mais propensas a translocações em proto-oncogenes e a deleção de genes supressores de tumor. É possível que uma única ligação cruzada que ocorra espontaneamente no DNA, se não reparada, seja suficiente para induzir uma translocação oncogênica em células AF. Outra possibilidade é a apoptose induzida por danos ao DNA que não são reparados, levando ao aumento da morte celular e à depleção especialmente do *pool* de células tronco hematopoéticas. A proliferação repetitiva das células tronco remanescentes para a manutenção da homeostase pode propiciar a seleção de clones tumorigênicos de forma mais rápida (DEANS; WEST, 2011).

Vários estudos sugerem que os tumores sólidos se tornarão o problema clínico predominante em pacientes com AF (ALTER, 2002; DUFOUR; SVAHN, 2008; KEE; D'ANDREA, 2012).

### 3.2 MOSAICISMO

O mosaicism genético na Anemia de Fanconi é resultante da reversão de mutações deletérias hereditárias, fenômeno este que restabelece as funções normais de um dos alelos envolvidos (HIRSCHHORN, 2003; CASTELLA *et al.*, 2011a).

Segundo dados da literatura, em torno de 15 a 25% dos pacientes AF apresentam evidências de mosaicism, que ocorre espontaneamente em células precursoras hematopoéticas (TEN FOE *et al.*, 1997; SOULIER *et al.*, 2005).

Os mecanismos capazes de gerar reversão nas células AF ainda não foram completamente elucidados. Os mais conhecidos envolvem recombinação mitótica intragênica e conversão gênica em pacientes heterozigotos compostos, em que um alelo está para restabelecer a sequência normal do outro. Dentre outros mecanismos



descritos, incluem-se as alterações secundárias compensatórias na sequência do DNA (WAISFISZ *et al.*, 1999, CROSSAN; PATEL, 2012).

As consequências clínicas do mosaicismo na AF ainda são pouco conhecidas e sua presença pode contribuir para a variabilidade dos distúrbios hematológicos observados entre os pacientes. Em células revertidas, eventos genéticos adquiridos ao longo do tempo produzem um gene AF funcional que confere resistência à agentes genotóxicos. É possível que as células hematopoéticas revertidas adquiram uma vantagem proliferativa sobre as células com mutações deletérias e, com isso, favoreça uma reposição progressiva das células defeituosas da medula óssea (SOULIER *et al.*, 2005). Dependendo do estágio de diferenciação em que a célula se encontra, no momento em que a correção do gene ocorre, a reversão pode afetar todas as linhagens hematopoéticas, levando à correção do defeito hematológico. No entanto, a correção de células em estágios de diferenciação mais avançados pode afetar somente algumas linhagens e não resultar em uma melhora da condição hematológica do paciente.

A reversão somática tem sido apontada como terapia gênica natural. Essas células revertidas poderiam ser isoladas, expandidas *in vitro* e infundidas no paciente como um transplante autólogo. Contudo, existem questões sobre a capacidade de as células revertidas manterem este genótipo codificador de proteínas AF funcionais por tempo prolongado. Além disso, as células AF não revertidas continuam com o potencial para desenvolvimento de anormalidades clonais (LAI-CHEONG; McGRATH; UITTO, 2011).

O mosaicismo de células hematopoéticas pode trazer complicações ao diagnóstico. O método de referência para o diagnóstico baseia-se na fragilidade dos cromossomos de pacientes AF aos efeitos indutores de ligações cruzadas do DNA. Estes testes são realizados em linfócitos T do sangue periférico e a presença de um número superior a 50% de células revertidas pode tornar os resultados ambíguos ou até falso-negativos (CASTELLA *et al.*, 2011a). Em pacientes que apresentam quadro clínico sugestivo e teste em sangue periférico negativo é recomendável confirmar o diagnóstico utilizando um tecido alternativo, em geral fibroblastos da pele ou testes moleculares (SOULIER *et al.*, 2005; GILLE *et al.*, 2012).

### 3.3 INCIDÊNCIA DA ANEMIA DE FANCONI

A incidência da AF pode variar de um em cada 360 mil até um em cada 100 mil indivíduos nascidos vivos entre as populações já estudadas. A frequência geral de portadores na população dos Estados Unidos é de aproximadamente um em 181, que é significativamente mais elevada do que a historicamente descrita por Swift (1976), de 1 em 300. Estima-se que essa frequência de portadores pode ser ainda mais elevada, em torno de 1 em cada 100, em certos grupos étnicos como os judeus Ashkenazi (ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011; KOTTEMANN; SMOGORZEWSKA, 2013). Até o momento não foram realizados estudos da incidência ou de frequência de portadores da AF no Brasil.

### 3.4 FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA DE FANCONI

Investigações acerca de doenças genéticas raras são alvo de interesse em pesquisa pelo desafio da busca por melhor sobrevida e descoberta de alternativas terapêuticas. Os resultados de alguns desses estudos levaram ao entendimento de mecanismos ainda desconhecidos subjacentes ao funcionamento normal das células.

Um exemplo é o estudo da fisiopatologia da AF que possibilitou a descoberta de um novo mecanismo de reparo do DNA, necessário à proteção do genoma humano contra um tipo específico de dano definido como "ligações cruzadas do DNA".

As ligações cruzadas do DNA são extremamente tóxicas para as células porque impedem separação da dupla hélice de DNA devido à ocorrência de ligações covalentes irreversíveis entre as bases nitrogenadas do DNA, em fitas complementares. Esta separação é fundamental para processos celulares como a replicação e a transcrição (DEANS; WEST, 2011).

### 3.4.1 Fontes de danos ao DNA

#### 3.4.1.1 Fontes endógenas

As ligações cruzadas do DNA podem ser decorrentes de estresse oxidativo, dada a falha na detoxificação de espécies reativas de oxigênio.

Os acetaldeídos (CH<sub>3</sub>CHO) são subprodutos do metabolismo dos aldeídos, comumente presentes nos alimentos e são muito reativos ao oxigênio. Sua detoxificação é feita por enzimas aldeído desidrogenases (ALDH2), tendo como acceptor de elétrons o sistema NAD<sup>+</sup>/NADH, resultando em acetato (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). Estima-se que 8% da população mundial é portadora de mutações negativas dominantes no gene *ALDH2* o que impede a detoxificação do acetaldeído (BROOKS et al., 2009).

Langevin *et al.* (2011) mostraram evidências de que acetaldeídos acumulados são potentes indutores de danos ao DNA porque causam ligações cruzadas. Com este estudo foi comprovado que a via de interação das proteínas AF tem um papel importante para contrapor a ação do acetaldeído, levando ao reparo das ligações cruzadas assim formadas.

Pacientes AF podem ser expostos a fontes endógenas de danos ao DNA ainda durante a vida uterina. Pelo fato de apresentarem defeitos nas proteínas de reparo do DNA ficam predispostos a malformações congênitas, falência da medula óssea pela depleção das reservas hematopoéticas e ao câncer (CECCALDI *et al.*, 2012; JOENJE, 2011; GARAYCOECHEA *et al.*, 2012; GARAYCOECHEA; PATEL, 2014).

Antes da descoberta da genotoxicidade decorrente do acúmulo de fatores endógenos hiper-reativos ao oxigênio existia dificuldade em estabelecer a relação entre as mutações dos genes AF e as manifestações hematológicas dos pacientes. Esses estudos possibilitaram correlacionar a função reparadora das proteínas AF ao desenvolvimento normal da hematopoese (TULPULE *et al.*, 2010; CECCALDI *et al.*, 2012; GARAYCOECHEA; PATEL, 2014).

Pesquisas que conduzam à descoberta de moléculas ou compostos naturais que possam reduzir os danos oxidativos ao DNA podem ser alternativas terapêuticas promissoras para a manutenção da hematopoese na AF (ZHANG et al., 2008).

### 3.4.1.2 Agentes exógenos

Agentes exógenos como a radiação ultravioleta, a radiação ionizante e os quimioterápicos também podem gerar este tipo de dano ao DNA. Entre os quimioterápicos, destacam-se a historicamente utilizada mostarda nitrogenada e seus derivados, hoje amplamente empregados, como a ciclofosfamida e melfalan, ou ainda mitomicina C (MMC) e cisplatina, em geral utilizados em associação com derivados nitrogenados. Cada agente indutor de ligações cruzadas no DNA apresenta especificidade por bases nitrogenadas distintas resultando em alterações que podem levar a diferentes respostas celulares (DEANS; WEST, 2011).

### 3.4.2 Manutenção da integridade do genoma pela ativação da via AF/BRCA

A necessidade de manter a integridade do genoma é compartilhada por todos os organismos vivos. Diferentes mecanismos são utilizados, a maioria dos quais originados das formas mais primitivas de vida. Em humanos, defeitos nessas vias estão associados à predisposição ao câncer. A via de interação de proteínas AF/BRCA surgiu tardiamente durante a evolução e existe na forma completa apenas em vertebrados. A Figura 1 apresenta as etapas da interação das proteínas AF na via AF/BRCA para o reparo do DNA. Esta via, na qual as proteínas AF participam, é essencial para a replicação do DNA isento de erros (KEE; D'ANDREA, 2012).

### 3.4.3 Formação do complexo principal de proteínas AF

Entre os 16 produtos dos genes associados à AF identificados até o momento, oito deles (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM) formam um complexo nuclear, definido como complexo principal de proteínas AF. Sempre que ocorre uma ligação cruzada no DNA, a replicação é interrompida porque as fitas

não podem ser separadas. Nesse momento o complexo principal é recrutado à cromatina pela proteína FANCM.

Essa proteína reconhece a estrutura ramificada do DNA estabelecida durante a replicação, paralisada pela presença de uma ligação cruzada e liga-se a ela. As histonas MHF1 e MHF2 facilitam a associação da FANCM à cromatina, bem como a sua migração ao longo da fita de DNA. O complexo formado entre MHF1 e MHF2 e FANCM tem a função principal de dirigir o complexo principal para o sítio danificado do DNA (DEANS; WEST, 2011; WALDEN; DEANS, 2014).

#### 3.4.4 Monoubiquitinação do complexo intermediário FANCD2-FANCI

Uma vez que o complexo principal é ativado, pela detecção de uma ligação cruzada no DNA pela FANCM, ele passa a exercer a sua função principal que é a monoubiquitinação das proteínas FANCD2 e FANCI. Estas proteínas são expressas como um heterodímero, também chamado de complexo intermediário ID.

Uma característica importante da resposta aos danos do DNA é o direcionamento das proteínas envolvidas nos processos de reparo para o foco intranuclear, sendo necessárias certas modificações pós-traducionais como a adição de uma molécula de ubiquitina (monoubiquitinação) nas proteínas FANCD2 e FANCI. Uma vez que estas proteínas marcadas atingem o foco nuclear, ocorre a transdução de sinais que levam ao prolongamento do ciclo celular para que o reparo e a replicação ocorram.

A monoubiquitinação atua, portanto, sobre a atividade, localização e a capacidade de as proteínas formarem interações com outras proteínas.

O processo de ubiquitinação é conduzido por uma cascata de três enzimas: E1, E2, E3. A enzima E1 ativa a molécula de ubiquitina pela hidrólise de ATP e transfere esta molécula para a enzima E2 que tem atividade ubiquitina conjugase. A enzima E3 tem atividade ubiquitina ligase e possibilita a transferência da molécula de ubiquitina conjugada para o substrato além de conferir especificidade a ligação.

A E2 ubiquitina conjugase que leva à monoubiquitinação da FANCD2 é a enzima UBE2T (*Ubiquitine-conjugating Enzyme 2T*) e a proteína FANCL apresenta o domínio PHD tipo "RING *finger*", que tem atividade E3 ligase. A atividade E3 da FANCL

permite a transferência direta da ubiquitina conjugada com a E2 (UBE2T) para o domínio específico do substrato, que é a FANCD2 (GURTAN; STUCKERT; D'ANDREA, 2006).

Uma vez monoubiquitinado, o complexo ID tem a capacidade de reconhecer as estruturas de DNA que vão sendo liberadas da forquilha de replicação. A FANCD2 ubiquitinada é um sinal para o recrutamento de proteínas de atuação a jusante, que têm afinidade com a ubiquitina e que atuam diretamente no reparo do DNA (SATO *et al.*, 2012; KOTTEMANN; SMOGORZEWSKA, 2013).

#### 3.4.5 Reparo do DNA por recombinação homóloga

A via de reparo mais importante que é regulada pelas proteínas AF é a recombinação homóloga (HR). Esse processo de reparo pode ocorrer entre quaisquer duas moléculas de DNA com regiões de sequência de nucleotídeos similares, não necessariamente idênticas. Tais regiões semelhantes se alinham, suas sequências homólogas ficam pareadas e ocorre o reparo da fita danificada, tendo como molde a fita homóloga. A molécula central no mecanismo de recombinação homóloga é a proteína RAD51, que forma filamentos de nucleoproteína no DNA e promove a troca entre as sequências homólogas (GODTHELP *et al.*, 2006).

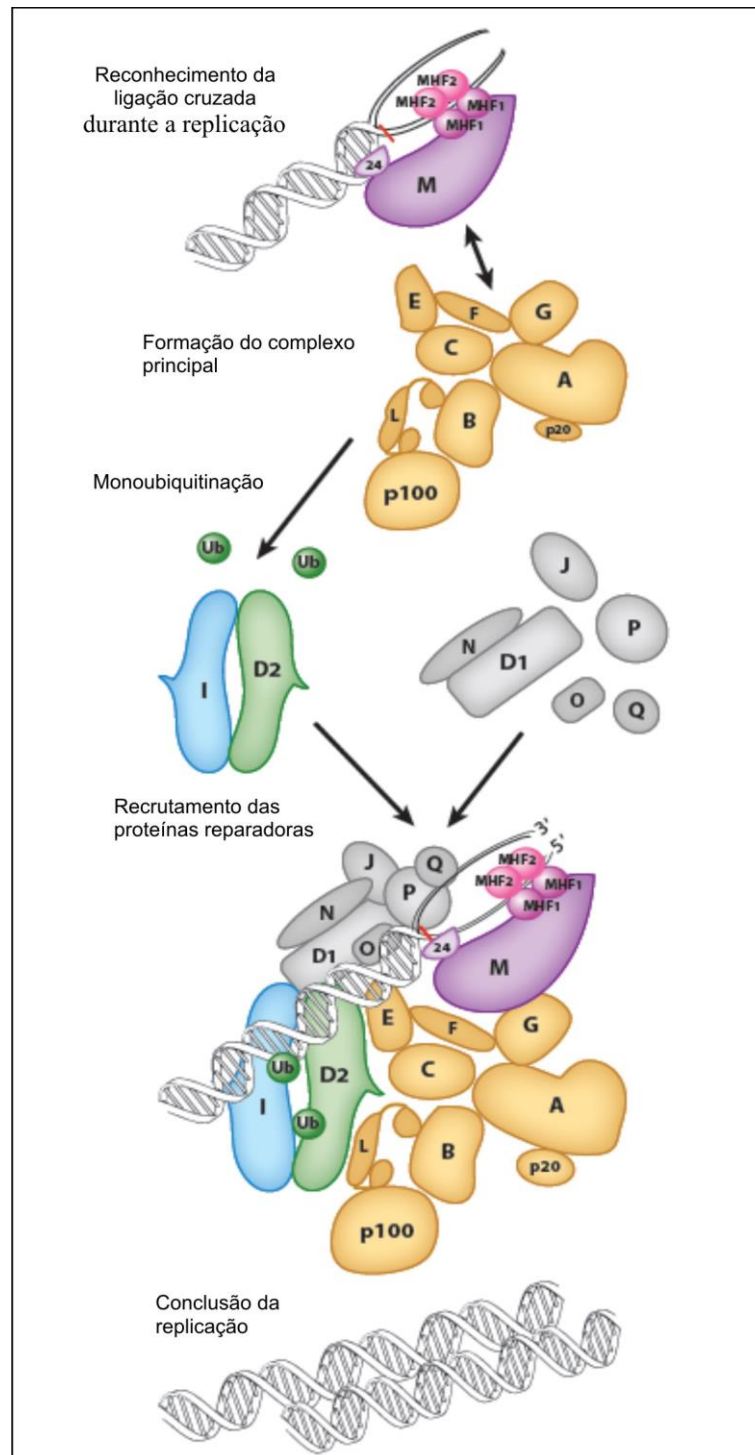
#### 3.4.6 Atuação das proteínas AF no reparo por recombinação homóloga

Células deficientes em qualquer uma das proteínas AF são incapazes de promover a recombinação homóloga. Sabe-se que o complexo ID monoubiquitinado desloca-se para o local onde ocorreu o dano ao DNA e associa-se às proteínas de atuação a jusante, que são FANCD1/BRCA2; FANCN/PALB2 e possivelmente FANCO/RAD51C; FANCI/BACH1; FANCP/SLX4 e FANCD2/ERCC1 (LONG *et al.*, 2011; KEE; D'ANDREA, 2012; WALDEN; DEANS, 2014).

As proteínas AF do complexo principal, que atuam a montante da ubiquitinação do complexo ID, são necessárias para que a recombinação homóloga ocorra; porém, acredita-se que a falha no reparo por HR gerada por danos em uma destas proteínas é menos grave quando comparada à perda de função de uma das proteínas de atuação a jusante. As proteínas do complexo principal e do complexo intermediário exercem suas funções dentro da via de AF/BRCA interagindo entre si. Já as proteínas de atuação a jusante, além de atuarem com proteínas AF/BRCA, também interagem com outras proteínas reparadoras do DNA fora desta via como BRCA1 e proteínas do complexo RAD51 (LONG *et al.*, 2011; KEE; D'ANDREA, 2012). Esta pode ser uma possível explicação para as diferenças fenotípicas observadas entre os subtipos genéticos de atuação a jusante. Pacientes com mutações bialélicas nos genes *FANCD1/BRCA2*, *FANCN/PALB2* apresentam fenótipos mais graves, desenvolvem leucemia mais precocemente e tumores embrionários nos dois primeiros anos de vida (KEE; D'ANDREA, 2012; KOTTEMANN; SMOGORZEWSKA, 2013).

A desativação da via AF/BRCA ainda não foi completamente elucidada. Sabe-se, no entanto, que a monoubiquitinação da proteína FANCD2 é dinâmica e reversível. Uma proteína que tem uma função clara é a enzima USP1 (*Ubiquitin Specific Peptidase1*), que remove a molécula de ubiquitina da proteína FANCD2. Tanto a ativação quanto a desativação do mecanismo são importantes para a manutenção da viabilidade celular diante de danos causados pelas ligações cruzadas no DNA (NIJMAN; HUANG; DIRAC, 2005; KOTTEMANN; SMOGORZEWSKA, 2013).

FIGURA 1 - INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS AF E OUTRAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS NA VIA AF/BRCA



FONTE: Adaptado de Walden e Deans (2014)

NOTA: Representação esquemática da interação de proteínas AF durante o reparo de ligações cruzadas do DNA. A proteína FANCM reconhece a ligação cruzada do DNA e recruta o complexo principal de proteínas AF para o sítio danificado. O complexo principal monoubiquitina as proteínas FANCD2 e FANCI. A monoubiquitinação da FANCD2/FANCI estabiliza este complexo intermediário e promove sua retenção na forquilha de replicação. A seguir o reparo completo se dá pela excisão de nucleotídeos (NER) seguida de recombinação homóloga (HR) controlada pelas proteínas AF reparadoras FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCI/BRIP1, FANCO/RAD51C, FANCP/SLX4 e FANCO/ERCC4. Após o reparo o complexo AF/BRCA é desativado e a replicação é concluída.



### 3.4.7 Envolvimento das proteínas AF em outros mecanismos de reparo do DNA

As proteínas AF promovem o reparo do DNA por outros mecanismos, além da recombinação homóloga.

#### 3.4.7.1 Junção de terminações não homólogas

O mecanismo de junção de terminações não homólogas (NHEJ) é uma alternativa ao reparo por HR quando não houver disponibilidade de uma cromátide irmã para servir de molde, porém sujeito a erros. Esse mecanismo é uma opção quando ocorrem danos ao acaso, induzidos por agentes químicos ou por radiação ionizante e a cromatina está compactada. Na AF ocorre ativação inapropriada desses mecanismos, que resulta em um acúmulo de aberrações cromossômicas durante a fase S do ciclo celular (KEE; D'ANDREA, 2010).

#### 3.4.7.2 Excisão de nucleotídeos e síntese de DNA translesão (TLS)

As proteínas AF também coordenam os mecanismos de excisão de nucleotídeos e síntese de DNA translesão (*Translesion synthesis* - TLS) durante o reparo de ligações cruzadas. Os modelos atuais que descrevem o reparo do DNA sugerem que o desbloqueio da forquilha de replicação requer a separação das duas fitas do DNA que contém a ligação cruzada. Para tanto, uma das fitas é removida pela ação de endonucleases para que a outra seja liberada da ligação cruzada e possa ocorrer o reparo. Após a excisão de uma das fitas, ocorre a síntese translesão, que é um mecanismo que tolera erros, no qual atuam polimerases de baixa fidelidade que ignoram regiões danificadas (MOLDOVAN; D'ANDREA, 2009; KEE; D'ANDREA, 2012).

Entre as endonucleases recrutadas para a remoção e o desengate das ligações cruzadas estão MUS81-EME1, o complexo XPF/ERCC4-ERCC1, FAN1, SLX4 e SLX1. As endonucleases SLX4 e XPF/ERCC4 foram identificadas como décimo quinto (FA-P)

e décimo sexto (FA-Q) subtipos genéticos da AF, que atuam no reparo do DNA após a ubiquitinação da FANCD2 (STOEPKER *et al.*, 2011; BOGLIOLO *et al.*, 2013).

Diversas outras proteínas associadas integram a via AF/BRCA. Entre estas estão a FAAP20, FAAP24, FAAP100 e as histonas associadas à FANCM, MHF1 e MHF2. Células que expressam deficiência nestas proteínas, *in vitro*, apresentam fenótipo AF clássico, incluindo sensibilidade aumentada a agentes indutores de ligações cruzadas. Contudo, ainda não foram identificados pacientes AF que apresentem mutações nestes genes, razão pela qual estes não recebem a designação FANC, na sua nomenclatura (KEE; D'ANDREA, 2012).

O Quadro 1 apresenta os subtipos genéticos da AF conhecidos, os respectivos genes, a localização nos cromossomos e os produtos gerados.

#### 3.4.8 Papel do mecanismo AF/BRCA em novas alternativas para tratamento

Quanto maior o entendimento da via de interação das proteínas AF no reparo do DNA e as suas associações a outras proteínas reparadoras, maior a possibilidade do desenvolvimento de estratégias para tratamento da AF e de doenças malignas.

A reprogramação direta de células somáticas AF em células pluripotentes induzidas (iPS) poderia fornecer uma fonte inovadora de células autólogas. Porém, a falha no reparo e o acúmulo de danos causados ao DNA das células dos pacientes AF são obstáculos à reprogramação. Embora esta seja considerada uma alternativa terapêutica promissora, ainda apresenta risco oncogênico elevado, e métodos mais seguros precisam ser desenvolvidos (MÜLLER *et al.*, 2012; KEE; D'ANDREA, 2012).

Defeitos nos mecanismos de reparo podem levar ao câncer, em contrapartida podem sensibilizar células cancerígenas aos quimioterápicos que atuam com base em ligações cruzadas do DNA (DEANS; WEST, 2011). Já se sabe como as células reconhecem, reparam e até mesmo desenvolvem resistência a agentes indutores de ligações cruzadas do DNA, como a cisplatina e com isso podem levar a falha de resposta ao tratamento. Algumas pesquisas têm sido feitas para identificar moléculas inibidoras da via AF/BRCA, que poderiam sensibilizar novamente células resistentes ao tratamento quimioterápico (CHIRNOMAS *et al.*, 2006; JENKINS; KAN; HOATLIN, 2012).

QUADRO 1 - SUBTIPOS GENÉTICOS DA ANEMIA DE FANCONI

SUBTIPOS DA AF	GENES DA AF	LOCALIZAÇÃO NOS CROMOSSOMOS	PRODUTOS DOS GENES AF	pMM DAS PROTEÍNAS AF (kDa)	FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS AF
FA-A	<i>FANCA</i>	16q24.3	FANCA	163	Função estrutural no complexo principal da AF
FA-B	<i>FANCB</i>	Xp22.31	FANCB	95	Função estrutural no complexo principal da AF
FA-C	<i>FANCC</i>	9p22.3	FANCC	63	Função estrutural no complexo principal da AF
FA-D1	<i>FANCD1(BRCA2)</i>	13q12-13	FANCD1/BRCA2	380	Recrutamento da RAD51 e promove reparo por HR
FA-D2	<i>FANCD2</i>	3p25.3	FANCD2	155, 162	FANCD2 monoubiquitinada – recruta FANCP e outras à cromatina
FA-E	<i>FANCE</i>	6p21-22	FANCE	60	Função estrutural no complexo principal da AF. Possível adaptador para FANCD2
FA-F	<i>FANCF</i>	11p15	FANCF	42	Função estrutural no complexo principal da AF
FA-G	<i>FANCG (XRCC9)</i>	9p13	FANCG	68	Função estrutural no complexo principal da AF
FA-I	<i>FANCI</i>	15q25-26	FANCI	150	FANCI monoubiquitinada – Subunidade do heterodímero FANCD2- FANCI
FA-J	<i>FANCJ (BRIP1)</i>	17q22 –q24	FANCJ/BRIP1	130	Helicase – desespiraliza o DNA no sentido 5'→3'. Promove HR associada à BRCA1, FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C
FA-L	<i>FANCL (PHF9)</i>	2p16.1	FANCL/PHF9	43	E3 ubiquitina ligase do complexo principal AF
FA-M	<i>FANCM</i>	14q21.2	FANCM	250	Função helicase e DNA <i>translocase</i> do complexo principal AF
FA-N	<i>FANCN (PALB2)</i>	16p12.1	FANCN/PALB2	130	Mediador da interação BRCA1/BRCA2 na HR
FA-O	<i>FANCO(RAD51C)</i>	17q22	FANCO/RAD51C	43	Promove HR e interage com o complexo RAD51
FA-P	<i>FANCP(SLX4)</i>	16p13.3	FANCP/SLX4	200	Promove Incisões no local das ligações cruzadas. Interage com outras nucleases do complexo XPF-ERCC1
FA-Q	<i>FANCQ (XPF-ERCC4)</i>	16p13.12	FANCQ/XPF-ERCC4	100	Promove Incisões no local das ligações cruzadas. Interage com outras nucleases do complexo XPF-ERCC1

FONTE: Adaptado de Kee e D'Andrea (2012); Crossan e Patel (2012); Kupfer (2013)

### 3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA DE FANCONI

Anemia de Fanconi é uma doença rara com manifestações clínicas bastante heterogêneas. Além disso, alguns dos sintomas podem sobrepor aos observados em outras síndromes. Por isso muitas vezes esta doença é subdiagnosticada.

Todos as crianças e adultos jovens com síndromes de falência medular, com ou sem malformações físicas características, devem ser submetidos aos testes de diagnóstico laboratorial com o objetivo de confirmar ou descartar o diagnóstico de AF. Outras situações específicas como a presença de macrocitose sem causa conhecida, Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA) também podem ser consideradas (AUERBACH, 2009; PINTO *et al.*, 2009).

Utilizando critérios como esses, aproximadamente 70 a 80% dos pacientes encaminhados para diagnóstico resultam negativos. Esses pacientes possivelmente apresentam outras causas para a falência da medula óssea e muito frequentemente representam casos de Anemia Aplástica Adquirida (OOSTRA *et al.*, 2012).

#### 3.5.1 Testes de instabilidade cromossômica

Schroeder, Anschütz e Knopp (1964) descreveram a alta frequência de quebras cromossômicas formadas espontaneamente em células de pacientes com AF. Posteriormente foi observado que essa instabilidade genômica poderia ser induzida por agentes indutores de ligações cruzadas do DNA, tais como: diepoxibutano (DEB), mitomicina C (MMC) ou cisplatina. Isso levou ao desenvolvimento dos primeiros testes de diagnóstico para AF (SASAKI; TONOMURA, 1973; AUERBACH; WOLMAN, 1976).

Os testes de instabilidade cromossômica são métodos citogenéticos considerados como referência para o diagnóstico da AF. O DEB e a MMC, ainda amplamente utilizados, são testes de alta sensibilidade e boa reprodutibilidade. Os resultados são apresentados pela quantificação do número de aberrações cromossômicas por células, assim como em porcentagem de células com aberrações. A precisão do diagnóstico pode ser comprometida entre os pacientes que apresentam mosaicismo

somático ou ainda diante de outras síndromes de instabilidade cromossômica como *Nijmegen Breakage* (NBS), síndrome de *Roberts* ou ainda síndrome de *Warsaw* (AUERBACH, 1993; AUERBACH, 2009, CASTELLA *et al.*, 2011a; OOSTRA *et al.*, 2012).

### 3.5.2 *Western blot* para detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2

O método de *western blot* descrito por Shimamura *et al.* (2002) permite a detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 em linfócitos do sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina P (PHA-P) em cultura primária. A falha na monoubiquitinação da proteína FANCD2 em decorrência de alterações nas proteínas formadoras do complexo principal impede a interação das proteínas AF/BRCA no reparo do DNA e conseqüentemente resulta na expressão fenotípica de muitas das características observadas na AF. A ausência da forma monoubiquitinada da FANCD2 (FANCD2-L) correlaciona-se com o diagnóstico da AF por ser uma característica específica desta doença (SHIMAMURA *et al.*, 2002).

Esse teste, segundo Soulier *et al.* (2005), quando associado à clínica do paciente e aos testes de quebras cromossômicas, permite uma melhor caracterização dos pacientes AF porque possibilita identificar a etapa da via AF/BRCA que se encontra alterada (SHIMAMURA *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2009).

O estudo de 84 pacientes brasileiros, DEB positivos, para a investigação do fenótipo da proteína FANCD2 pelo método de *western blot* (PILONETTO *et al.*, 2009) mostrou em 91,7% dos pacientes a ausência da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 (FANCD2S+/FANCD2L-). Em 2,4% dos pacientes ambas as isoformas estavam ausentes (FANCD2S-/FANCD2L-) e em 5,9% dos pacientes uma expressão normal da FANCD2 ubiquitinada foi detectada sugerindo a hipótese de mosaicismos somáticos ou o envolvimento de mutações em genes de atuação a jusante. Esses achados estão em concordância com os dados internacionais que mostram que os subtipos genéticos de atuação a montante e que apresentam o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L- representam 90% dos casos de AF (SOULIER *et al.*, 2005).

### 3.5.3 Análise do prolongamento das fases G2/M do ciclo celular por citometria de fluxo

Outro método diagnóstico sugerido por Seyschab *et al.* (1995) é a detecção do prolongamento das fases G2/M do ciclo celular. Neste teste, fibroblastos da pele ou linfócitos do sangue periférico são expostos à MMC e analisados por citometria de fluxo a fim de detectar a porcentagem de células presentes na fase G2 do ciclo celular. Um grande número de células na fase G2 pode indicar o diagnóstico de AF. Entretanto, a presença de leucemias pode interferir no resultado.

### 3.5.4 Ensaio de complementação ou subtipificação da AF

Os métodos empregados na determinação dos grupos de complementação utilizam células em proliferação que são transduzidas com vetores retrovirais que carregam diferentes sequências 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). Alguns vetores retrovirais coexpressam marcadores fluorescentes, como EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). O ensaio fundamenta-se na correção do prolongamento das fases G2/M do ciclo celular, evidenciada pela exposição das células corrigidas a agentes indutores de ligações cruzadas do DNA, analisadas por citometria de fluxo (CHANDRA *et al.*, 2005).

As transduções por meio de retrovírus têm sido utilizadas para identificar o subtipo AF como uma etapa anterior à investigação de mutações (HANENBERG *et al.*, 2002). O conhecimento do gene envolvido facilita a triagem de mutações, porém requer uma linhagem de células sensível a agentes indutores de ligações cruzadas em expansão, o que nem sempre é facilmente estabelecida. Existe a possibilidade do envolvimento de novos grupos de complementação, o que não pode ser diferenciado de resultados falso negativos em razão da falha da transdução em complementar o defeito funcional apresentado pela célula. Além disso, é necessário um laboratório especializado, com equipamentos e tecnologia disponíveis para que esse tipo de análise seja realizado com sucesso (CHANDRA *et al.*, 2005).

### 3.5.5 Pesquisa de mutações

A identificação de mutações específicas na AF é bastante complexa em função do grande número de genes associados a esta doença, além dos diferentes tipos de mutações encontrados em cada um deles. Essa investigação pode requerer métodos simples como a amplificação pela PCR (reação em cadeia da polimerase), mas em geral são necessários métodos de maior complexidade como a detecção de grandes deleções por técnicas de MLPA e o sequenciamento direto do DNA. Entre os genes envolvidos estão o *FANCA*, que tem 43 exons e 80.000 pares de bases, o *BRCA2*, que tem 27 exons e 109.441 pares de bases, o *FANCD2*, que tem 44 exons, 82.502 pares de bases e é flanqueado por dois pseudogenes (*KALB et al.*, 2007). Sendo assim, os pacientes devem ser previamente diagnosticados pelos testes de quebras cromossômicas e então seguir com a identificação das mutações (*AMEZIANE et al.*, 2008).

### 3.5.6 Estratégias para o diagnóstico molecular da AF aplicável a rotinas clínicas

Gille *et al.* (2012) sugeriram uma estratégia para a investigação de mutações que permite o diagnóstico molecular da AF.

Determinadas populações apresentam mutações mais frequentes, possivelmente devido a um efeito fundador, cuja pesquisa direta pode definir o diagnóstico. Informações sobre a origem étnica dos pacientes AF podem fornecer indicações sobre mutações patogênicas específicas frequentemente associadas a esta doença.

A mutação c.456+4 A>T (IVS4+ 4A>T) do gene *FANCC* foi encontrada em 80% dos pacientes Judeus Ashkenazi com AF e a mutação c.295C>T em *FANCA* estava presente em todos os 40 casos de AF em ciganos espanhóis (*CASTELLA et al.*, 2011b). A mutação c.3788\_3790delTCT do gene *FANCA* foi identificada em 30% dos pacientes brasileiros investigados (*MAGDALENA et al.*, 2005). Essas mutações podem ser investigadas diretamente por métodos simples como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou PCR- ARMS (*Amplification Refractory Mutation System- PCR*).

Se a pesquisa inicial de mutações sabidamente frequentes for negativa, segue-se com a pesquisa de deleções em *FANCA*. Já foi demonstrado que mutações em *FANCA* contribuem com pelo menos em 60 a 70% de todos os casos AF e que aproximadamente 15 a 40% das mutações neste gene são grandes deleções (AMEZIANE *et al.*, 2012).

O método de MLPA é indicado para a identificação de grandes deleções. Após esta investigação, deve-se seguir com o sequenciamento dos 43 exons do *FANCA* que permite a detecção de mutações nas sequências codificantes do gene (GILLE *et al.*, 2012).

Quando não forem detectadas mutações no gene *FANCA* devem prosseguir com a investigação dos genes *FANCC*, *FANCE*, *FANCF* e *FANCG* utilizando técnicas de sequenciamento direto do DNA.

Se as mutações AF não forem detectadas nos genes supracitados e os pacientes forem do sexo masculino, pode-se partir para a análise do gene *FANCB*, ligado ao cromossomo X, utilizando a técnica de MLPA e complementado com sequenciamento do DNA quando pertinente.

Após a investigação dos genes *FANCA*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* e *FANCB*, aproximadamente 85% dos casos AF têm o diagnóstico molecular definido (AMEZIANE *et al.*, 2008; GILLE *et al.*, 2012).

Em relação aos demais 15%, estes podem ter uma mutação não identificada nos genes já estudados devido às limitações dos métodos utilizados ou apresentarem mutações em outros genes envolvidos com menor frequência na AF. A pesquisa de mutações nesses pacientes requer a utilização de novas tecnologias que permitam uma investigação mais abrangente (KNIES *et al.*, 2012; AMEZIANE *et al.*, 2012). O sequenciamento completo do exoma, utilizando a tecnologia de sequenciamento de próxima geração, permite a investigação não apenas dos genes AF, mas também de outros genes candidatos (KNIES *et al.*, 2012; DE ROCCO *et al.*, 2014). Outra abordagem é o sequenciamento de todo o genoma que possibilita a detecção de novos genes ainda não identificados.

Algumas alternativas também podem ser utilizadas para seguir com a investigação desses pacientes quando houver informações sobre os resultados da pesquisa da proteína FANCD2 pelo *western blot*. Se ambas as isoformas da FANCD2 estiverem ausentes (FANCD2S-/FANCD2L-), sugere-se a investigação do gene *FANCD2*



pelo sequenciamento do DNA complementar (KALB *et al.*, 2007). Quando somente a forma não monoubiquitinada da proteína FANCD2 for detectada, é preciso pesquisar mutações nos genes *FANCM* e *FANCL*, seguidos pelo gene *FANCI*. Se nenhuma mutação for encontrada, deve-se considerar a hipótese do envolvimento de um gene ainda não descoberto, com atuação a montante na via AF/BRCA.

Na presença de ambas as isoformas da FANCD2, deve-se investigar os genes de atuação a jusante. Pacientes dos subtipos FA-D1 e FA-N são gravemente afetados e geralmente desenvolvem LMA ou tumores sólidos antes dos cinco anos de idade (XIA *et al.*, 2007). Se o paciente apresentar este fenótipo clínico, deve-se iniciar pela pesquisa de grandes deleções nos genes *FANCD1/BRCA2* e *FANCN/PALB2* empregando a técnica de MLPA seguido do sequenciamento quando necessário. Se os resultados forem negativos, prosseguir com o sequenciamento dos exons dos genes *FANCI/BRIP1*, *FANCO/RAD51C*, *FANCP/SLX4* e *FANCC/ERCC4*.

Se após essa extensa investigação os resultados permanecerem negativos, deve-se considerar a hipótese de um novo gene AF a jusante da via AF/BRCA ou a possibilidade de o paciente apresentar outras síndromes de instabilidade cromossômica como *Nijmegen Breakage* (NBS), síndrome de *Roberts* ou ainda síndrome de *Warsaw* (GENNERY *et al.*, 2004; VAN DER LELIJ *et al.*, 2010). Em pacientes com mosaïcismo, é possível identificar pelo menos uma das mutações AF e a segunda mutação pode ser caracterizada por meio da análise de amostras dos pais.

Com o uso de técnicas de sequenciamento genético, é possível que novas mutações, ditas UV (*Unclassified Variants*), sejam identificadas. Essas novas variantes podem ser avaliadas quanto a sua patogenicidade por meio de algoritmos de predição *in silico* (SIFT, POLYPHEN2, Align GVGD) (TAVTIGIAN *et al.*, 2008; KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009; ADZHUBEI *et al.*, 2010). O método padrão para testar patogenicidade é o ensaio de transfecção celular sendo possível verificar a capacidade do produto alélico em complementar o defeito celular apresentado por linhagens AF deficientes. No entanto, esses testes são laboriosos, dispendiosos e requerem laboratórios de pesquisa com tecnologia específica (GILLE *et al.*, 2012).

### 3.6 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Poucos estudos de correlação genótipo-fenótipo foram realizados na AF, sendo todos eles retrospectivos. Isso porque é uma doença de ocorrência rara na população, o que torna difícil a análise dos aspectos clínicos (FAIVRE *et al.*, 2000; KUTLER *et al.*, 2003b; ROSENBERG; HUANG; ALTER, 2004; ROSENBERG; ALTER; EBELL, 2008; NEVELING *et al.*, 2009).

No início das investigações moleculares acreditava-se que cada grupo de complementação descrito poderia conferir características distintas aos pacientes. Porém, tornou-se claro que o tipo de mutação subjacente é mais importante do que o subtipo genético, definido pelo gene que está afetado. Surpreendentemente poucas conexões específicas genótipo-fenótipo foram estabelecidas. Isso se deve ao fato da grande complexidade das características fenotípicas geradas, além de outros fatores menos previsíveis poderem influenciar o fenótipo, tais como: fatores epigenéticos, ontogenéticos, étnicos e ambientais. (NEVELING *et al.*, 2009).

No entanto, há exemplos de mutações idênticas associadas a fenótipos clínicos diferentes. Este fenômeno pode ser observado não só em indivíduos não consanguíneos, mas até mesmo entre indivíduos da mesma família. A identificação do mosaicismosomático, pela investigação da AF em tecido não hematopoético, e investigações moleculares poderiam contribuir com a definição desses casos (AUERBACH, 2009; NEVELING *et al.*, 2009).

Há dois grandes estudos que tentaram encontrar associações entre grupo de complementação e evolução clínica dos pacientes. O estudo apresentado por Faivre *et al.* (2000), que avaliou 245 pacientes do *European Fanconi Anemia Research Group*, concluiu que os pacientes FA-G tiveram citopenia mais grave e uma maior incidência de leucemia em comparação a outros grupos de complementação. Possivelmente a alta proporção de falência da medula óssea observada em pacientes do grupo FA-G nesse estudo se deve a casos de pancitopenia neonatal em pacientes com a mutação c.1649delC do gene *FANCG*, descrita por Landmann *et al.* (2004), bastante frequente nesta população. Outro estudo relevante foi apresentado por Kutler *et al.* (2003b), envolvendo 754 pacientes registrados no IFAR (*International Fanconi Anemia Registry*). Esse estudo relatou a manifestação precoce de disfunções da medula

óssea, bem como menor sobrevida global para pacientes FA-C quando comparados a pacientes dos grupos FA-A e FA-G, exatamente o oposto do resultado do estudo europeu. No entanto, a coorte do IFAR contém um maior número de pacientes com a mutação c.456 + 4A>T no intron 4 e a mutação c.1642C>T do exon14 do gene *FANCC* em contraste com os pacientes do grupo europeu, nos quais prevalece a mutação c.67delG que leva a manifestações clínicas mais brandas (KUTLER; AUERBACH, 2004; NEVELING *et al.*, 2009).

Grandes investimentos têm sido feitos no aperfeiçoamento dos métodos moleculares que possibilitem identificar genótipos que afetem a sobrevida global dos pacientes por conferir maior complexidade na sua evolução clínica. Essa informação pode ser de grande relevância para o acompanhamento clínico do paciente no que se refere ao prognóstico e o momento ideal para intervenções terapêuticas.

Novas alternativas tanto para tratamento como para um diagnóstico mais preciso requerem o conhecimento detalhado dos genes AF e suas mutações. Quanto maior o entendimento da interação dos genes AF e o seu papel no reparo do DNA, maior a possibilidade de desenvolvimento de estratégias para tratamento da AF e de outras doenças malignas.

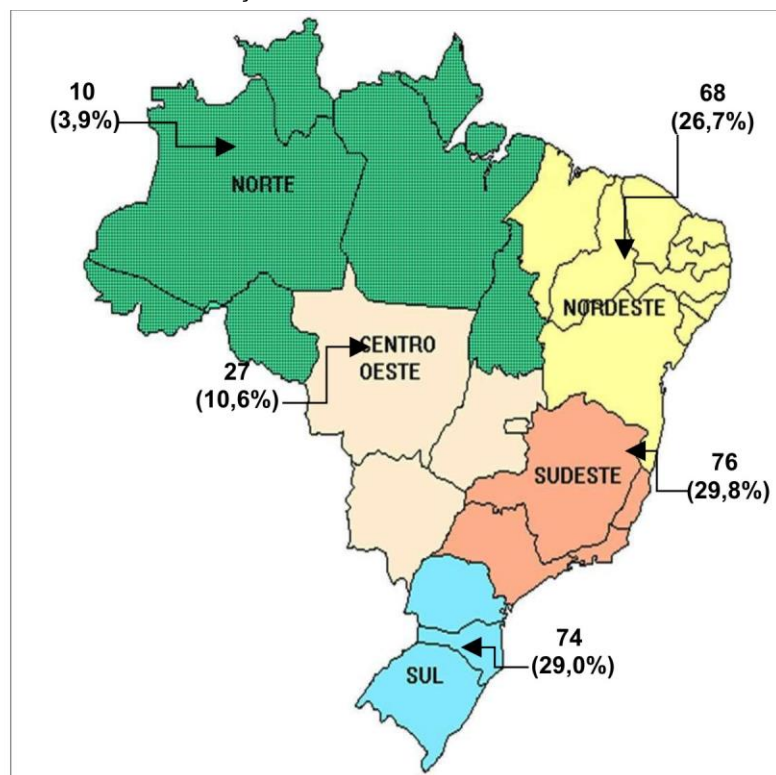
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo 255 pacientes brasileiros com AF, todos de diferentes famílias (probandos), cujo diagnóstico foi confirmado pelo teste citogenético de instabilidade cromossômica (Teste do DEB). Todos foram provenientes do Ambulatório de Anemia de Fanconi do Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC/UFPR, atendidos entre 1995 e 2012.

A distribuição dos 255 pacientes de acordo com a origem geográfica encontra-se na figura 2.

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS 255 PACIENTES POR REGIÃO DO PAÍS



FONTE: A autora

Os 255 pacientes foram submetidos ao teste de triagem de mutações. O presente estudo prosseguiu com os 126 pacientes nos quais foram identificadas mutações sendo que destes, 24 pacientes foram previamente triados quanto à presença da mutação c.3788\_3790delTCT (MAGDALENA *et al.*, 2005), dos quais 13 foram

detectados em homozigose e 11 foram identificados em heterozigose e tiveram a segunda mutação investigada no presente estudo.

Foram excluídos dois dos 255 pacientes identificados em heterozigose porque não foi possível detectar a segunda mutação envolvida. Os demais 127 pacientes não tiveram mutações identificadas pelo teste de triagem.

A Tabela 1 apresenta as características clínicas e fenotípicas dos 126 pacientes nos quais foram detectadas mutações e a distribuição destes nas regiões do país. O Apêndice 1 apresenta as características individuais dos 126 pacientes.

Estes dados foram obtidos da revisão de prontuários, onde as informações relativas à origem geográfica, à classificação étnica, ao gênero, à consanguinidade e às malformações não são influenciadas pela fase da doença e podem ser consideradas fidedignas. Os dados relativos à idade ao diagnóstico, definida pela data do resultado do teste de quebras cromossômicas, situação hematológica ao diagnóstico, necessidade de TCTH, ocorrência do óbito e idade do óbito podem ser influenciados pelas diferentes fases da doença em que cada paciente se encontra.

A classificação étnica dos 126 pacientes foi feita de acordo com a cor da pele, traços fisionômicos e ascendência. A extensão das malformações foi definida de acordo com o número de sítios anatômicos envolvidos em ausentes (nenhum sítio envolvido), limitadas (<3 sítios) e extensas (3 ou mais sítios, sendo que deve envolver um órgão interno) (GUARDIOLA *et al.*, 2000).

Os dados hematológicos representam o momento do diagnóstico. Foram estabelecidos graus de citopenia conforme os estágios do comprometimento medular descritos no Quadro 2.

QUADRO 2 - GRAUS DO COMPROMETIMENTO MEDULAR NA AF

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

FONTE: Guardiola *et al.* (2000); Kutler *et al.* (2003b)

Os critérios para a indicação do TCTH são a pancitopenia com necessidade transfusional ou a ocorrência de SMD ou Leucemia. Os pacientes não transplantados

incluem aqueles que não tinham um doador compatível e os que foram a óbito precocemente. Nove pacientes abandonaram o seguimento clínico.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC/UFPR (Anexo 1). Os pacientes foram incluídos após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 2 e 3), exceto aqueles que foram a óbito ou abandonaram o seguimento.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS 126 PACIENTES COM MUTAÇÕES DEFINIDAS

CARACTERÍSTICA	NÚMERO DE PACIENTES	FREQUÊNCIAS (%)
<b>ORIGEM GEOGRÁFICA</b>		
Região Sul	42	33,3
Região Sudeste	41	32,5
Região Centro-oeste	15	11,9
Região Nordeste	24	19,1
Região Norte	04	3,2
<b>CLASSIFICAÇÃO ÉTNICA</b>		
Branços	79	62,7
Mulatos	37	29,3
Negros	06	4,8
Indígenas	02	1,6
Asiáticos	01	0,8
ND	01	0,8
<b>GÊNERO</b>		
Feminino	58	46,0
Masculino	68	54,0
<b>CONSANGUINIDADE</b>		
Consanguíneos	30	23,8
Não consanguíneos	93	73,8
ND	03	2,4
<b>MALFORMAÇÕES</b>		
Ausentes	05	4,0
Limitadas	75	59,5
Extensas	44	34,9
ND	02	1,6
<b>IDADE AO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL</b>		
Mediana	125	07 anos (0,08 a 25 anos)
Média		7,6 anos (DP= 4,5 anos)
<b>SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA AO DIAGNÓSTICO</b>		
Grau I	07	5,5
Grau II	65	51,6
Grau III	53	42,1
ND	01	0,8
<b>TCTH</b>		
Sim	84	66,7
Não	41	32,5
ND	01	0,8
<b>VIVOS / ÓBITOS</b>		
Vivos	79	62,7
Óbitos	38	30,2
ND	09	7,1
<b>IDADE AO ÓBITO</b>		
Mediana	38	11 anos (05 a 31 anos)
Média		12,6 (DP = 7,0 anos)

FONTE: Bancos de dados do Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC/UFPR

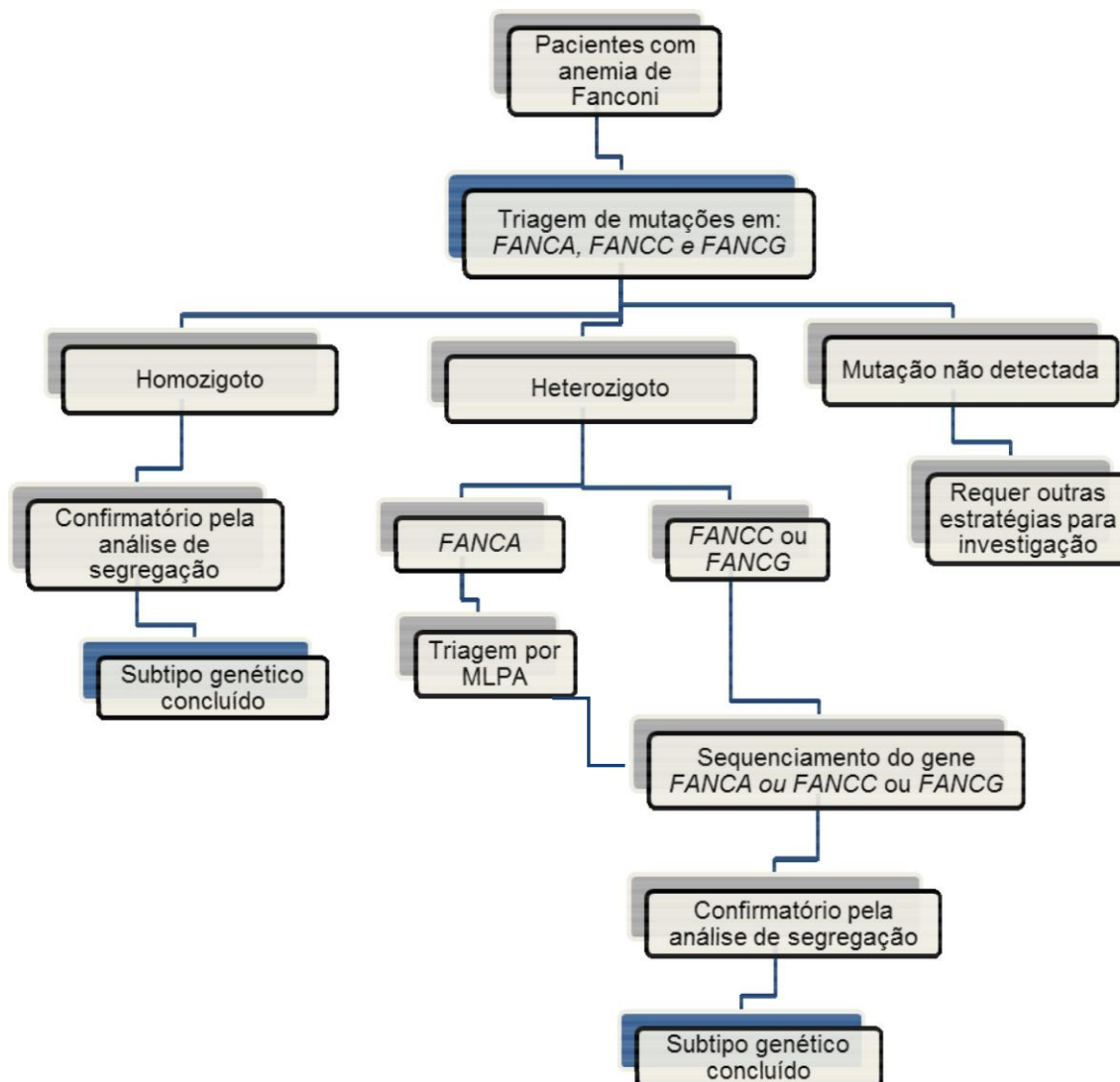
NOTA: ND = não determinado; TCTH = transplante de células tronco hematopoéticas; DP= desvio padrão; situação hematológica grau I (sem falência medular); grau II (falência medular inicial); grau III (falência medular avançada)

## 4.2 MÉTODOS

A estratégia adotada para a investigação molecular dos pacientes AF brasileiros incluídos neste estudo envolveu as seguintes etapas:

1. Triagem de mutações com a pesquisa direta de alterações frequentes nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*.
2. Triagem de grandes deleções no gene *FANCA* pelo método de MLPA.
3. Sequenciamento das regiões codificantes dos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* quando apenas um dos alelos mutados foi detectado na triagem de mutações.

FLUXOGRAMA 1 - ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA A INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES EM PACIENTES BRASILEIROS COM AF



FONTE: A autora

#### 4.2.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico coletado em EDTA utilizando o método de *salting out* modificado descrito por Miller, Dykes e Polesky (1988).

#### 4.2.2 Seleção de mutações para a triagem dos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*

Foram selecionadas onze mutações previamente descritas nos genes *FANCA* (5 mutações), *FANCC* (4 mutações) e *FANCG* (2 mutações) para compor o painel inicial de triagem (quadro 3). A seleção das mutações foi baseada em dados da literatura especialmente em estudos nos quais pacientes brasileiros foram incluídos, como: Gibson *et al.* (1996); Levrán *et al.* (1997); Auerbach *et al.* (2003); Levrán *et al.* (2005); Magdalena *et al.* (2005) e Yates *et al.* (2006). Também foram utilizados os dados do *Fanconi Anemia Mutation Database* (<http://www.rockefeller.edu/fanconi>). Neste site estão disponibilizadas informações sobre as frequências das diferentes mutações já descritas em todos os 16 genes conhecidos da AF.

QUADRO 3 - PAINEL INICIAL PARA A TRIAGEM DE MUTAÇÕES EM PACIENTES AF BRASILEIROS

MUTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	GENE	REFERÊNCIAS
c.987_990delTCAC	Exon 11	<i>FANCA</i>	Levrán <i>et al.</i> (1997)
c.2535_2536delCT	Exon 27	<i>FANCA</i>	Levrán <i>et al.</i> (1997)
c. 2853-19del19	29i	<i>FANCA</i>	Levrán <i>et al.</i> (1997)
c.3788_3790delTCT	Exon 38	<i>FANCA</i>	Levrán <i>et al.</i> (1997)
c.1115_1118delTTGG	Exon 13	<i>FANCA</i>	Apostolou <i>et al.</i> (1996)
c.1393 C>T	Exon 13	<i>FANCC</i>	Yates <i>et al.</i> (2006)
c.65G>A	Exon 1	<i>FANCC</i>	Gibson <i>et al.</i> (1996)
c.456+4 A>T	04i	<i>FANCC</i>	Whitney <i>et al.</i> (1993)
c. 67delG	Exon 1	<i>FANCC</i>	Strathdee; Duncan; Buchwald (1992)
c.1077-2A>G	08i	<i>FANCG</i>	Demuth <i>et al.</i> (2000)
c.1480+1G>C	Exon 11	<i>FANCG</i>	Auerbach <i>et al.</i> (2003)

FONTE: A autora



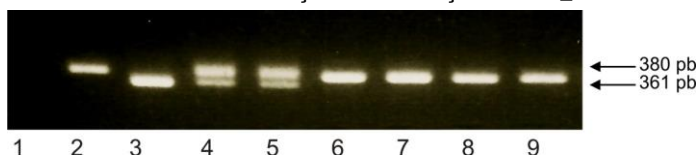
#### 4.2.3 Métodos utilizados na triagem de mutações em *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*

Os métodos empregados foram: a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR); o sistema de amplificação de mutações refratárias (PCR-ARMS); e a análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição após a PCR (PCR-RFLP).

##### 4.2.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O método de PCR foi utilizado para a detecção da mutação c.2853\_19del 19 do gene *FANCA*. Foram utilizados 15 µL de mistura de reação contendo 10 ng de DNA, 80 mM de TrisHCl (pH 9,0), 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM de NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase sob condições de PCR convencionais (5 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 61°C, 30 segundos a 72°C e um ciclo final de 5 min a 72°C). Após a amplificação, utilizando oligonucleotídeos específicos, os indivíduos normais apresentaram fragmentos de 380 pares de bases (pb) e os pacientes com esta mutação em homozigose um único fragmento com 361 pb devido à deleção de 19 pb do intron 29 do gene *FANCA*. Nos indivíduos heterozigotos foram detectados um fragmento de 380 pb e outro de 361 pb. Os produtos da PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 7% com brometo de etídio (EtBr). Este procedimento foi adaptado de Levran *et al.*(1997). A Figura 3 é um exemplo de PCR.

FIGURA 3 - PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO c.2853\_19del 19



FONTE: A autora

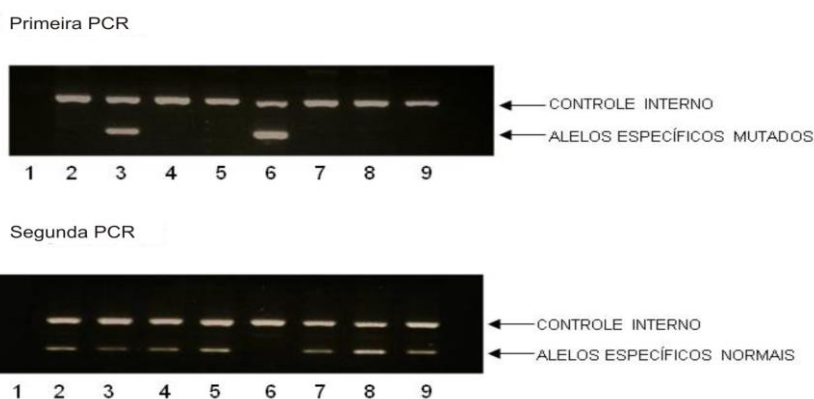
NOTA: PCR - 1 controle negativo; 2 controle normal (um fragmento de 380 pb); 3 controle positivo (um fragmento de 361 pb); 4 e 5 amostras heterozigotas para a mutação c.2853\_19del 19 (um fragmento de 380 pb e outro de 361 pb); 6,7,8 e 9 amostras negativas para a mutação c.2853\_19del 19 (um fragmento de 380 pb).

#### 4.2.3.2 Sistema de Amplificação de Mutação Refratária (PCR- ARMS)

O método de PCR-ARMS foi utilizado para a pesquisa das mutações c.1115\_1118delTTGG, c.2535\_2536delCT e c.987\_990delTCAC do gene *FANCA*. As sequências alteradas foram detectadas em dois estágios: uma primeira PCR com oligonucleotídeos *forward* complementares a sequência mutante e oligonucleotídeos reversos normais que amplificam exclusivamente os alelos mutados; e uma segunda PCR com oligonucleotídeos *forward* e reverso complementares a sequência normal que amplificam especificamente o alelo normal. O exon 1 da  $\beta$ -globina foi amplificado simultaneamente como controle interno da reação. Foram utilizados 15  $\mu$ L de mistura de reação contendo 10 ng de DNA, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,1 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase. As condições da PCR para a c.1115\_1118delTTGG foram: 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, 30 segundos a 72°C e um ciclo final de 5 minutos a 72°C. A amplificação da c.2535\_2536delCT requer temperatura de anelamento a 61°C e da c.987\_990delTCAC anelamento a 64°C. Os procedimentos foram adaptados de Levran *et al.* (1997).

A Figura 4 apresenta um exemplo de PCR-ARMS em gel de agarose com brometo de etídio. Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados utilizando o programa *Primer3Plus* (UNTERGASSER *et al.*, 2007) descritos no Quadro 4.

FIGURA 4 – EXEMPLO DE PCR-ARMS



FONTE: A autora

NOTA: PCR-ARMS – 1 controle negativo, 2 controle normal (ausência de amplificação com oligonucleotídeo complementar a sequência mutada e presença de amplificação com o oligonucleotídeo complementar a sequência normal), 3 controle positivo heterozigoto (amplificação com ambos os oligonucleotídeos) 4, 5, 7, 8 e 9 amostras negativas (mesma interpretação do controle normal) e 6 amostra positiva em homozigose (amplificação com oligonucleotídeo mutado e ausência de amplificação com oligonucleotídeo complementar a sequência normal).

QUADRO 4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES PELOS MÉTODOS PCR E PCR-ARMS

MUTAÇÃO	GENE	METODO	OLIGONUCLEOTÍDEOS	PRODUTO (pb)
c.2853_19 del19	FANCA	PCR	30F: 5'GTCCCCGAGCCGCCAGTC3' 30R: 3'AAGGCAGACCCACCCTAAG5'	380/361
c.1115_1118delTTGG	FANCA	ARMS	1115delF: 5'GCTGAGTGCAGAGGAGTTAGC3' 1115NF: 5'GCTGAGTGCAGAGGAGTTAGT3' 13R: 5'GTGGGAAGGGCTTCACTGAG3'	234
c.2535_2536delCT	FANCA	ARMS	2535-2536delF: 5'CAGCAGCAATTTCTTACTCTATG3' 2535-2536NF: 5' CAGCAGCAATTTCTTACTCTATC3' 2535-2536R: 5'CTGCCTAAGCAGACAGCAG3'	282
c.987_990delTCAC	FANCA	ARMS	987-990delF: 5'ATACCCTGACTCAGATACTCACA3' 987-990R: 5'GTAACAATCTCAGGCATCTG3' 987-990NF: 5' ATACCCTGACTCAGATACTCACTCAC3'	220
Controle Interno	HBB	ARMS	HBB-F: 5'AGTCAGGGCAGAGCCATCTA3' HBB-R: 5'GCCATAACAGCATCAGGAG3'	377

FONTE: Levran *et al.* (1997)

#### 4.2.3.3 Análise de fragmentos de restrição após a PCR (PCR- RFLP)

Foi utilizada a amplificação pela PCR seguida da análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição obtidos com enzimas específicas (PCR-RFLP) para a investigação da mutação c.3788\_3790delTCT do *FANCA*, as mutações c.456+4 A>T; c.67delG; c.65G>A e c.1393 C>T do *FANCC*; e as mutações c.1077-2A>G e c.1480+1G>C do *FANCG*.

As mutações c.456+4 A>T, c.67delG e c.65G>A do gene *FANCC* não alteram os sítios de restrição. Sítios artificiais foram introduzidos nos produtos de PCR usando oligonucleotídeos iniciadores modificados (HALIASSOS; CHOMEL; TESSON, 1989; YAU *et al.*, 1993). Estes oligonucleotídeos foram desenhados com o programa disponível em <http://primer1.soton.ac.uk/primer.html> (KE; COLLINS; YE, 2002). As mutações c.1393C>T do *FANCC* e c.1480+1G>C do *FANCG* eliminam sítios de restrição. Foram gerados oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação destas regiões.

Para amplificação das mutações c.67delG, c.65G>A, c.1393C>T e c.1480+1G>C foram utilizados 15 µL de mistura de reação com: 10 ng de DNA, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase. As condições da PCR foram: 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 61°C; 60°C; 65°C e 58°C respectivamente, 30 segundos a 72°C e um ciclo final de 5 minutos a 72°C. A amplificação da mutação c.456+4 A>T requer mistura de reação

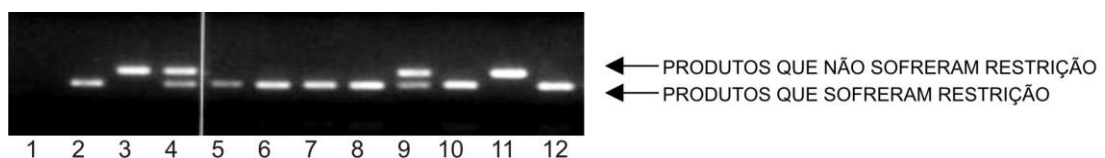
contendo: 10 ng de DNA genômico, 80 mM TrisHCl (pH 9,0), 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,4  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase em volume final de 15  $\mu\text{L}$  e condições de PCR diferenciadas: 5 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 51°C, 1 minuto a 72°C e um ciclo final de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram digeridos com enzimas de restrição específicas (Quadro 5) e analisados por eletroforese em gel de agarose 2% e em gel de poliacrilamida 7% com brometo de etídio. Os procedimentos foram adaptados de Gibson *et al.* (1996) e Yates *et al.* (2006).

Para detectar a mutação c.1077-2A>G do *FANCG*, a sequência completa do exon nove foi amplificada seguindo os procedimentos e condições da PCR descritos por Auerbach *et al.* (2003). O produto final da PCR de 297 pb foi digerido com a enzima DdeI. Após a digestão dos produtos de PCR, as amostras que não tinham esta mutação apresentaram uma banda visível de 191 pb, as homozigotas apresentaram uma única banda de 250 pb e as heterozigotas ambas as bandas.

Para a identificação da mutação c.3788\_3790delTCT do *FANCA*, Levran *et al.* (1997) desenvolveram um ensaio de PCR modificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores desalinhados. Foi desenhado um oligonucleotídeo iniciador reverso capaz de abolir o único sítio de restrição da enzima MboII no alelo mutante e deixar intacto um dos dois sítios no alelo normal. Após a amplificação sob as condições de PCR descritas em Levran *et al.* (1997), os produtos foram digeridos e os fragmentos analisados em gel de agarose a 2% com brometo de etídio. As amostras que não tinham esta mutação apresentaram uma banda visível de 130 pb, as homozigotas apresentaram uma única banda de 160 pb e as heterozigotas, ambas as bandas.

Os oligonucleotídeos utilizados, o tamanho dos produtos gerados em pares de bases e as enzimas de restrição utilizadas estão descritos no Quadro 5.

FIGURA 5 - EXEMPLO DE ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO APÓS A PCR



FONTE: A autora

NOTA : Análise de fragmentos de restrição após a PCR, onde a mutação elimina o sítio de restrição desta enzima. 1 controle negativo; 2 controle normal (um único fragmento menor que sofre restrição); 3 controle positivo homozigoto (um único fragmento maior que não sofre restrição); 4 e 9 amostras positivas heterozigotas (dois fragmentos um maior que não sofre restrição e outro menor que sofre restrição); 5,6,7,8,10 e 12 amostras negativas (um único fragmento menor que sofre restrição) 11 amostra positiva homozigota (um único fragmento maior que não sofre restrição).

QUADRO 5 - ENSAIOS DE RESTRIÇÃO PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NA AF

MUTAÇÃO	GENE	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	PRODUTO (pb)
c.456+4 A>T	<i>FANCC</i>	F: 5'CTCATATACTTTTCAGCACTCAG 3' R: 5'TTTCAAAGTGATAAATATTAAGTAC 3'	<i>Sca I</i>	Normal: 108,23 Mutante:131
c. 67delG	<i>FANCC</i>	F: 5'ACCATTTCTTCAGTGCTGG 3' R: 5'GTTTCAAAGTGGAAGCCTGAGCC'3	<i>Bsp1286 I</i>	Normal: 129, 22 Mutante:151
c.65G>A	<i>FANCC</i>	F: 5' TGGATGCAGAAGCTTTCTGGAT 3' R: 5' TCCATCGGCCACTTCAGTCAA 3'	<i>Fok I</i>	Normal: 210,15, 17 Mutante:227,15
c.1393C>T	<i>FANCC</i>	F: 5' AGAAGCAGCAGCCTCTCAGC 3' R: 5' ATGCTGGACCACAGGGAGAC 3'	<i>BssK1</i>	Normal: 21, 103, 19, 16, 28 Mutante: 124, 19, 16, 28
c.1480+1G>C	<i>FANCG</i>	F: 5' CACACCTGAGGAAAAAGAACAA 3' R: 5' CAAGAAGTGTCTTCCCAGCC 3'	<i>Hph I</i>	Normal:35, 146, 18 Mutante: 181,18
c.1077-2A>G	<i>FANCG</i>	F: 5' TCCTCAGGGCCCATGAACATCCAT 3' R: 5' TGGGCCCCAGACTGGACAGAC 3'	<i>Dde I</i>	Normal:191 Mutante:250
c.3788_3790delTCT	<i>FANCA</i>	F: 5' AGGATTTATGGCCTAGATGTA AAA 3' R:5'GACGACAGCAGGCCCATCAAGGAAAA 3'	<i>Mbo II</i>	Normal: 130, 30 Mutante: 160

FONTE: Gibson *et al.* (1996); Levran *et al.* (1997); Auerbach *et al.* (2003); Yates *et al.* (2006)

#### 4.2.4 Métodos para identificação da segunda mutação patogênica

##### 4.2.4.1 Triagem de deleções no gene *FANCA* por MLPA

O método de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) foi utilizado para detectar deleções e ampliações no gene *FANCA*. É um método rápido, quantitativo, desenhado para detectar alterações em uma única reação multiplex, especialmente deleções acima de 40 nucleotídeos, podendo também discriminar sequências que diferem em um único nucleotídeo (SCHOUTEN *et al.*, 2002). Foi utilizado o conjunto de reagentes SALSA MLPA P031 e P032 para o gene *FANCA* (MRC Holland, Amsterdam, Holanda). Este teste abrange cinco etapas: 1) Desnaturação do DNA (5 minutos, 98°C) e hibridização das sondas MLPA (1 minuto a 98°C e incubação a 60°C durante a noite); 2) Reação de ligação para a qual a enzima ligase é adicionada e incubada a 54°C por 15 minutos, seguido da sua inativação a 98°C por 5 minutos; 3) Reação de PCR usando um oligonucleotídeo não marcado e outro fluorescente (carboxi-fluoresceína), complementar à sequência universal (33 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C); 4) Eletroforese em analisador genético ABI PRISM 3130 usando padrão molecular *GeneScan-TAMRA 500* (*Applied Biosystems Inc*, EUA); 5) Análise dos dados com auxílio do programa *GeneMarker* (*SoftGenetics*,

StateCollege, EUA). Informações sobre as sequências das sondas empregadas estão disponíveis no *website* do fornecedor ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)). O protocolo detalhado é apresentado em Ameziane *et al.* (2008).

#### 4.2.4.2 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento dos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* foi realizado pelo método de Sanger de acordo como protocolo descrito por Gille *et al.* (2012).

Foram investigados todos os pacientes nos quais somente uma das mutações foi identificada na triagem e que não foram concluídos após a investigação de grandes deleções por MLPA. Todos os exons e regiões intrônicas adjacentes do gene envolvido foram amplificados pela PCR, sequenciados com *BigDye Terminator* (Life Technologies, Grand Island, EUA) e submetidos à eletroforese capilar em analisador genético ABI 3130 (*Applied Biosystems Inc*, EUA).

Para as reações de amplificação pela PCR foi utilizado o volume final de 25  $\mu$ L contendo 0,5 unidades de *Taq* polimerase, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTPs e 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo com sequência universal M13. Para a grande maioria dos produtos de amplificação, foram utilizadas as condições de PCR convencionais (preaquecimento 95°C por 5min, desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão da fita 72°C por 1 minuto durante 33 ciclos). Alguns fragmentos precisam de condições especiais para amplificação pela PCR entre eles os exons 5, 7, 13, 21, 26, 31 e 38 do gene *FANCA*, o exon 7 do *FANCC* que requerem temperatura de anelamento à 55°C e o exon 1 do *FANCA* com anelamento à 64°C e mistura de reação para PCR suplementada com 10% de DMSO.

Os dados obtidos com o sequenciamento dos genes foram analisados com o uso do programa *Sequence Pilot* (*JSI Medical Systems, Kippenheim, Alemanha*) com base nas sequências de referência do *RefSeq database* (*FANCA* NM\_000135.2; *FANCC* NM\_000136.2 and *FANCG* NM\_004629). A interpretação das variantes detectadas foi feita com o auxílio do programa *ALAMUT* (*Interactive Biosoftware, Rouen, França*) que integra os algoritmos de predição de patogenicidade SIFT, POLYPHEN2 e Align GVGD (TAVTIGIAN *et al.*, 2008; KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009; ADZHUBEI *et al.*, 2010).

A nomenclatura das mutações foi estabelecida de acordo com as instruções da *Human Genome Variation Society* (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>).

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados e o protocolo detalhado para o sequenciamento dos genes AF estão descritos em Gille *et al.* (2012).

As reações de sequenciamento e de MLPA foram realizadas na *Vrije Universiteit* (VU) em Amsterdam sob a supervisão do Dr. Johan J. P. Gille, coordenador da equipe de Investigação Clínica de Doenças Genéticas Associadas ao Câncer.

#### 4.2.5 Métodos estatísticos

Os resultados de dados fenotípicos e informações sobre as manifestações clínicas dos pacientes obtidos pela revisão dos prontuários foram apresentados por meio de estatísticas descritivas. As variáveis qualitativas foram descritas por frequências e percentuais e as variáveis quantitativas por meio das estatísticas de média, mediana, valor mínimo, valor máximo e desvio padrão.

Para a avaliação da associação entre as duas mutações mais frequentes (c.3788\_3790delTCT do *FANCA* e c.1077-2A>G do *FANCG*) e variáveis categóricas como distribuição geográfica, gênero, consanguinidade, extensão das malformações, foi considerado o teste Exato de Fisher.

Valores de  $p$  menores do que 0,05 indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0 (*Armonk*, Nova Iorque, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MUTAÇÕES IDENTIFICADAS UTILIZANDO OS TESTES DE TRIAGEM PARA OS GENES *FANCA*, *FANCC* E *FANCG*

Foram identificadas mutações em 128 (50,2%) dos 255 pacientes investigados utilizando o painel de triagem inicial, proposto neste estudo, que incluiu 11 mutações distribuídas nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*. Em 127 pacientes (49,8%) nenhuma das 11 mutações foi detectada. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Este teste de triagem possibilitou identificar alterações no gene *FANCA* em 89/255 (34,9%) pacientes (48,3% homozigotos e 51,7% heterozigotos), no gene *FANCC* em 11/255 (4,3%) pacientes (63,6% homozigotos e 36,4% heterozigotos) e no gene *FANCG* em 28/255 (11,0%) pacientes (75% homozigotos e 25% heterozigotos).

Entre as cinco mutações investigadas no gene *FANCA*, a mutação c.3788\_3790delTCT foi detectada em 69/255 (27,0%) pacientes; a c.2535\_2536delCT em seis pacientes (2,4%); a c.987\_990delTCAC em seis pacientes (2,4%); a c.2853-19\_2853-1del19 em cinco pacientes (2,0%) e a c.1115\_1118delTTGG em três pacientes (1,2%).

Entre as quatro mutações investigadas no gene *FANCC* a mutação c.456+4 A>T foi detectada em quatro pacientes (1,6%), a c.65G>A em quatro pacientes (1,6%), e a c.1393C>T em três pacientes (1,2%). A mutação c.67delG não foi detectada entre os pacientes incluídos neste estudo, utilizando o método de triagem proposto.

No gene *FANCG* foram investigadas duas mutações sendo que a c.1077-2A>G foi identificada em todos os 28 pacientes FA-G. A mutação c.1480+1G>C não foi encontrada entre os 255 pacientes analisados, utilizando o método de triagem proposto.

Em 71/128 (55,5%) pacientes foram encontradas mutações em homozigose (43 no gene *FANCA*, sete no gene *FANCC* e 21 no gene *FANCG*) e 57/128 (44,5%) apresentaram mutações em heterozigose (46 no *FANCA*, quatro no *FANCC* e sete no *FANCG*).



Em quatro dos 57 pacientes heterozigotos, ambas as mutações foram identificadas pelo teste de triagem do gene *FANCA*. Nos demais 53 pacientes heterozigotos a segunda mutação foi investigada por MLPA e sequenciamento.

TABELA 2 - MUTAÇÕES IDENTIFICADAS EM 128 DOS 255 PACIENTES PELO TESTE DE TRIAGEM

MUTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	PACIENTES (128/255)	HOMOZIGOSE (71)/ HETEROZIGOSE (57)	N.º DE ALELOS (203/510)
Gene <i>FANCA</i> - 89 / 255 (34,9%)				136/510
c.3788_3790delTCT	Exon 38	69 (27,1%)	34 homozigose 35 heterozigose	103
c.2535_2536delCT	Exon 27	6 (2,4%)	3 homozigose 3 heterozigose	11 <sup>(1)</sup>
c.987_990delTCAC	Exon 11	6 (2,4%)	2 homozigose 4 heterozigose	09 <sup>(1)</sup>
c. 2853-19del 19	Intron 29	5 (2,0%)	3 homozigose 2 heterozigose	09 <sup>(1)</sup>
c.1115_1118delTTGG	Exon 13	3 (1,2%)	1 homozigose 2 heterozigose	04
Gene <i>FANCC</i> - 11 / 255 (4,3%)				18/510
c.65G>A	Exon 1	4 (1,6%)	4 homozigose	08
c.456+4 A>T	Intron 4	4 (1,6%)	2 homozigose 2 heterozigose	06
c.1393 C>T	Exon 13	3 (1,2%)	1 homozigose 2 heterozigose	04
Gene <i>FANCG</i> - 28 / 255 (11,0%)				49/510
c.1077-2A>G	Intron 8	28 (11%)	21 homozigose 07 heterozigose	49

FONTE: A autora

(1) A mutação c.2535\_2536delCT foi detectada em heterozigose composta em dois pacientes, a mutação c.987\_990delTCAC em um paciente e a mutação c. 2853-19del 19 em um paciente o que justifica a discrepância entre o número de alelos e o número de pacientes. As mutações c.67delG (*FANCC*) e c.1480+1G>C (*FANCG*) não foram identificadas entre os 255 pacientes, com os métodos utilizados.

## 5.2 INVESTIGAÇÃO DA SEGUNDA MUTAÇÃO NOS 53 PACIENTES HETEROZIGOTOS UTILIZANDO OS MÉTODOS DE MLPA E SEQUENCIAMENTO

A segunda mutação foi identificada em 51/53 pacientes heterozigotos utilizando esta abordagem (40 em *FANCA*, quatro em *FANCC* e sete em *FANCG*). Dois pacientes heterozigotos para *FANCA* foram excluídos porque somente em um dos alelos foi identificada a mutação patogênica. Desta forma, 126 pacientes (49,4%) tiveram a pesquisa de suas mutações finalizada por meio da estratégia proposta por este estudo.

Utilizando o método de MLPA, foram detectadas grandes deleções em 10/40 pacientes com mutações em heterozigose no gene *FANCA*. A deleção ex18\_23del foi encontrada em três pacientes e duas novas grandes deleções foram identificadas (Tabelas 3 e 4). Em 30/40 pacientes a segunda mutação patogênica foi detectada pelo sequenciamento dos 43 exons do *FANCA*, tendo sido encontradas 10 mutações já conhecidas e 13 novas mutações (Tabelas 3 e 4). As mutações c.3163C>G (p.Arg1055Gly) e c.4199G>C (p.Arg1400Pro) codificam aminoácidos diferentes das mutações c.3163C>T (p.Arg1055Trp) e c.4199G>A (p.Arg1400His) descritas no *FA Mutation Database* e não são mutações sinônimas, apesar de estarem na mesma posição no gene. A mutação c.190-2A>T(rs183350210) está descrita na base de dados *dbSNP database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) em baixa frequência, porém não foi registrada nenhuma ocorrência desta mutação na base de dados específica para os genes AF (<<http://www.rockefeller.edu/fanconi>>) até o presente.

Entre as mutações mais frequentes no gene *FANCA*, além daquelas incluídas no teste de triagem, a c.718C>T foi observada em três pacientes e as mutações c.190-2A>T, c.3163C>G, c.3696delT e c.4082A>C em dois pacientes.

Nos quatro pacientes heterozigotos para *FANCC* foi possível detectar a segunda mutação patogênica pelo método de sequenciamento. Dentre as mutações identificadas, duas ainda não haviam sido descritas na literatura (Tabelas 3 e 4).

A segunda mutação patogênica também foi identificada nos sete pacientes heterozigotos para *FANCG*, sendo que três mutações estão localizadas no exon 10 e cinco das sete mutações são novas variantes (Tabelas 3 e 4). Estas sete mutações foram detectadas em heterozigose com a mutação c.1077-2A>G, previamente identificada pelo teste de triagem.

Com os recursos do teste de triagem, do MLPA e do sequenciamento, um total de 52 mutações diferentes foi identificado. Vinte e duas destas 52 alterações (42,3%) constituem novas mutações, ainda não descritas em pacientes AF (Tabelas 3 e 4).

Os genótipos dos 126 pacientes estão descritos nos Apêndices 2, 3 e 4, de acordo com a localização nos genes *FANCA*, *FANCC* ou *FANCG*, respectivamente.

TABELA 3 - MUTAÇÕES DETECTADAS NOS GENES *FANCA*, *FANCC* E *FANCG* EM 128 PACIENTES

continua

GENE <i>FANCA</i>					
Localização no gene	Mutação	Produto	Nº alelos (176)	Homozigose/Heterozigose	Referências
ex2	c.97delG	p.Glu33Lysfs*11	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
2i	c.190-2A>T	<i>Splice</i>	2	2 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1,5)</sup>
ex4	c.396dupT	p.His133Serfs*48	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex8	c.718C>T	p.Gln240*	3	3 Heterozigotos	Savoia <i>et al.</i> (1996)
ex8	c.784delA	p.Met262Cysfs*13	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex10	c.862G>T	p.Glu288*	1	1 Heterozigoto	FA Database <sup>(3)</sup>
ex11	c.987_990delTCAC	p.His330Alafs*4	9	2 Homozigotos 5 Heterozigotos	Levrán <i>et al.</i> (1997)
ex13	c.1115_1118delTTGG	p.Val372Alafs*42	4	1 Homozigotos 2 Heterozigotos	Apostolou <i>et al.</i> (1996)
ex16	c.1508dupA	p.Tyr503*	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846Glnfs*19	11	3 Homozigotos 5 Heterozigotos	Levrán <i>et al.</i> (1997)
ex28	c.2604_2609delTCAGTT	p.Gln869_Phe870del	1	1 Heterozigoto	Levrán <i>et al.</i> (2005)
ex28	c.2636C>T	p.Arg879*	1	1 Heterozigoto	Ameziane <i>et al.</i> (2008)
28i	c.2778+1G>T	<i>Splice</i>	1	1 Heterozigoto	FA Database <sup>(3)</sup>
ex29	c.2808G>C	p.Glu936Asp	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex29	c.2851C>T	p.Arg951Trp	1	1 Heterozigoto	Levrán <i>et al.</i> (2005)
29i	c.2853-19_2853-1del19	<i>Splice</i>	9	3 Homozigotos 3 Heterozigotos	Levrán <i>et al.</i> (1997)
ex32	c.3163C>G	p.Arg1055Gly	2	2 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1,4)</sup>
ex32	c.3166_3185dup	p.Trp1063Serfs*4	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex32	c.3239G>A	p.Arg1080Gln	1	1 Heterozigoto	Chandra <i>et al.</i> (2005)
ex36	c.3560dupG	p.His1188Thrfs*27	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex37	c.3638_3639delCT	p.Pro1213Argfs*64	1	1 Heterozigoto	Yagasaki <i>et al.</i> (2004)
ex37	c.3696delT	p.Phe1232Leufs*15	2	2 Heterozigoto	FA Database <sup>(3)</sup>
ex38	c.3788_3790delTCT	p.Phe1263del	103 <sup>(2)</sup>	34 Homozigotos 35 Heterozigotos	Levrán <i>et al.</i> (1997)
ex40	c.4006T>G	p.Tyr1336Asp	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
40i	c.4010+2T>C	<i>Splice</i>	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex41	c.4082A>C	p.Tyr1361Ser	2	2 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex41	c.4124_4125delCA	p.Thr1375Serfs*49	1	1 Heterozigoto	Savoia <i>et al.</i> (1996)
ex42	c.4198C>T	p.Arg1400Cys	1	1 Heterozigoto	Savoia <i>et al.</i> (1996)
ex42	c.4199G>C	p.Arg1400Pro	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1,4)</sup>
GD	ex1_36del	del	1	1 Heterozigoto	FA Database <sup>(3)</sup>
GD	ex 4_5del	del	1	1 Heterozigoto	Ameziane <i>et al.</i> (2008)
GD	ex 6_8del	del	1	1 Heterozigoto	Ameziane <i>et al.</i> (2008)
GD	ex15_28del	del	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
GD	ex18_23del	del	3	3 Heterozigoto	Ameziane <i>et al.</i> (2008)
GD	ex18_28del	del	1	1 Heterozigoto	FA Database <sup>(3)</sup>
GD	ex22_28del	del	1	1 Heterozigoto	TenFoe <i>et al.</i> (1996)
GD	ex29_30del	del	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
GENE <i>FANCC</i>					
Localização no gene	Mutação	Produto	Nº alelos (22)	Homozigose/Heterozigose	Referências
ex1	c.65G>A	p.Trp22*	8	4 Homozigotos	Gibson <i>et al.</i> (1996)
ex3	c.338G>A	p.Trp113*	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex4	c.388delGinsAAAA	p.Glu130LysinsLys	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex4	c.450_451insA	p.Asn152Lysfs	1	1 Heterozigoto	Ameziane <i>et al.</i> (2008)
4i	c.456+4 A>T	<i>Splice</i>	6	2 Homozigotos 2 Heterozigotos	Whitney <i>et al.</i> (1993)
ex9	c.996G>C	p.Gly116_Asn152del	1	1 Heterozigoto	Ameziane <i>et al.</i> (2008)
ex13	c.1393C>T	p.Gln465*	4	1 Homozigotos 2 Heterozigotos	Yates <i>et al.</i> (2006)

TABELA 3 - MUTAÇÕES DETECTADAS NOS GENES *FANCA*, *FANCC* E *FANCG* EM 128 PACIENTES

conclusão					
GENE <i>FANCG</i>					
Localização no gene	Mutação	Produto	Nº alelos (56)	Homozigose/Heterozigose	Referências
ex1	c.60T>A	p.Asn20Lys	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
2i	c.84+3A>C	<i>Splice</i>	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
ex03	c.256C>T	p.Gln86*	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
3i	c.307+1G>C	<i>Splice</i>	1	1 Heterozigoto	Auerbach <i>et al.</i> (2003)
8i	c.1077-2A>G	<i>Splice</i>	49	21 Homozigotos 7 Heterozigotos	Demuth <i>et al.</i> (2000)
ex10	c.1158delC	p.Ser387Profs*16	1	1 Heterozigoto	FA Database <sup>(3)</sup>
ex10	c.1216dupC	p.Gln406Profs*13	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
10i	c.1433+1G>A	<i>Splice</i>	1	1 Heterozigoto	Nova mutação <sup>(1)</sup>
<b>TOTAL <i>FANCA</i>, <i>FANCC</i> <i>FANCG</i></b>	<b>52 mutações</b>		<b>254 alelos</b>	<b>112 Heterozigotos 142 Homozigotos</b>	<b>22 novas mutações</b>

FONTE: A autora

NOTAS: A nomenclatura das mutações foi estabelecida de acordo com as instruções da *Human Genome Variation Society* (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) utilizando as sequências de referência do RefSeq database (*FANCA* NM\_000135.2; *FANCC* NM\_000136.2; *FANCG* NM\_004629.1). Para a numeração dos nucleotídeos o "A" do sítio iniciador de tradução, ATG foi considerado como o nucleotídeo +1.

GD = grande deleção

- (1) As novas mutações identificadas neste estudo não foram publicadas até o presente.
- (2) Em dois dos 128 pacientes somente uma das mutações foi detectada (c.3788\_3790del TCT). Sendo assim, 254 dos 256 alelos foram identificados nos 128 pacientes.
- (3) Disponível em: <<http://www.rockefeller.edu/fanconi>>.
- (4) As mutações c.3163C>T(p.Arg1055Trp) e c.4199G>A (p.Arg1400His), descritas no *FA Mutation Database* não são mutações sinônimas a aquelas descritas no presente estudo *FANCA* (c.3163C>G / p.Arg1055Gly) e c.4199G>C / p.Arg1400Pro), porque apesar de estarem na mesma posição no gene, codificam aminoácidos diferentes.
- (5) A mutação c.190-2A>T(rs183350210) está descrita na base de dados *dbSNP database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) em baixa frequência, porém não foi registrada nenhuma ocorrência na base de dados específica para genes AF (<<http://www.rockefeller.edu/fanconi>>) até o presente.

### 5.3 NOVAS MUTAÇÕES DETECTADAS ENTRE OS 126 PACIENTES INVESTIGADOS

A Tabela 4 destaca as 22 novas mutações detectadas entre os 126 pacientes investigados, sendo que 15 correspondem a alterações na sequência do gene *FANCA*, duas do *FANCC* e cinco do *FANCG*. Entre estas, 11 foram consideradas deletérias e as demais 11 requerem confirmação de seus efeitos sobre a função normal da proteína.

TABELA 4 - NOVAS MUTAÇÕES DETECTADAS NOS GENES *FANCA*, *FANCC* E *FANCG*

NOVAS MUTAÇÕES COM EFEITO DELETÉRIO				
N.º de pacientes	Localização	Nova Mutação	Produto	Classificação
1	<i>FANCA</i> / ex2	c.97delG	p.Glu33Lysfs*11	Deleção - <i>Frameshift</i> <sup>(2)</sup>
1	<i>FANCA</i> / ex4	c.396dupT	p.His133Serfs*48	Duplicação - <i>Frameshift</i> <sup>(2)</sup>
1	<i>FANCA</i> / ex8	c.784delA	p.Met262Cysfs*13	Deleção - <i>Frameshift</i> <sup>(2)</sup>
1	<i>FANCA</i> / ex16	c.1508dupA	p.Tyr503*	Duplicação - <i>Nonsense</i>
1	<i>FANCA</i> / ex32	c.3166_3185dup	p.Trp1063Serfs*4	Duplicação - <i>Frameshift</i> <sup>(2)</sup>
1	<i>FANCA</i> / ex36	c.3560dupG	p.His1188Thrfs*27	Duplicação - <i>Frameshift</i> <sup>(2)</sup>
1	<i>FANCA</i> / GD <sup>(4)</sup>	ex15_28del	del	Grande deleção
1	<i>FANCA</i> / GD <sup>(4)</sup>	ex29_30del	del	Grande deleção
1	<i>FANCC</i> / ex3	c.338G>A	p.Trp113*	Substituição - <i>Nonsense</i> <sup>(3)</sup>
1	<i>FANCG</i> / ex03	c.256C>T	p.Gln86*	Substituição - <i>Nonsense</i> <sup>(3)</sup>
1	<i>FANCG</i> / ex10	c.1216dupC	p.Gln406Profs*13	Duplicação - <i>Frameshift</i> <sup>(2)</sup>
NOVAS MUTAÇÕES COM PROVÁVEL EFEITO DELETÉRIO				
N.º de pacientes	Localização	Nova Mutação	Produto	Classificação
2 <sup>(1)</sup>	<i>FANCA</i> / 2i	c.190-2A>T	ND	Alteração de sítio de <i>splicing</i>
1	<i>FANCA</i> / ex29	c.2808G>C	p.Glu936Asp	Substituição - <i>Missense</i> <sup>(5)</sup>
2 <sup>(1)</sup>	<i>FANCA</i> / ex32	c.3163C>G	p.Arg1055Gly	Substituição - <i>Missense</i> <sup>(5)</sup>
1	<i>FANCA</i> / ex40	c.4006T>G	p.Tyr1336Asp	Substituição - <i>Missense</i> <sup>(5)</sup>
1	<i>FANCA</i> / 40i	c.4010+2T>C	ND	Alteração de sítio de <i>splicing</i>
2 <sup>(1)</sup>	<i>FANCA</i> / ex41	c.4082A>C	p.Tyr1361Ser	Substituição - <i>Missense</i> <sup>(5)</sup>
1	<i>FANCA</i> / ex42	c.4199G>C	p.Arg1400Pro	Substituição - <i>Missense</i> <sup>(5)</sup>
1	<i>FANCC</i> / ex4	c.388delGinsAAAA	p.Glu130LysinsLys	Deleção/Inserção - <i>In frame</i> <sup>(6)</sup>
1	<i>FANCG</i> / ex1	c.60T>A	p.Asn20Lys	Substituição - <i>Missense</i> <sup>(5)</sup>
1	<i>FANCG</i> / 2i	c.84+3A>C	ND	Alteração de sítio de <i>splicing</i>
1	<i>FANCG</i> / 10i	c.1433+1G>A	ND	Alteração de sítio de <i>splicing</i>

FONTE: A autora

NOTAS: Todas as novas mutações foram identificadas em heterozigose com outra mutação, sabidamente patogênica, no mesmo gene.

ND = Não determinado (não foi realizada a análise do RNA para determinar o produto gerado pela alteração do sítio de *splicing*).

(1) Mutação identificada em dois pacientes, não consanguíneos, incluídos no estudo.

(2) *Frameshift* = alteração no quadro de leitura que pode resultar em produto gênico diferente ou ausência de produto.

(3) *Nonsense* = mutação sem sentido (gera um códon de terminação precoce).

(4) GD = grande deleção com perda de grande parte das seqüências codificadoras.

(5) *Missense* = mutação com sentido trocado (codifica um aminoácido diferente).

(6) *In frame* = deleção de aminoácido seguida de inserção que não altera o quadro de leitura, mas leva a síntese um produto diferente.

## 5.4 SEGREGAÇÃO DAS MUTAÇÕES NAS FAMÍLIAS DOS PACIENTES AF

Em 95 dos 126 pacientes (75,4%) foi possível confirmar a segregação de pelo menos um dos alelos mutados pela análise do DNA paterno e (ou) materno. Pacientes heterozigotos, portadores de grandes deleções tiveram somente a primeira mutação investigada nos pais. Nos 31 casos restantes a segregação na família não foi investigada pela indisponibilidade de amostras maternas e (ou) paternas. A segregação dos alelos pode ser observada na Tabela 5.

TABELA 5 – SEGREGAÇÃO DOS ALELOS NA FAMÍLIA

SEGREGAÇÃO DOS ALELOS MUTADOS DO GENE <i>FANCA</i> (n= 68)				
Identificação do Paciente	Mutação 1	Mutação 2	Herança Materna	Herança Paterna
6	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
43	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
74	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
90	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
101	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
105	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
109	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
121	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
157	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
162	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
172	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
221	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
253	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
158	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
81	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
183	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
39	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
91	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
11	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
208	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
4	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	sem amostra
98	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
224	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
2	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
235	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
58	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT	c.3788_3790del TCT
201	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT
7	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	sem amostra
60	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT
155	c.987_990delTCAC	c.987_990delTCAC	c.987_990delTCAC	c.987_990delTCAC
15	c.1115_1118delTTGG	c.1115_1118delTTGG	sem amostra	c.1115_1118delTTGG
117	c.2853-19_2853-1 del19	c.2853-19_2853-1 del19	c.2853-19_2853-1 del19	c.2853-19_2853-1 del19
203	c.2853-19_2853-1 del19	c.2853-19_2853-1 del19	c.2853-19_2853-1 del19	c.2853-19_2853-1 del19
220	c.2853-19_2853-1 del19	c.987_990delTCAC	c.2853-19_2853-1 del19	sem amostra
49	c.1115_1118delTTGG	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	sem amostra
57	c.3788_3790del TCT	c.2535_2536delCT	c.3788_3790del TCT	sem amostra
108	c.3788_3790del TCT	2853-19_2853-1 del19	c.3788_3790del TCT	sem amostra
9	c.1115_1118delTTGG	c.3239G>A	c.3239G>A	c.1115_1118delTTGG
17	c.3788_3790del TCT	c.2778+G>T	c.3788_3790del TCT	c.2778+G>T
18 <sup>(1)</sup>	<b>c.3788_3790delTCT</b>	<b>c.4006T&gt;G</b>	<b>c.4006T&gt;G</b>	<b>c.3788_3790delTCT</b>
24 <sup>(1)</sup>	<b>c.2853-19del 19</b>	<b>c.2808G&gt;C</b>	<b>c.2808G&gt;C</b>	<b>c.2853-19 del 19</b>
48 <sup>(1)</sup>	<b>c.3788_3790delTCT</b>	<b>c.3163C&gt;G</b>	<b>c.3788_3790delTCT</b>	<b>c.3163C&gt;G</b>
111	c.3788_3790delTCT	c.2851C>T	c.2851C>T	c.3788_3790delTCT
130 <sup>(1)</sup>	<b>c.3788_3790del TCT</b>	<b>c.396dupT</b>	<b>c.396dupT</b>	<b>c.3788_3790del TCT</b>
140	c.2535_2536delCT	c.2604_2609delTCAGTT	c.2604_2609delTCAGTT	c.2535_2536delCT
152 <sup>(1)</sup>	<b>c.3788_3790del TCT</b>	<b>c.3560dupG</b>	<b>c.3560dupG</b>	<b>c.3788_3790del TCT</b>
177	c.3788_3790delTCT	c.718C>T	c.718C>T	c.3788_3790delTCT
196 <sup>(1)</sup>	<b>c.3788_3790delTCT</b>	<b>c.4082A&gt;C</b>	<b>c.3788_3790delTCT</b>	<b>c.4082A&gt;C</b>
209	c.987_990delTCAC	c.3696delT	c.3696delT	c.987_990 delTCAC
241	c.3788_3790delTCT	c.3696delT	c.3696delT	c.3788_3790delTCT
146	c.3788_3790delTCT	c.3163C>G	c.3788_3790delTCT	c.3163C>G
97	c.3788_3790delTCT	c.718C>T	c.718C>T	c.3788_3790delTCT
248 <sup>(1)</sup>	<b>c.2535_2536delCT</b>	<b>c.1508dupA</b>	<b>c.1508dupA</b>	<b>c.2535_2536delCT</b>
160	c.3788_3790delTCT	c.4198C>T	c.3788_3790delTCT	c.4198C>T
142 <sup>(1)</sup>	<b>c.3788_3790del TCT</b>	<b>c.97delG</b>	<b>c.3788_3790del TCT</b>	<b>c.97delG</b>
44 <sup>(1)</sup>	<b>c.3788_3790del TCT</b>	<b>c.4010+2T&gt;C</b>	<b>c.4010+2T&gt;C</b>	<b>c.3788_3790del TCT</b>
16	c.3788_3790del TCT	c.4124_4125delCA	c.4124_4125delCA	c.3788_3790del TCT
53	c.987_990delTCAC	c.2636C>T	sem amostra	c.987_990delTCAC
255	c.2535_2536delCT	c.190-2A>T	c.2535_2536delCT	sem amostra
51	c.987_990delTCAC	c.784delA	c.987_990delTCAC	sem amostra
237	c.987_990delTCAC	c.3166_3185dup	c.987_990delTCAC	sem amostra
1	c.3788_3790delTCT	ex18_23del	GD	c.3788_3790delTCT
204	c.3788_3790delTCT	ex4_5del	c.3788_3790delTCT	GD
133	c.3788_3790delTCT	ex1_36del	ex1_36del	c.3788_3790delTCT
71	c.3788_3790del TCT	ex18_28del	GD	c.3788_3790del TCT
143	c.3788_3790del TCT	ex15_27del	GD	c.3788_3790del TCT
168	c.3788_3790del TCT	ex22_28del	GD	c.3788_3790del TCT
166	c.3788_3790del TCT	ex18_23del	c.3788_3790del TCT	GD

conclusão				
SEGREGAÇÃO DOS ALELOS MUTADOS DO GENE <i>FANCC</i> (n= 5)				
Identificação do paciente	Mutação 1	Mutação 2	Materno	Paterno
120	c.65G>A	c.65G>A	sem amostra	c.65G>A
240	c.1393C>T	c.1393C>T	c.1393C>T	c.1393C>T
63	c.456+4 A>T	c.456+4 A>T	c.456+4 A>T	c.456+4 A>T
246	c.456+4 A>T	c.456+4 A>T	c.456+4 A>T	sem amostra
<b>159<sup>(1)</sup></b>	<b>c.456+4 A&gt;T</b>	<b>c.388delGinsAAA</b>	<b>c.388delGinsAAA</b>	<b>c.456+4 A&gt;T</b>
SEGREGAÇÃO DOS ALELOS MUTADOS DO GENE <i>FANCG</i> (n= 22)				
Identificação do paciente	Mutação 1	Mutação 2	Materno	Paterno
128	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
38	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
55	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
73	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
110	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
134	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
252	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	sem amostra	c.1077-2A>G
226	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	sem amostra	c.1077-2A>G
228	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
124	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
247	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	sem amostra
41	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	sem amostra
207	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
37	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	sem amostra	c.1077-2A>G
66	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G
<b>148<sup>(1)</sup></b>	<b>c.1077-2A&gt;G</b>	<b>c.84+3A&gt;C</b>	<b>c.84+3A&gt;C</b>	<b>c.1077-2A&gt;G</b>
99	c.1077-2A>G	c.1216dupC	c.1077-2A>G	sem amostra
125	c.1077-2A>G	c.1433+1G>A	c.1077-2A>G	sem amostra
197	c.1077-2A>G	c.1158delC	c.1077-2A>G	sem amostra
<b>75<sup>(1)</sup></b>	<b>c.1077-2A&gt;G</b>	<b>c.256C&gt;T</b>	<b>c.256C&gt;T</b>	<b>c.1077-2A&gt;G</b>
231	c.1077-2A>G	c.60T>A	c.1077-2A>G	sem amostra
250	c.1077-2A>G	c.307+1G>C	c.1077-2A>G	sem amostra
<b>TOTAL: 95/126 pacientes (75,4%)</b>				

FONTE: A autora

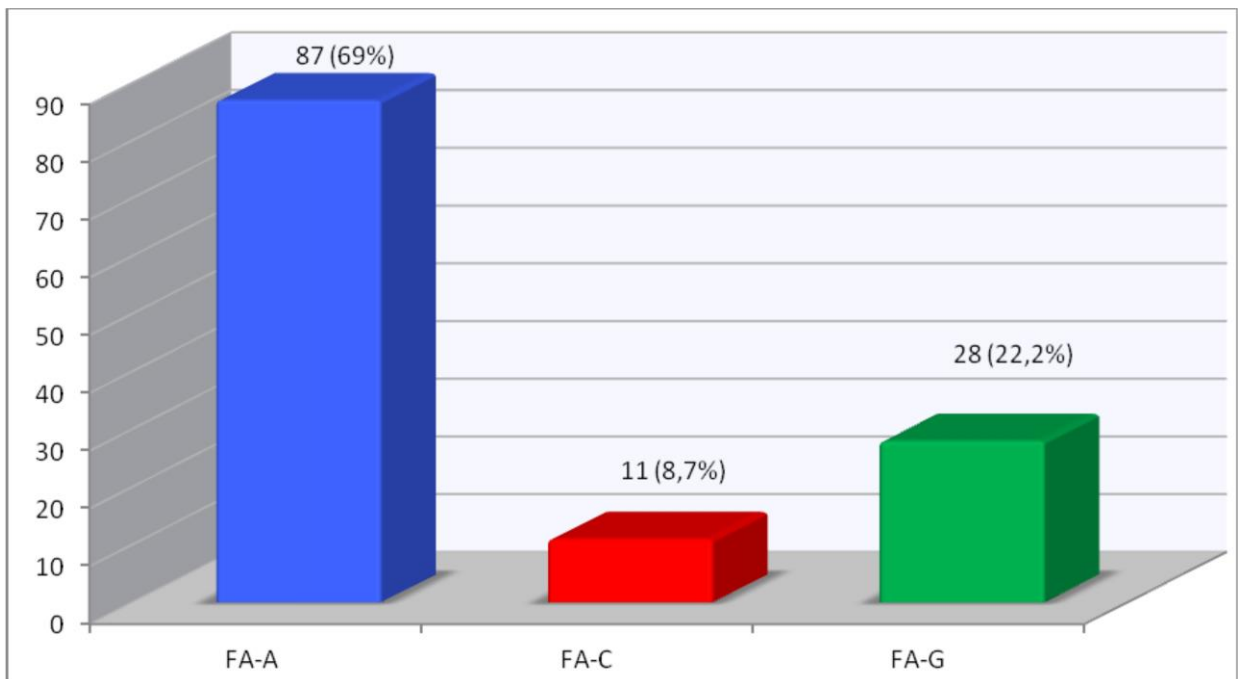
NOTAS: GD = grande deleção

- (1) Em destaque a análise da segregação dos alelos maternos e paternos dos pacientes portadores de novas mutações (os casos não avaliados se deve a indisponibilidade de amostras dos pais)
- (2) NA= Não avaliado. As grandes deleções não foram investigadas quanto à segregação dos alelos na família devido ao evidente efeito deletério.

## 5.5 DISTRIBUIÇÃO DOS 126 PACIENTES INVESTIGADOS NOS SUBTIPOS GENÉTICOS

A distribuição em grupos de complementação ou subtipos genéticos dos 126 pacientes nos quais foram detectadas mutações está demonstrada no Gráfico 1. Os demais 127 pacientes ainda não tiveram a pesquisa de mutações concluída.

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS 126 PACIENTES AF DE ACORDO COM OS SUBTIPOS GENÉTICOS



NOTA: Em 126 pacientes foram identificadas mutações sendo que 87/126 (69,0%) pacientes pertencem ao grupo FA-A; 11/126 (8,7%) foram incluídos no grupo FA-C e 28/126 (22,2%) pacientes foram atribuídos ao grupo FA-G. Em 127 pacientes não foram identificadas mutações nos testes de triagem.

## 5.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS PACIENTES COM AF NOS QUAIS FORAM IDENTIFICADAS MUTAÇÕES

A Tabela 6 apresenta a distribuição geográfica dos 126 pacientes por subtipo genético. Entre os 42 pacientes com origem na Região Sul, que tiveram mutações identificadas pelo teste de triagem, 39 (92,8%) são FA-A, dois (4,8%) são FA-C e um paciente (2,4%) é do subtipo FA-G. Dos 41 pacientes provenientes do Sudeste 25 (61%) são FA-A, cinco (12,2%) são FA-C e 11 (26,8%) são FA-G. Entre os 15 pacientes do Centro-Oeste oito (53,3%) são FA-A, um paciente (6,7%) é FA-C e seis (40,0%) são FA-G. Dos 24 provenientes da Região Nordeste 13 (54,2%) são FA-A, três (12,5%) são FA-C e oito (33,3%) são FA-G. Entre os quatro pacientes da Região Norte 2 (50%) são FA-A e 2 (50%) são FA-G.

A Tabela 7 apresenta a distribuição dos dois grupos de pacientes com as mutação mais frequentes, c.3788\_3790delTCT e c.1077-2A>G, provenientes das



regiões Sul e Sudeste comparadas às regiões Centro-Oeste e Nordeste. A Região Norte foi excluída pelo pequeno número de casos provenientes desta região.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS 126 PACIENTES AF NAS REGIÕES GEOGRÁFICAS POR SUBTIPO GENÉTICO

GENE MUTAÇÃO	SUL	SUDESTE	CENTRO-OESTE	NORDESTE	NORTE
	n= 42	n= 41	n= 15	n= 24	n= 4
<b>SUBTIPO FA-A</b>					
FANCA c.3788_3790delTCT	29	21	07	09	01
FANCA c.2535_2536delCT	ND	03	ND	02	01
FANCA c.987_990delTCAC	05	01	ND	ND	ND
FANCA c. 2853-19del 19	03	ND	01	01	ND
FANCA c.1115_1118delTTGG	02	ND	ND	01	ND
<b>SUBTOTAL POR REGIÃO</b>	<b>39 (92,8%)</b>	<b>25 (61%)</b>	<b>08 (53,3%)</b>	<b>13 (54,2%)</b>	<b>02 (50%)</b>
<b>SUBTIPO FA-C</b>					
FANCC c.65G>A	ND	03	ND	01	ND
FANCC c.456+4 A>T	ND	01	01	02	ND
FANCC c.1393 C>T	02	01	ND	ND	ND
<b>SUBTOTAL POR REGIÃO</b>	<b>02 (4,8%)</b>	<b>05 (12,2%)</b>	<b>01 (6,7%)</b>	<b>03 (12,5%)</b>	<b>ND</b>
<b>SUBTIPO FA-G</b>					
FANCG C.1077-2A>G	01	11	06	08	02
<b>SUBTOTAL POR REGIÃO</b>	<b>01 (2,4%)</b>	<b>11 (26,8%)</b>	<b>06 (40%)</b>	<b>08 (33,3%)</b>	<b>02 (50%)</b>

FONTE: A autora

NOTA: ND= Não detectada

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DAS MUTAÇÕES c.3788\_3790delTCT E c.1077-2A>G NAS REGIÕES DO BRASIL

MUTAÇÃO		REGIÃO GEOGRÁFICA		
		Sul/Sudeste	Centro-Oeste/ Nordeste	TOTAL
c.3788_3790delTCT	n	50	16	66
FANCA	%	75,7	24,2	100
c.1077-2A>G	n	12	14	26
FANCG	%	46,1	53,8	100

FONTE: A autora

NOTAS: Valor de  $p=0,012$ .

Método estatístico: Teste Exato de Fisher.

## 5.7 EFEITO DAS MUTAÇÕES AF NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA

Os dados fenotípicos e as informações disponíveis acerca das manifestações clínicas dos 126 pacientes estão apresentados no Apêndice 1.

Em razão do pequeno número de casos identificados com cada tipo de mutação, os dados foram avaliados de forma descritiva. As frequências e a estatística

descritiva das variáveis analisadas em relação às mutações identificadas estão apresentadas nos Apêndices 5 e 6.

Somente as mutações c.3788\_3790delTCT do gene *FANCA* e c.1077-2A>G do gene *FANCG* foram investigadas quanto aos seus efeitos sobre o fenótipo e às manifestações clínicas porque foram identificadas em número suficiente para análise.

Os resultados da associação destas duas mutações com o gênero, a consanguinidade entre os pais e a ocorrência de malformações extensas foram considerados fidedignos e estão descritos na Tabela 8. O impacto destas mutações sobre a idade e a situação hematológica ao diagnóstico bem como a necessidade de TCTH, apesar de descrito na Tabela 8, não foi analisado por limitações da coleta de dados retrospectivos.

TABELA 8 - ASSOCIAÇÃO DAS MUTAÇÕES c.3788\_3790delTCT E C.1077-2A> G COM O FENÓTIPO E AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES AF

VARIÁVEIS		<i>FANCA</i> c.3788_3790delTCT (n = 67)	<i>FANCG</i> c.1077-2A>G (n = 28)	VALORES DE <i>p</i>
Gênero	Feminino	31 (46,3%)	10 (35,7%)	0,344 <sup>(1)</sup>
	Masculino	36 (53,7%)	18 (64,3%)	
Consanguinidade entre os pais	Sim	10 (15,4%)	08 (29,6%)	0,117 <sup>(1)</sup>
	Não	55 (84,6%)	19 (70,4%)	
Extensão das malformações	Ausente/Limitada	43 (65,2%)	12 (44,5%)	0,103 <sup>(1)</sup>
	Extensa	23 (34,8%)	15 (55,5%)	
Idade ao diagnóstico	Média	7,5 (DP = 4,2)	7,4 (DP = 4,5)	NA
	Mediana	8,0 (0,5 a 25 anos)	7,0 (1,0 a 20 anos)	
Situação hematológica ao diagnóstico	Grau I/II	47 (70,1%)	11 (40,7%)	NA
	Grau III	20 (29,9%)	16 (59,3%)	
TCTH	Sim	39 (58,2%)	23 (85,2%)	NA
	Não	28 (41,8%)	04 (14,8%)	

FONTE: A autora

NOTA: TCTH= Transplante de Células Tronco Hematopoéticas; DP= desvio padrão; (1) Método estatístico= Teste Exato de Fisher; NA = Não analisado (a análise estatística não foi realizada devido à heterogeneidade dos dados).

## 6 DISCUSSÃO

A investigação molecular de pacientes com Anemia de Fanconi é complexa em função do grande número de genes associados a esta doença. Aliado a isso está o fato de que estes genes são polimórficos apresentando um grande número de alterações patogênicas e não patogênicas nas suas sequências. O tipo de alteração deletéria herdada dos pais em homozigose ou heterozigose composta pode variar desde mutações de ponto até grandes deleções, mutações que envolvem os sítios de *splicing* ou que alteram o quadro de leitura entre outras, porém todas elas resultam em produtos não funcionais ou na ausência de produto (KALB *et al.*, 2007).

O grande número de genes envolvidos e a complexidade deles torna o sequenciamento completo dos genes AF muito laborioso e de alto custo.

A investigação molecular da AF em pacientes brasileiros, partindo de um painel de mutações conhecidas, foi idealizada com o intuito de determinar a frequência destas mutações e a porcentagem de pacientes que poderiam ser subtipificados com esta estratégia a fim de tornar a investigação molecular menos dispendiosa, mais ágil e aplicável à rotina clínica.

Os genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG* foram selecionados para compor o painel de triagem por serem os que mais comumente apresentam mutações deletérias nos pacientes AF. Investigações sobre a frequência dos subtipos genéticos em diferentes populações mostraram resultados semelhantes, com 60 a 65 % dos pacientes incluídos no subtipo FA-A, 15% no subtipo FA-C, 10% no subtipo FA-G e os 10 a 15% restantes estão distribuídos entre os demais 13 subtipos (FAIVRE *et al.*, 2000; KUTLER *et al.*, 2003b; AUERBACH, 2009; GILLE *et al.*, 2012; AMEZIANE *et al.*, 2012)

Outras evidências corroboraram a escolha destes três genes para serem prioritariamente analisados e contribuíram para o estabelecimento da estratégia de investigação molecular neste estudo. Entre elas está a investigação do fenótipo da proteína *FANCD2* em 84 pacientes brasileiros (PILONETTO *et al.*, 2009) cujos resultados mostraram que 91,7% têm o fenótipo *FANCD2S+/L-* indicando mutações deletérias em genes do complexo principal. Uma única alteração em qualquer um dos oito genes que codificam proteínas do complexo principal da AF, entre eles o *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*, leva à falha da monoubiquitinação da proteína *FANCD2* impedindo o

progresso do mecanismo AF/BRCA e a expressão do fenótipo FANCD2S+/L-. Possivelmente a população selecionada para este estudo deve mostrar uma frequência conjunta dos subtipos FA-A, FA-C e FA-G tão elevada quanto aquela apresentada pela literatura (GILLE *et al.*, 2012).

Entre as cinco mutações selecionadas para a investigação do *FANCA* estão a c.3788\_3790delTCT e a c.1115\_1118delTTGG que são as alterações mais frequentes neste gene, segundo Levrán *et al.* (1997 e 2005). Esses autores observaram que 8,8% dos pacientes apresentaram a mutação c.3788\_3790delTCT e 5,5% a mutação c.1115\_1118delTTGG. Até janeiro de 2014 aproximadamente 1.436 pacientes registrados no banco de dados de mutações em Anemia de Fanconi (*FA Mutation Database* - <http://www.rockefeller.edu/fanconi/>) tinham o subtipo genético definido e entre estes 14,5% apresentavam a mutação c.3788\_3790delTCT e 4,6% a c.1115\_1118delTTGG. Os estudos de Levrán *et al.* (1997; 2005) sugerem que a frequência da mutação c.3788\_3790delTCT deve ser ainda maior entre brasileiros. Os achados atuais ampliam nossos dados anteriormente publicados por Magdalena *et al.* (2005) que encontraram a mutação c.3788\_3790delTCT em 24/80 (30%) dos pacientes AF. No presente estudo, que inclui estes 24 pacientes, 69 dos 255 pacientes (27,1%) a apresentaram.

A mutação c.1115\_1118delTTGG foi detectada em três (1,2%) dos 255 pacientes investigados neste estudo. Já Levrán *et al.* (1997; 2005) observaram uma frequência de 2,2% desta mutação em pacientes brasileiros, sendo inferior aos 5,5% apresentado pelos pacientes com outras etnias.

Castella *et al.* (2011b) investigaram 54 pacientes espanhóis previamente atribuídos ao grupo FA-A, selecionados por transdução retroviral, e observaram uma frequência de 20,7% da mutação c.3788\_3790delTCT e 9,4% da c.1115\_1118delTTGG. De Rocco *et al.* (2014) observaram uma alta frequência do subtipo FA-A entre italianos (85/100 pacientes), sendo que 10% dos pacientes apresentam a mutação c.3788\_3790delTCT e 2% a mutação c.1115\_1118delTTGG.

As mutações c.987\_990delTCAC, c.2535\_2536delCT e c.2853-19del19 também incluídas no painel de triagem do gene *FANCA* foram identificadas em um pequeno número de pacientes brasileiros em estudos anteriores (LEVRAN *et al.*, 1997; 2005). Tais mutações estão entre as mais frequentemente detectadas em pacientes do subtipo FA-A registrados no *FA database*. No presente estudo, as mutações c.987\_990delTCAC e

c.2535\_2536delCT foram encontradas com a frequência de 2,3% (6/255 pacientes) cada e a mutação c.2853-19del19 em 2,0% dos pacientes (5/255). Estas porcentagens, apesar de aparentemente baixas, estão acima das observadas no FA *database* em que 0,8% apresentam a mutação c.987\_990delTCAC, 0,6% a c.2535\_2536delCT e 0,5% a c.2853-19del19.

Yates *et al.* (2006) identificaram três novas mutações no gene *FANCC* em pacientes brasileiros, entre elas a c.1393C>T, e encontraram também a mutação c.65G>A, já descrita em estudos anteriores. No presente estudo, a mutação c.1393C>T foi observada em três dos 255 pacientes (1,2%) e a c.65G>A em quatro dos 255 pacientes (1,6%). As porcentagens destas mutações podem ser consideradas elevadas quando comparadas aos dados do FA *database*, que apresentam frequências de 0,35% para c.1393C>T e 0,8% para c.65G>A. A baixa frequência entre os pacientes do registro internacional, especialmente da c.1393C>T, pode ser justificada pelo fato de esta mutação ter sido identificada em brasileiros por Yates *et al.* (2006).

A descrição de pacientes com outras mutações em *FANCC*, como c.456+4A>T e c.67delG, é recorrente na literatura em razão da alta frequência em outras populações. A c.456+4A>T ocorre em 80% dos judeus Ashkenazi com AF. Já a mutação c.67delG é comum entre europeus, sendo encontrada em 50% dos pacientes AF de origem holandesa. (FAIVRE *et al.*, 2000; KUTLER *et al.*, 2003b; GILLE *et al.*, 2012).

Neste estudo, a mutação c.456+4A>T estava presente em quatro dos 255 pacientes (1,6%) e a c.67delG não foi identificada entre os pacientes investigados, com o método de triagem proposto. Estes resultados diferem dos dados do FA *database* em que 5,5% dos pacientes apresentam a c.456+4A>T e 4,1% a c.67delG. Isso se deve à presença de europeus e de judeus Ashkenazi entre os pacientes do registro internacional, o que reforça os dados da literatura sobre o predomínio de certas mutações em determinados grupos étnicos (KUTLER *et al.*, 2003b; FAIVRE *et al.*, 2000; NEVELING *et al.*, 2009).

Auerbach *et al.* (2003) investigaram 307 pacientes do FA *database* e observaram que 58 (43 probandos) tinham mutações no gene *FANCG*. Entre estes, todos os sete pacientes brasileiros apresentaram a mutação c.1077-2A>G, inicialmente descrita por Demuth *et al.* (2000). O fato de 28 entre os 255 (11%) pacientes analisados no presente estudo apresentarem a mutação c.1077-2A>G reforça estes achados.

Embora a mutação c.1480+1G>C do *FANCG* não tenha sido encontrada em nenhum dos pacientes analisados no presente estudo, ela foi observada com frequência em pacientes de outras etnias, segundo Auerbach *et al.* (2003).

O teste de triagem desenvolvido para este estudo, apesar de incluir somente três genes e onze mutações, possibilitou identificar as mutações AF em 128 dos 255 (50,2%) pacientes analisados. Considerando-se a grande heterogeneidade genética da AF pode-se dizer que esta estratégia é relevante para a caracterização molecular dos pacientes brasileiros com esta doença.

Somente no gene *FANCA* mais de 450 mutações, incluindo algumas grandes deleções, já foram identificadas. Com respeito aos genes *FANCC* e *FANCG* cerca de 60 mutações foram observadas em cada um deles. A extensa variabilidade destes genes resulta numa diversidade de combinações entre indivíduos da população que são portadores de um alelo mutado. O conhecimento das mutações específicas mais frequentes em determinadas etnias e (ou) localizações geográficas permitem a otimização dos testes de triagem (CASTELLA *et al.*, 2011b; GILLE *et al.*, 2012).

O teste de triagem de mutações AF desenvolvido neste estudo permitiu definir as mutações em 55,5% (71/128) dos pacientes em homozigose e 44,5% (57/128) em heterozigose. Em quatro destes pacientes heterozigotos, a segunda mutação foi definida ainda na triagem. A heterozigose composta é frequente na AF especialmente quando os genes envolvidos são o *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*. A herança de duas cópias alteradas por mutações distintas, porém no mesmo gene, resulta igualmente em um produto não funcional e na manifestação da doença.

Para a identificação da segunda mutação patogênica nos demais 53 pacientes heterozigotos, foi realizada a triagem de grandes deleções no gene *FANCA*, pelo método de MLPA e (ou) sequenciamento pelo método de Sanger do gene inicialmente envolvido (*FANCA* ou *FANCC* ou *FANCG*). Esta estratégia possibilitou que a segunda mutação fosse identificada em 51 dos 53 pacientes (40 em *FANCA*, quatro em *FANCC* e sete em *FANCG*).

Entre os 40 pacientes com heterozigose composta em *FANCA*, 25% apresentaram grandes deleções. Foram identificadas desde deleções envolvendo dois exons até a deleção de 36 dos 43 exons do gene *FANCA*. Uma mesma deleção (ex18\_23del) foi encontrada em três pacientes e duas das 10 grandes deleções detectadas ainda não foram descritas na literatura (Tabela 3).

A identificação de grandes deleções é essencial para o diagnóstico molecular da AF uma vez que 15 a 40% das mutações patogênicas em *FANCA* podem ser geradas por grandes deleções, geralmente detectadas em heterozigose com outros tipos de mutações no mesmo gene (AMEZIANE *et al.*, 2012, GILLE *et al.*, 2012). É possível que este tipo de deleção também seja encontrada entre os 127 pacientes que não tiveram suas mutações AF identificadas pelo teste de triagem inicial, uma vez que estes pacientes ainda não foram investigados por MLPA e (ou) sequenciamento. Esse fato sugere que a frequência das grandes deleções em *FANCA* possa ser superior aos 25% observados.

Em dois pacientes heterozigotos, não foi possível identificar a segunda mutação patogênica associada. Isso ocorreu possivelmente em razão do mosaïcismo somático que pode levar à reversão de um alelo mutado ao tipo selvagem. Esta é uma situação comumente observada neste tipo de investigação em pacientes com Anemia de Fanconi (WAISFISZ *et al.*, 1999; AMEZIANE *et al.*, 2008; NEVELING *et al.*, 2009; GILLE *et al.*, 2012; CASTELLA *et al.*, 2011b). A fonte de material utilizada para extração de DNA geralmente são linfócitos do sangue periférico, e este tecido está sujeito à reversão somática. Não foi possível concluir a investigação destes dois pacientes pela indisponibilidade de um tecido alternativo, não hematopoético, como fibroblastos da pele ou mesmo amostras dos pais.

Neste estudo, 49,4% (126/255) dos pacientes analisados pelo teste de triagem, associado aos métodos de MLPA e sequenciamento, tiveram ambas as mutações identificadas.

A triagem de mutações frequentes entre pacientes brasileiros permitiu diminuir em 29,4% a necessidade de testes adicionais como o MLPA e o sequenciamento, pois 75/255 pacientes tiveram ambas as mutações identificadas apenas com o teste inicial.

Dentre os pacientes *FANCA* heterozigotos que prosseguiram com análise de MLPA, em 3,9% (10/255) foram identificadas grandes deleções. A utilização do teste de triagem e do MLPA viabilizou a conclusão de 33,3% dos casos sem a necessidade da análise por sequenciamento. Além disso, esta estratégia possibilitou direcionar o sequenciamento para um único gene em 20,0% dos demais casos heterozigotos, uma vez que a segunda mutação a ser investigada possivelmente será detectada no mesmo gene inicialmente envolvido.

Foi realizado um cálculo aproximado dos custos de insumos e reagentes para a subtipificação genética de 100 pacientes que estão apresentados no Apêndice 8. Com base nestes dados, foi possível estimar uma redução de 25,7% no custo da subtipificação genética em pacientes AF brasileiros, utilizando a estratégia proposta. Essa redução do custo e especialmente do tempo na execução torna viável a pesquisa de mutações como ferramenta para o diagnóstico molecular da AF.

A análise por sequenciamento, nos pacientes que não tiveram a investigação concluída na triagem e tampouco por MLPA, mostrou que a presença de mutações era mais frequente em alguns exons do gene *FANCA*. Isto permite propor duas baterias de sequenciamento de acordo com a frequência dos exons envolvidos nos pacientes brasileiros: a primeira deve incluir os exons 2, 8, 28, 32, 37 e 41 e a segunda os exons 4, 10, 16, 29, 36, 40, 42 (Tabela 3). Tal estratégia evitará, na maioria dos casos, o sequenciamento dos demais 30 exons deste gene. Os pacientes que não tiverem suas mutações identificadas em *FANCA* devem seguir com o sequenciamento de *FANCG* e *FANCC*.

Utilizando a estratégia proposta neste estudo, um total de 52 mutações deletérias diferentes foi encontrado nos 126 pacientes com subtipificação concluída. Foram detectadas 17 mutações de ponto, 18 deleções e pequenas inserções, nove alterações em sítios de *splicing* e oito grandes deleções. Vinte e duas destas alterações (42,3%) são novas mutações até então não descritas em pacientes AF.

Entre as 22 novas mutações, 11 foram consideradas deletérias pelo tipo de alterações observadas, sendo seis alterações do quadro de leitura (*frameshift*) que podem resultar em um produto gênico diferente ou em ausência de produto, três mutações *nonsense* que geram códon de terminação precoces e duas grandes deleções com perda de grande parte das sequências codificadoras (Tabela 4).

Entre as outras 11 novas mutações, seis codificam um aminoácido diferente (*missense*), uma delas apresenta uma deleção de um aminoácido seguida de uma inserção (*in frame*) e quatro levam a alterações em sítios de *splicing* (Tabela 4). As consequências funcionais destas novas mutações sugerem patogenicidade após a investigação *in silico*, por meio de algoritmos de predição como SIFT, POLYPHEN2 e Align GVGD. Estes algoritmos permitem a classificação das mutações em deletérias ou neutras com base no possível impacto da substituição de um aminoácido sobre a estabilidade e a função da proteína gerada bem como no perfil de conservação dos



aminoácidos substituídos e na análise de sítios de *splicing* (TAVTIGIAN *et al.*, 2008; KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009; ADZHUBEI *et al.*, 2010). Embora não tenham sido realizados estudos funcionais ou análise do DNA complementar para confirmar a patogenicidade destas novas mutações, a análise *in silico* é uma ferramenta amplamente utilizada pois, ensaios de transfecção celular são laboriosos e de alto custo (GILLE *et al.*, 2012). No estudo de Castella *et al.* (2011b) todas as mutações *missense* analisadas, independentemente de sua posição no gene, levam a consequências funcionais mesmo quando os respectivos produtos alélicos são expressos em níveis normais. Estas alterações prejudicam o transporte da proteína mutante para o núcleo o que leva à inativação da via AF/BRCA.

Todas as novas mutações detectadas no presente estudo estavam em heterozigose com uma outra mutação previamente definida como deletéria no mesmo gene. A maioria foi identificada em um único paciente desta casuística, porém três destas alterações (c.190-2A>T; c.3163C>G e c.4082A>C do gene *FANCA*) foram encontradas em dois pacientes não consanguíneos, fato este que reforça o caráter patogênico destas mutações.

Outra abordagem que sugere a patogenicidade destas novas mutações foi a análise de segregação dos alelos nas famílias. Em 12 das 22 alterações foi possível investigar a segregação dos alelos maternos e paternos (Tabela 5), porém as grandes deleções não foram investigadas nas amostras parentais devido à evidente consequência funcional sobre o produto gerado.

Esta análise de segregação nas famílias permitiu também validar os resultados obtidos com o teste de triagem de mutações. Em 95 dos 126 pacientes (75,4%) foi possível detectar nos pais as mutações encontradas previamente nos pacientes. Alguns casos não puderam ser investigados devido à indisponibilidade de amostra materna e (ou) paterna (Tabela 5). A definição da mutação herdada dos pais em homozigose ou em heterozigose composta, seguida da análise da segregação dos alelos na família, possibilita a investigação de portadores heterozigotos e o aconselhamento genético. Todos os pacientes com diagnóstico de AF confirmado pela investigação de mutações devem ser encaminhados para o aconselhamento genético, juntamente com os pais e irmãos. A investigação de mutações deve ser realizada em todos os irmãos independente da manifestação de malformações congênitas ou sintomas clínicos (GILLE *et al.*, 2012; KEE; D'ANDREA, 2012).

Pacientes AF têm diminuição da fertilidade, não obstante, a gravidez possa ocorrer, e eles devem ser adequadamente informados sobre os riscos para a sua prole e as complicações relacionadas com a gravidez (ALTER *et al.*, 1991).

Os estudos realizados em portadores de mutações AF ainda não são conclusivos sobre a predisposição ao câncer, alguns indicam que não há aumento do risco de câncer entre os heterozigotos portadores de mutações AF (BERWICK *et al.*, 2007; TISCHKOWITZ *et al.*, 2008). A situação é diferente em subtipos AF menos prevalentes como FA-D1, FA-N e FA-O, nos quais portadores de mutações nestes genes apresentam predisposição ao desenvolvimento de câncer (GILLE *et al.*, 2012). Ainda não foi estabelecida uma estimativa precisa do risco de câncer em portadores de mutação AF para todos os subtipos genéticos.

Indivíduos portadores de genes AF alterados têm um baixo risco de gerar descendentes com a doença uma vez que a frequência de portadores é muito baixa na população. Nos EUA a frequência de portadores foi estimada em cerca de um em cada 181 indivíduos da população (ROSENBERG; TAMARY; ALTER., 2011). Segundo Gille *et al.* (2012) o risco de um portador gerar uma criança com AF é de 1 em 724. No Brasil, a frequência de portadores ainda não é conhecida.

Em situações de consanguinidade o risco é muito maior, pois quando ambos os pais são portadores de um mesmo gene mutado a probabilidade de gerar um filho afetado é de um em cada quatro. Nestes casos é recomendável a investigação molecular dos genes AF para a identificação de portadores da mutação segregada na família. No presente estudo 23,8% das famílias investigadas apresentavam consanguinidade entre os pais.

Quando analisada a distribuição dos 126 pacientes por subtipo genético, 87 deles (69,0%) pertencem ao grupo FA-A, 11 (8,7%) ao FA-C e 28 (22,2%) ao FA-G. Porém, em 49,8% (127/255) dos pacientes AF que compõem a amostra total nenhuma das 11 mutações incluídas no teste de triagem foi detectada. Estes pacientes serão investigados em estudos subsequentes utilizando-se estratégias mais abrangentes como sequenciamento de próxima geração, que permite a investigação simultânea de todos os genes envolvidos na AF ou ainda detecção de possíveis novas alterações ao longo do genoma, seguido do sequenciamento completo do gene candidato (AMEZIANE *et al.*, 2012; KNIES *et al.*, 2012; DE ROCCO *et al.*, 2014).

Gille *et al.* (2012) avaliaram 54 pacientes de 11 nacionalidades e determinaram o subtipo genético em 83% dos pacientes utilizando MLPA e sequenciamento do *FANCA*, *C*, *E*, *F*, *G* e *B*. Nesse estudo de Gille *et al.* (2012), 57% dos pacientes foram incluídos no subtipo FA-A, 11% no FA-C, 9 % no FA-G e apenas uma família foi identificada em cada um dos demais grupos. Estudos em outras populações identificaram frequências semelhantes destes subtipos genéticos (FAIVRE *et al.*, 2000; KUTLER *et al.*, 2003b; AUERBACH, 2009).

Baseado nas frequências dos subtipos genéticos descritas na literatura, possivelmente 60% dos 127 pacientes ainda não identificados pertencerão ao subtipo FA-A, porém com mutações diferentes daquelas incluídas na triagem. O subtipo FA-C, que representa 8,7% dos 126 pacientes, pode ser esperado em igual proporção entre os não identificados, podendo chegar a 10-15% como observado em pacientes AF de outras origens.

Por outro lado, o subtipo FA-G mostrou-se mais elevado nestes pacientes brasileiros quando comparado aos dados da literatura. Isso se deve à presença de uma mesma mutação, c.1077-2A>G identificada em 22,2% (28/126) dos pacientes com a investigação concluída. Este dado é superior aos valores em torno de 10% descritos na literatura. Entre os 28 pacientes com a mutação c.1077-2A>G, sete foram identificados em heterozigose composta estando três das outras mutações localizadas no exon 10. A investigação de alterações na sequência completa do *FANCG*, entre aqueles pacientes cujas mutações não foram detectadas pelo teste de triagem, poderá esclarecer a frequência deste subtipo genético em pacientes brasileiros.

A distribuição dos subtipos genéticos conforme a região geográfica dos 126 pacientes mostrou uma representatividade marcante do subtipo FA-A na Região Sul, com 92,8% dos pacientes incluídos neste subtipo e apenas 2,4% no subtipo FA-G nesta mesma região. O número de casos FA-A diminui nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, sendo 61,0%; 53,3% e 54,2%, respectivamente e o subtipo FA-G aumenta com 26,8% no Sudeste; 40,0% no Centro-Oeste e 33,3% no Nordeste. Essa avaliação não foi realizada para a Região Norte em função do limitado número de casos (Tabela 6).

Esse perfil pode ser explicado pela distribuição geográfica das mutações mais frequentes, c.3788\_3790delTCT e c.1077-2A>G, que é estatisticamente diferente nas regiões Sul e Sudeste quando comparado às regiões Centro-Oeste e Nordeste ( $p=$

0,012; Tabela 7). Porém, o número de pacientes analisados é pequeno, especialmente aqueles com a mutação c.1077-2A>G do subtipo FA-G, o que torna a análise pouco precisa. Apesar disso, deve-se considerar que em outras populações, nas quais a distribuição dos pacientes por subtipos genéticos é conhecida, a frequência de pacientes FA-G é seis a sete vezes menor do que o subtipo FA-A.

Para definir com maior precisão a distribuição geográfica dos subtipos genéticos entre brasileiros é necessário a realização de um estudo epidemiológico, que permita determinar o número de casos representativos da incidência da doença por região do país.

No estudo de Auerbach *et al.* (2003) foram identificados dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *FANCG* associados às famílias brasileiras portadoras da c.1077-2A>G, o que sugere um possível efeito fundador desta mutação. Castella *et al.* (2011b) investigaram 10 SNPs no gene *FANCA* em 28 pacientes, de diferentes localizações geográficas, incluindo o Brasil, com a mutação c.3788\_3790delTCT e concluíram que todos possuem o mesmo haplótipo sugerindo que compartilham um ancestral comum. A investigação de SNPs comuns às famílias identificadas no presente estudo com c.1077-2A>G e c.3788\_3790delTCT poderiam caracterizar melhor o possível efeito fundador destas mutações entre brasileiros.

A identificação de mutações nos pacientes AF, além de definir os subtipos genéticos e proporcionar um diagnóstico preciso, também possibilita a investigação da associação dos genótipos AF com os fenótipos e as manifestações clínicas.

No presente estudo foram comparados os pacientes com as mutações c.3788\_3790delTCT do gene *FANCA* que resulta na deleção de um aminoácido (p.Phe1263del) com pacientes que apresentam a mutação c.1077-2A>G do gene *FANCG* que inativa o sítio acceptor de *splicing* do intron 8, resultando na perda do exon 9. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes quanto ao gênero, à consanguinidade entre os pais e ocorrência de malformações extensas (Tabela 8).

Castella *et al.* (2011b) investigaram a associação de tipos diferentes de mutações com as malformações e a idade do início das alterações hematológicas em pacientes do subtipo FA-A. Foram comparados pacientes que apresentavam mutações nulas à pacientes com mutações que geram produto diferente, porém não funcional (*missense*). Estes autores concluíram que um produto residual, não funcional do gene *FANCA* não diminui a gravidade das manifestações clínicas dos pacientes.

Estão descritas na literatura mutações que conferem características específicas a certos grupos étnicos. Entre elas a c.1649delC do gene *FANCG* presente em pacientes europeus com pancitopenia neonatal (LANDMANN *et al.*, 2004). As mutações c.456+4A>T e c.1642 C>T do *FANCC* que predispõem ao início precoce da disfunção da medula óssea e a menor sobrevida global em pacientes norte-americanos (KUTLER *et al.*, 2003b) e a c.67delG que está associada às manifestações clínicas de menor gravidade em pacientes europeus (FAIVRE *et al.*, 2000; NEVELING *et al.*, 2009).

No presente estudo, a análise de associação das mutações c.3788\_3790delTCT (*FANCA*) e a c.1077-2A>G (*FANCG*) com a idade e a situação hematológica ao diagnóstico bem como a ocorrência de TCTH, não foi realizada devido às limitações dos dados retrospectivos. É preciso considerar que o motivo da consulta inicial pode ser pela existência de alterações hematológicas, fenótipo ou história familiar o que resulta em heterogeneidade da amostra e pode interferir na definição das alterações hematológicas do paciente ao diagnóstico enfraquecendo os valores médios e medianos obtidos. Em alguns casos há também escassez de informações prévias à primeira consulta, o que impede a avaliação do início das manifestações hematológicas. A necessidade de TCTH e a avaliação da idade ao TCTH podem sofrer influência de fatores como a indisponibilidade de doador compatível ou ainda o óbito precoce do paciente. Além disso, alguns dados não puderam ser obtidos porque os pacientes abandonaram o seguimento no ambulatório de AF do HC/UFPR.

É necessário o seguimento de um maior número de casos em um estudo prospectivo para concluir acerca do efeito destas mutações sobre a evolução clínica da doença nos pacientes brasileiros.

Além disso, uma mesma mutação também pode estar associada a fenótipos clínicos diferentes, até mesmo em indivíduos da mesma família. Isso porque fatores epigenéticos, ontogenéticos, étnicos e ou ambientais também podem exercer influência sobre o fenótipo. Por exemplo, homozigotos para a mutação c.456 + 4A>T em *FANCC* estão associados à maior gravidade em judeus Ashkenazi quando comparados com a população japonesa (KUTLER; AUERBACH, 2004; FUTAKI *et al.*, 2000; AUERBACH, 2009). A presença do mosaicismosomático pode levar à correção da falência da medula óssea pela reversão genética espontânea de células hematopoéticas, o que pode explicar algumas das diferenças observadas (OOSTRA *et al.*, 2012).

Pacientes com AF requerem condutas clínicas especiais e o diagnóstico deve ser preciso para excluir outras doenças com fenótipos semelhantes. Um diagnóstico AF válido requer a detecção de mutações patogênicas nos genes AF e (ou) um resultado positivo de um teste de quebras cromossômicas. A identificação das mutações patogênicas é importante não só para o diagnóstico, mas também para a detecção de portadores na família, para descartar a hipótese de diagnóstico de AF em potenciais doadores consanguíneos de células tronco-hematopoéticas, para facilitar o diagnóstico da doença pré-natal bem como para o aconselhamento genético do paciente e seus familiares (AMEZIANE *et al.*, 2012; GILLE *et al.*, 2012).

Considerando a característica dos pacientes brasileiros investigados no presente estudo, o teste de triagem direta das mutações mais frequentes, associado aos métodos de MLPA e ao sequenciamento, envolvendo os genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*, poderá permitir o diagnóstico molecular de 85 a 90% dos pacientes. Esta estratégia é uma proposta tecnicamente menos laboriosa, permite obter resultados mais rápidos e, além disso, é de menor custo. Abordagens semelhantes utilizadas por Castella *et al.* (2011b) e Gille *et al.* (2012) em populações predominantemente europeias também mostraram resultados satisfatórios.

O desenvolvimento desta estratégia de tipificação molecular para os pacientes brasileiros com AF permitirá a investigação mais ampla do efeito das mutações na evolução desta doença. Abrirá novas possibilidades para a investigação do impacto das mutações dos genes da AF no desenvolvimento de neoplasias hematológicas e de tumores sólidos, não somente nos pacientes com Anemia de Fanconi, mas também em pacientes sem diagnóstico de AF que apresentem os mesmos tipos de neoplasias.

A utilização de tecnologias desenvolvidas recentemente também pode ser considerada para a pesquisa de mutações nos pacientes AF. A análise do exoma ou até mesmo do genoma é uma abordagem que pode levar à descoberta de novos genes AF, ou a identificação de mutações em genes de menor frequência, os quais podem fazer parte dos mecanismos moleculares que resultam no desenvolvimento do câncer. Estudos desta natureza podem ser relevantes para a definição de novas alternativas terapêuticas para tratamento de doenças malignas no futuro.

## 7 CONCLUSÕES

Os métodos estabelecidos para a triagem de mutações AF foram eficientes, pois permitiram a identificação de mutações em 50,2% dos pacientes (128/255), sendo 71 em homozigose e 57 em heterozigose composta. O teste de triagem definiu ambas as mutações em quatro dos 57 heterozigotos.

A complementação da análise do gene envolvido (*FANCA*, *FANCC* ou *FANCG*) por MLPA e ou sequenciamento possibilitou a identificação da segunda mutação patogênica em 51 dos 53 pacientes heterozigotos não definidos na triagem. Dois pacientes não tiveram a segunda mutação identificada provavelmente devido à presença de mosaïcismo.

A utilização da estratégia proposta levou à identificação de 52 mutações diferentes, desde mutações de ponto até grandes deleções. Destas, 22 (42,3%) são novas mutações até então não encontradas nos pacientes AF.

A identificação das mutações em 126 pacientes permitiu distribuí-los nos subtipos genéticos, sendo 69,0% pertencentes ao grupo FA-A, 8,7% ao grupo FA-C e 22,2% ao grupo FA-G. As mutações c.3788\_3790delTCT do gene *FANCA* e c.1077-2A>G do gene *FANCG* apresentaram maior frequência.

O teste inicial de triagem possibilitou diminuir em 29,4% a necessidade do sequenciamento de genes AF e direcionou o sequenciamento para um único gene em 20,0% dos casos. Esta estratégia de subtipificação genética é tecnicamente menos laboriosa, de menor tempo de execução e de menor custo.

Não foi observada associação estatisticamente significativa das mutações c.3788\_3790delTCT e c.1077-2A>G com o gênero, a ocorrência de consanguinidade e tampouco com as extensão das malformações.

## REFERÊNCIAS

ADZHUBEI, I. A.; SCHMIDT, S.; PESHKIN, L.; RAMENSKY, V. E.; GERASIMOVA, A.; BORK, P.; KONDRASHOV, A. S.; SUNYAEV, S. R. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v.7, n.4, p.248-249, 2010.

ALTER, B. P. Radiosensitivity in Fanconi's Anemia patients. **Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, v.62, n.3, p.345-347, 2002.

ALTER, B. P.; FRISSORA, C. L.; HALPÉRIN, D. S.; FREEDMAN, M. H.; CHITKARA, U.; ALVAREZ, E.; LYNCH, L.; ADLER-BRECHER, B.; AUERBACH, A. D. Fanconi's anaemia and pregnancy. **British Journal of Haematology**, v.77, n.3, p.410-418, 1991.

ALTER, B. P.; GIRI, N.; SAVAGE, S. A.; PETERS, J. A.; LOUD, J. T.; LEATHWOOD, L.; CARR, A. G.; GREENE, M. H.; ROSENBERG, P. S. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. **British Journal of Haematology**, v.150, n.2, p.179-188, 2010.

ALTER, B. P.; JOENJE, H.; OOSTRA, A. B.; PALS, G. Fanconi Anemia: adult head and neck cancer and hematopoietic mosaicism. **JAMA Otolaryngology- Head & Neck Surgery**, v.131, n.7, p.635-639, 2005.

AMEZIANE, N.; ERRAMI, A.; LÉVEILLÉ, F.; FONTAINE, C.; DE VRIES, Y.; VAN SPAENDONK, R. M.; DE WINTER, J. P.; PALS, G.; JOENJE, H. Genetic subtyping of Fanconi Anemia by comprehensive mutation screening. **Human Mutation**, v.29, n.1, p.159-166, 2008.

AMEZIANE, N.; SIE, D.; DENTRO, S.; ARIYUREK, Y.; KERKHOVEN, L.; JOENJE, H.; DORSMAN, J. C.; YLSTRA, B.; GILLE, J. J.; SISTERMANS, E. A.; DE WINTER, J. P. Diagnosis of Fanconi Anemia: mutation analysis by next-generation sequencing. **Anemia**, v.2012, p.132856, 2012.

APOSTOLOU, S.; WHITMORE, S. A.; CRAWFORD, J.; LENNON, G.; SUTHERLAND, G. R.; CALLEN, D. F.; IANZANO, L.; SAVINO, M.; D'APOLITO, M.; NOTARANGELO, A.; MENEIO, E.; PIEMONTESE, M. R.; ZELANTE, L.; SAVOIA, A.; GIBSON, R. A.; TIPPING, A. J.; MORGAN, N. V.; HASSOCK, S.; JANSEN, S.; DE RAVEL, T. J.; VAN BERKEL, C.; PRONK, J.; EASTON, D. F.; MATHEW, C. G.; CLENTON-JANSEN, A.-M.; MOERLAND, E. W.; CORNELISSE, C. J.; DOGGETT, N. A.; DEAVEN, L. L.; MOYZIS, R. K. Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. **Nature Genetics**, v.14, n. 3, p.324-328, 1996.



AUERBACH, A. D. Fanconi Anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. **Experimental Hematology**, v.21, n.6, p.731-733, 1993.

AUERBACH, A. D. Fanconi Anemia and its Diagnosis. **Mutation Research**, v.668, n.1-2, p.4-10, 2009.

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. **Human Mutation**, v.21, n.2, p.158-168, 2003.

AUERBACH, A. D.; WOLMAN, S. R. Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. **Nature**, v.261, n.5560, p.494-496, 1976.

BERWICK, M.; SATAGOPAN, J. M.; BEN-PORAT, L.; CARLSON, A.; MAH, K.; HENRY, R.; DIOTTI, R.; MILTON, K.; PUJARA, K.; LANDERS, T.; DEV BATISH, S.; MORALES, J.; SCHINDLER, D.; HANENBERG, H.; HROMAS, R.; LEVRAN, O.; AUERBACH, A. D. Genetic heterogeneity among Fanconi Anemia heterozygotes and risk of cancer. **Cancer Research**, v.67, n.19, p.9591-9596, 2007.

BOGLIOLO, M.; SCHUSTER, B.; STOEPKER, C.; DERKUNT, B.; SU, Y.; RAAMS, A.; TRUJILLO, J. P.; MINGUILLÓN, J.; RAMÍREZ, M. J.; PUJOL, R.; CASADO, J. A.; BAÑOS, R.; RIO, P.; KNIES, K.; ZUÑIGA, S.; BENÍTEZ, J.; BUEREN, J. A.; JASPERS, N. G.; SCHÄRER, O. D.; DE WINTER, J. P.; SCHINDLER, D.; SURRALLÉS, J. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi Anemia. **American Journal of Human Genetics**, v.92, n.5, p.800-806, 2013.

BROOKS, P. J.; ENOCH, M.-A.; GOLDMAN, D.; LI, T.-K.; YOKOYAMA, A. The alcohol flushing response: an unrecognized risk factor for esophageal cancer from alcohol consumption. **PLoS Medicine**, v.6, n.3, p.e50, 2009.

CASTELLA, M.; PUJOL, R.; CALLÉN, E.; RAMÍREZ, M. J.; CASADO, J. A.; TALAVERA, M.; FERRO, T.; MUÑOZ, A.; SEVILLA, J.; MADERO, L.; CELA, E.; BELÉNDEZ, C.; DE HEREDIA, C. D.; OLIVÉ, T.; DE TOLEDO, J. S.; BADELL, I.; ESTELLA, J.; DASÍ, Á.; RODRÍGUEZ-VILLA, A.; GÓMEZ, P.; TAPIA, M.; MOLINÉS, A.; FIGUERA, Á.; BUEREN, J. A.; SURRALLÉS, J. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. **Journal of Medical Genetics**, v.48, n.4, p.242-250, 2011a.

CASTELLA, M.; PUJOL, R.; CALLÉN, E.; TRUJILLO, J. P.; CASADO, J. A.; GILLE, H.; LACH, F. P.; AUERBACH, A. D.; SCHINDLER, D.; BENÍTEZ, J.; PORTO, B.; FERRO, T.; MUÑOZ, A.; SEVILLA, J.; MADERO, L.; CELA, E.; BELÉNDEZ, C.; DE HEREDIA, C. D.; OLIVÉ, T.; DE TOLEDO, J. S.; BADELL, I.; TORRENT, M.; ESTELLA, J.; DASÍ, A.; RODRÍGUEZ-VILLA, A.; GÓMEZ, P.; BARBOT, J.; TAPIA, M.; MOLINÉS, A.; FIGUERA, A.; BUEREN, J. A.; SURRALLÉS, J. Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi Anemia *FANCA* mutations. **Blood**, v.117, n.14, p.3759-3769, 2011b.

CECCALDI, R.; PARMAR, K.; MOULY, E.; DELORD, M.; KIM, J. M.; REGAIRAZ, M.; PLA, M.; VASQUEZ, N.; ZHANG, Q. S.; PONDARRE, C.; PEFFAULT DE LATOUR, R.; GLUCKMAN, E.; CAVAZZANA-CALVO, M.; LEBLANC, T.; LARGHERO, J.; GROMPE, M.; SOCIÉ, G.; D'ANDREA, A. D.; SOULIER, J. Bone marrow failure in Fanconi Anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Stem Cell**, v.11, n.1, p.36-49, 2012.

CHANDRA, S.; LEVRAN, O.; JURICKOVA, I.; MAAS, C.; KAPUR, R.; SCHINDLER, D.; HENRY, R.; MILTON, K.; BATISH, S. D.; CANCELAS, J. A.; HANENBERG, H.; AUERBACH, A. D.; WILLIAMS, D. A. A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi Anemia patients. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v.12, n.5, p.976-984, 2005.

CHIRNOMAS, D.; TANIGUCHI, T.; DE LA VEJA, M.; VAIDYA, A. P.; VASSERMAN, M.; HARTMAN, A. R.; KENNEDY, R.; FOSTER, R.; MAHONEY, J.; SEIDEN, M. V.; D'ANDREA, A. D. Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi Anemia/BRCA pathway. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.5, n.4, p.952-961, 2006.

CROSSAN, G. P.; PATEL, K. J. The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. **The Journal of Pathology**, v.226, n.2, p.326-337, 2012.

DEANS, A. J.; WEST, S. C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v.11, n.7, p.467-480, 2011.

DEMUTH, I.; WLODARSKI, M.; TIPPING, A. J.; MORGAN, N. V.; DE WINTER, J. P.; THIEL, M.; GRÄSL, S.; SCHINDLER, D.; D'ANDREA, A. D.; ALTAY, C.; KAYSERILI, H.; ZATTERALE, A.; KUNZE, J.; EBELL, W.; MATHEW, C. G.; JOENJE, H.; SPERLING, K.; DIGWEED, M. Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, *FANCG/XRCC9*. **European Journal of Human Genetics: EJHG**, v.8, n.11, p.861-868, 2000.

DE ROCCO, D.; BOTTEGA, R.; CAPPELLI, E.; CAVANI, S.; CRISCUOLO, M.; NICCHIA, E.; CORSOLINI, F.; GRECO, C.; BORRIELLO, A.; SVAHN, J.; PILLON, M.; MECUCCI, C.; CASAZZA, G.; VERZEGNASSI, F.; CUGNO, C.; LOCASCIULLI, A.; FARRUGGIA, P.; LONGONI, D.; RAMENGI, U.; BARBERI, W.; TUCCI, F.; PERROTTA, S.; GRAMMATICO, P.; HANENBERG, H.; DELLA RAGIONE, F.; DUFOUR, C.; SAVOIA, A. Molecular analysis of Fanconi Anemia: the experience of the Bone Marrow Failure Study Group of the Italian Association of Pediatric Onco-Hematology. **Haematologica**, 2014.

DUFOUR, C.; SVAHN, J. Fanconi Anaemia: new strategies. **Bone Marrow Transplantation**, v.41 Suppl 2, p.S90-S95, 2008.

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 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 (F.A.). I. Clinical aspects. **Seminars in Hematology**, v.4, n.3, p.233-240, 1967.

FUTAKI, M.; YAMASHITA, T.; YAGASAKI, H.; TODA, T.; YABE, M.; KATO, S.; ASANO, S.; NAKAHATA, T. The IVS4 + 4 A to T mutation of the Fanconi Anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. **Blood**, v.95, n.4, p.1493-1498, 2000.

GARAYCOECHEA, J. I.; CROSSAN, G. P.; LANGEVIN, F.; DALY, M.; ARENDS, M. J.; PATEL, K. J. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. **Nature**, v.489, n.7417, p.571-575, 2012.

GARAYCOECHEA, J. I.; PATEL, K. J. Why does the bone marrow fail in Fanconi Anemia? **Blood**, v.123, n.1, p.26-34, 2014.

GENNERY, A. R.; SLATTER, M. A.; BHATTACHARYA, A.; BARGE, D.; HAIGH, S.; O'DRISCOLL, M.; COLEMAN, R.; ABINUN, M.; FLOOD, T. J.; CANT, A. J.; JEGGO, P. A. The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi Anemia. **Clinical Immunology**, v.113, n.2, p.214-219, 2004.

GIBSON, R. A.; MORGAN, N. V.; GOLDSTEIN, L. H.; PEARSON, I. C.; KESTERTON, I. P.; FOOT, N. J.; JANSEN, S.; HAVENGA, C.; PEARSON, T.; DE RAVEL, T. J.; COHN, R. J.; MARQUES, I. M.; DOKAL, I.; ROBERTS, I.; MARSH, J.; BALL, S.; MILNER, R. D.; LLERENA, J. C. JR.; SAMOCHATOVA, E.; MOHAN, S. P.; VASUDEVAN, P.; BIRJANDI, F.; HAJIANPOUR, A.; MURER-ORLANDO, M.; MATHEW, C. G. Novel mutations and polymorphisms in the Fanconi Anemia group C gene. **Human Mutation**, v.8, n.2, p.140-148, 1996.

GILLE, J. J.; FLOOR, K.; KERKHOVEN, L.; AMEZIANE, N.; JOENJE, H.; DE WINTER, J. P. Diagnosis of Fanconi Anemia: Mutation Analysis by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and PCR-Based Sanger Sequencing. **Anemia**, v.2012, p.603253, 2012.

GODTHELP, B. C.; WIEGANT, W. W.; WAISFISZ, Q.; MEDHURST, A. L.; ARWERT, F.; JOENJE, H.; ZDZIENICKA, M. Z. Inducibility of nuclear Rad51 foci after DNA damage distinguishes all Fanconi Anemia complementation groups from D1/BRCA2. **Mutation Research**, v.594, n.1-2, p.39-48, 2006.

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.

GURTAN, A. M.; STUCKERT, P.; D'ANDREA, A. D. The WD40 repeats of FANCL are required for Fanconi Anemia core complex assembly. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.16, p.10896-10905, 2006.

HALIASSOS, A.; CHOMEL, J.; TESSON, L. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. **Nucleic Acids Research**, v.17, n.9, p.3606, 1989.

HANENBERG, H.; BATISH, S. D.; POLLOK, K. E.; VIETEN, L.; VERLANDER, P. C.; LEURS, C.; COOPER, R. J.; GÖTTSCHE, K.; HANELINE, L.; CLAPP, D. W.; LOBITZ, S.; WILLIAMS, D. A.; AUERBACH, A. D. Phenotypic correction of primary Fanconi Anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. **Experimental Hematology**, v.30, n.5, p.410-420, 2002.

HAYS, L. E.; MEYER, S.; VRUGT, H. J. VAN DE. A molecular, genetic, and diagnostic spotlight on fanconi Anemia. **Anemia**, v.2012, n. Figure 1, p.650730, 2012.

HIRSCHHORN, R. In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. **Journal of Medical Genetics**, v.40, n.10, p.721-728, 2003.

JENKINS, C.; KAN, J.; HOATLIN, M. E. Targeting the fanconi Anemia pathway to identify tailored anticancer therapeutics. **Anemia**, v.2012, p.481583, 2012.

JOENJE, H. Metabolism: alcohol, DNA and disease. **Nature**, v.475, n.7354, p.45-56, 2011.

KALB, R.; NEVELING, K.; HOEHN, H.; SCHNEIDER, H.; LINKA, Y.; BATISH, S. D.; HUNT, C.; BERWICK, M.; CALLEN, E.; SURRALLES, J.; CASADO, J. A.; BUEREN, J.; DASI, A.; SOULIER, J.; GLUCKMAN, E.; ZWAAN, C. M.; VAN SPAENDONK, R.; PALS, G.; DE WINTER, J. P.; JOENJE, H.; GROMPE, M.; AUERBACH, A. D.; HANENBERG, H.; SCHINDLER, D. Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi Anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. **American Journal of Human Genetics**, v.80, n.5, p.895-910, 2007.

KE, X.; COLLINS, A.; YE, S. PCR designer for restriction analysis of various types of sequence mutation. **Bioinformatics**, v.18, n.12, p.1688-1689, 2002.

KEE, Y.; D'ANDREA, A. D. Expanded roles of the Fanconi Anemia pathway in preserving genomic stability. **Genes & Development**, v.24, n.16, p.1680-1694, 2010.

KEE, Y.; D'ANDREA, A. D. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi Anemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v.122, n.11, p.3799-3806, 2012.

KNIES, K.; SCHUSTER, B.; AMEZIANE, N.; ROOIMANS, M.; BETTECKEN, T.; DE WINTER, J.; SCHINDLER, D. Genotyping of Fanconi Anemia patients by whole exome sequencing: advantages and challenges. **PLoS One**, v.7, n.12, p.e52648, 2012.

KOTTEMANN, M. C.; SMOGORZEWSKA, A. Fanconi Anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. **Nature**, v.493, n.7432, p.356-363, 2013.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature Protocols**, v.4, n.7, p.1073-1081, 2009.

KUPFER, G. M. Fanconi Anemia: A Signal Transduction and DNA Repair Pathway. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.86, n.4, p.491-497, 2013.

KUTLER, D. I. Human Papillomavirus DNA and p53 Polymorphisms in Squamous Cell Carcinomas From Fanconi Anemia Patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v.95, n.22, p.1718-1721, 2003.

KUTLER, D. I.; AUERBACH, A. D. Fanconi Anemia in Ashkenazi Jews. **Familial Cancer**, v.3, n.3-4, p.241-248, 2004.

KUTLER, D. I.; AUERBACH, A. D.; SATAGOPAN, J.; GIAMPIETRO, P. F.; BATISH, S. D.; HUVOS, A. G.; GOBERDHAN, A.; SHAH, J. P.; SINGH, B. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi Anemia. **Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, v.129, n.1, p.106-112, 2003a.

KUTLER, D. I.; SINGH, B.; SATAGOPAN, J.; BATISH, S. D.; BERWICK, M.; GIAMPIETRO, P. F.; HANENBERG, H.; AUERBACH, A. D. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**, v.101, n.4, p.1249-1256, 2003b.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A.; UITTO, J. Revertant mosaicism in skin: natural gene therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v.17, n.3, p.140-148, 2011.

LANDMANN, E.; BLUETTERS-SAWATZKI, R.; SCHINDLER, D.; GORTNER, L. Fanconi Anemia in a neonate with pancytopenia. **The Journal of Pediatrics**, v.145, n.1, p.125-127, 2004.

LANGEVIN, F.; CROSSAN, G. P.; ROSADO, I. V.; ARENDS, M. J.; PATEL, K. J. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. **Nature**, v.475, n.7354, p.53-58, 2011.

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) study. **Human Mutation**, v.25, n.2, p.142-149, 2005.

LEVRAN, O.; ERLICH, T.; MAGDALENA, N.; GREGORY, J. J.; BATISH, S. D.; VERLANDER, P. C.; AUERBACH, A. D. Sequence variation in the Fanconi Anemia gene FAA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, n.24, p.13051-13056, 1997.

LONG, D. T.; RÄSCHLE, M.; JOUKOV, V.; WALTER, J. C. Mechanism of RAD51-dependent DNA interstrand cross-link repair. **Science**, v.333, n.6038, p.84-87, 2011.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.5, p.669-673, 2005.

MILLER, S.; DYKES, D.; POLESKY, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.3, p.55404, 1988.

MOLDOVAN, G. L.; D'ANDREA, A. D. How the Fanconi Anemia pathway guards the genome. **Annual Reviews of Genetics**, v.43, n.101, p.223-249, 2009.

MÜLLER, L. U.; MILSOM, M. D.; HARRIS, C. E.; VYAS, R.; BRUMME, K. M.; PARMAR, K.; MOREAU, L. A.; SCHAMBACH, A.; PARK, I. H.; LONDON, W. B.; STRAIT, K.; SCHLAEGER, T.; DEVINE, A. L.; GRASSMAN, E.; D'ANDREA, A.; DALEY, G. Q.; WILLIAMS, D. A. Overcoming reprogramming resistance of Fanconi Anemia cells. **Blood**, v.119, n.23, p.5449-5457, 2012.

NEVELING, K.; ENDT, D.; HOEHN, H.; SCHINDLER, D. Genotype-phenotype correlations in Fanconi Anemia. **Mutation Research**, v.668, n.1-2, p.73-91, 2009.

NIJMAN, S.; HUANG, T.; DIRAC, A. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi Anemia pathway. **Molecular Cell**, v.17, n.3, p.331-339, 2005.

OOSTRA, A. B.; NIEUWINT, A. W. M.; JOENJE, H.; WINTER, J. P. DE. Diagnosis of Fanconi Anemia: chromosomal breakage analysis. **Anemia**, v.2012, p.238731, 2012.

PASQUINI, R.; ZANIS-NETO, J. Carcinoma de células escamosas em língua pós-transplante de medula óssea por Anemia de Fanconi. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, n.4, p.239-246, 2003.

PILONETTO, D. V.; PEREIRA, N. F.; BITENCOURT, M. A.; MAGDALENA, N. I.; VIEIRA, E. R.; VEIGA, L. B.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, R. C.; PASQUINI, R. FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi Anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, n.3, p.237-243, 2009.

PINTO, F. O.; LEBLANC, T.; CHAMOUSSET, D.; LE ROUX, G.; BRETHON, B.; CASSINAT, B.; LARGHERO, J.; DE VILLARTAY, J. P.; STOPPA-LYONNET, D.; BARUCHEL, A.; SOCIÉ, G.; GLUCKMAN, E.; SOULIER, J. Diagnosis of Fanconi Anemia in patients with bone marrow failure. **Haematologica**, v.94, n.4, p.487-495, 2009.

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, n.7, p.468-479, 1998.

ROSENBERG, P. S.; ALTER, B. P.; EBELL, W. Cancer risks in Fanconi Anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. **Haematologica**, v.93, n.4, p.511-517, 2008.

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.

ROSENBERG, P. S.; HUANG, Y.; ALTER, B. P. Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi Anemia. **Blood**, v.104, n.2, p.350-355, 2004.

ROSENBERG, P. S.; SOCIÉ, G.; ALTER, B. P.; GLUCKMAN, E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi Anemia who did and did not receive transplants. **Blood**, v.105, n.1, p.67-73, 2005.

ROSENBERG, P. S.; TAMARY, H.; ALTER, B. P. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. **American Journal of Medical Genetics**, v.155A, n.8, p.1877-1883, 2011.

SALUM, F. G.; MARTINS, G. B.; DE FIGUEIREDO, M. A.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S.; TORRES-PEREIRA, C. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi Anemia. **Brazilian Dental Journal**, v.17, n.2, p.161-165, 2006.

SASAKI, M. S.; TONOMURA, A. A High Susceptibility of Fanconi ' s Anemia to Chromosome Breakage by DNA Cross-linking Agents. **Cancer Research**, v.33, n.8, p.1829-1836, 1973.

SATO, K.; TODA, K.; ISHIAI, M.; TAKATA, M.; KURUMIZAKA, H. DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.10, p.4553-4561, 2012.

SAVOIA, A. ; CENTRA, M.; IANZANO, L.; PIO DE CILLIS, G.; BUCHWALD, M.; ZELANTE, L. Molecular characterization of Fanconi anaemia group C (FAC) gene polymorphisms. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, n.3, p.213-218, 1996.



SCHOUTEN, J. P.; McELGUNN, C. J.; WAAIJER, R.; ZWIJNENBURG, D.; DIEPVENS, F.; PALS, G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.12, p.e57, 2002.

SCHROEDER, T. M.; ANSCHÜTZ, F.; KNOPP, A. [Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy]. **Humangenetik**, v.1, n.2, p.194-196, 1964.

SEYSCHAB, H.; FRIEDL, R.; SUN, Y.; SCHINDLER, D.; HOEHN, H.; HENTZE, S.; SCHROEDER-KURTH, T. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi Anemia. **Blood**, v.85, n.8, p.2233-2237, 1995.

SHIMAMURA, A.; ALTER, B. P. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. **Blood Reviews**, v.24, n.3, p.101-122, 2010.

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.

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.

STOEPKER, C.; HAIN, K.; SCHUSTER, B.; HILHORST-HOFSTEE, Y.; ROOIMANS, M. A.; STELTENPOOL, J.; OOSTRA, A. B.; EIRICH, K.; KORTHOFF, E. T.; NIEUWINT, A. W.; JASPERS, N. G.; BETTECKEN, T.; JOENJE, H.; SCHINDLER, D.; ROUSE, J.; DE WINTER, J. P. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi Anemia subtype. **Nature Genetics**, v.43, n.2, p.138-141, 2011.

STRATHDEE, C. A.; DUNCAN, A. M.; BUCHWALD, M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. **Nature Genetics**, v.1, n.3, p.196-198, 1992.

SWIFT, M. Malignant disease in heterozygous carriers. **Birth Defects Original Article Series**, v.12, n.1, p.133-144, 1976.

TAVTIGIAN, S. V.; GREENBLATT, M. S.; LESUEUR, F.; BYRNES, G. B. In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. **Human Mutation**, v.29, n.11, p.1327-1336, 2008.

TEN FOE, J. R. LO.; KWEE, M. L.; ROOIMANS, M. A.; OOSTRA, A. B.; VEERMAN, A. J.; VAN WEEL, M.; PAULI, R. M.; SHAHIDI, N. T.; DOKAL, I.; ROBERTS, I.; ALTAY, C.; GLUCKMAN, E.; GIBSON, R. A.; MATHEW, C. G.; ARWERT, F.; JOENJE, H. Somatic mosaicism in Fanconi Anemia: molecular basis and clinical significance. **European Journal of Human Genetics**, v.5, n.3, p.137-148, 1997.

TEN FOE, J. R. LO.; ROOIMANS, M. A.; BOSNOYAN-COLLINS, L.; ALON, N.; WIJCKER, 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 Anaemia gene, FAA. **Nature Genetics**, v.14, n.3, p.320-323, 1996.

TISCHKOWITZ, M.; EASTON, D. F.; BALL, J.; HODGSON, S. V; MATHEW, C. G. Cancer incidence in relatives of British Fanconi Anaemia patients. **BMC Cancer**, v.8, p.257, 2008.

TULPULE, A.; LENSCH, M. W.; MILLER, J. D.; AUSTIN, K.; D'ANDREA, A.; SCHLAEGER, T. M.; SHIMAMURA, A.; DALEY, G. Q. Knockdown of Fanconi Anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. **Blood**, v.115, n.17, p.3453-3462, 2010.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v.35, n. Web Server issue, p.W71-74, 2007.

VAN DER LELIJ, P.; OOSTRA, A. B.; ROOIMANS, M. A; JOENJE, H.; WINTER, J. P. DE. Diagnostic Overlap between Fanconi Anemia and the Cohesinopathies: Roberts Syndrome and Warsaw Breakage Syndrome. **Anemia**, v.2010, p.565268, 2010.

VAN ZEEBURG, H. J.; SNIJDERS, P. J.; WU, T.; GLUCKMAN, E.; SOULIER, J.; SURRALLES, J.; CASTELLA, M.; VAN DER WAL, J. E.; WENNERBERG, J.; CALIFANO, J.; VELLEUER, E.; DIETRICH, R.; EBELL, W.; BLOEMENA, E.; JOENJE, H.; LEEMANS, C. R.; BRAKENHOFF, R. H. Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi Anemia patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v.100, n.22, p.1649-1653, 2008.

VAZ, F.; HANENBERG, H.; SCHUSTER, B.; BARKER, K.; WIEK, C.; ERVEN, V.; NEVELING, K.; ENDT, D.; KESTERTON, I.; AUTORE, F.; FRATERNALI, F.; FREUND, M.; HARTMANN, L.; GRIMWADE, D.; ROBERTS, R. G.; SCHAAL, H.; MOHAMMED, S.; RAHMAN, N.; SCHINDLER, D.; MATHEW, C. G. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi Anemia-like disorder. **Nature Genetics**, v.42, n.5, p.406-409, 2010.

WAISFISZ, Q.; MORGAN, N. V.; SAVINO, M.; DE WINTER, J. P.; VAN BERKEL, C. G.; HOATLIN, M. E.; IANZANO, L.; GIBSON, R. A.; ARWERT, F.; SAVOIA, A.; MATHEW, C. G.; PRONK, J. C.; JOENJE, H. Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi Anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. **Nature Genetics**, v.22, n.4, p.379-383, 1999.

WALDEN, H.; DEANS, A. J. The Fanconi Anemia DNA Repair Pathway: Structural and Functional Insights into a Complex Disorder. **Annual Review of Biophysics**, v.43, p.257-278, 2014.

WHITNEY, M. A.; SAITO, H.; JAKOBS, P. M.; GIBSON, R. A.; MOSES, R. E.; GROMPE, M. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. **Nature Genetics**, v.4, n.2, p.202-205, 1993.

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. **Nature Genetics**, v.39, n.2, p.159-161, 2007.

YAGASAKI, H.; HAMANOUE, S.; ODA, T.; NAKAHATA, T.; ASANO, S.; YAMASHITA, T. Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi Anemia gene FANCA in the Japanese population. **Human Mutation**, v.24, n.6, p.481-490, 2004.

YATES, J.; KEEBLE, W.; PALS, G.; AMEZIANE, N.; VAN SPAENDONK, R.; OLSON, S.; AKKARI, Y.; PASQUINI, R.; BAGBY, G. Novel inactivating mutations of FANCC in Brazilian patients with Fanconi Anemia. **Human Mutation**, v.27, n.2, p.214, 2006.

YAU, S. C.; ROBERTS, R. G.; BOBROW, M.; MATHEW, C. G. Direct diagnosis of carriers of point mutations in Duchenne muscular dystrophy. **Lancet**, v.341, n.8840, p.273-275, 1993.

ZHANG, Q. S.; EATON, L.; SNYDER, E. R.; HOUGHTALING, S.; MITCHELL, J. B.; FINEGOLD, M.; VAN WAES, C.; GROMPE, M. Tempol protects against oxidative damage and delays epithelial tumor onset in Fanconi Anemia mice. **Cancer Research**, v.68, n.5, p.1601-1608, 2008.

## APÊNDICES

**APÊNDICE 1**  
**DADOS FENOTÍPICOS, DEMOGRÁFICOS E AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**  
**RELATIVAS AOS 126 PACIENTES SUBTIPIFICADOS**

continua

ID	Mutações	Gênero	Grupo étnico	Origem geográfica	Consanguinidade	Idade ao diagnóstico laboratorial	Extensão das malformações	Situação hematológica ao diagnóstico	Idade no TCTH	Idade do óbito
1	c.3788_3790del TCT e ex18_23del	M	Negro	NE	ND	8	ND	III	Não	8
2	c.3788_3790del TCT, hom	M	Branco	SE	Não	4	E	II	11	VIVO
4	c.3788_3790del TCT, hom	M	Branco	S	Não	5	L	III	Não	6
6	c.3788_3790del TCT, hom	F	Branco	CO	Sim	25	L	II	Não	VIVO
7	c.2535_2536delCT, hom	M	Negro	NO	Sim	9	L	III	Não	10
9	c.1115_1118delTTGG e c.3239G>A	F	Branco	S	Não	15	AU	I	Não	VIVO
11	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	SE	Não	9	E	II	11	VIVO
12	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	S	Não	13	L	III	Não	18
15	c.1115_1118delTTGG, hom	F	Mulato	NE	Sim	3	E	II	6	6
16	c.3788_3790delTCT e c.4124_4125delCA	F	Branco	S	Não	7	L	II	9	VIVO
17	c.3788_3790delTCT e c.2778+1G>T	F	Branco	S	Não	8	L	II	10	VIVO
18	c.3788_3790delTCT e c.4006T>G	F	Mulato	NE	Não	6	L	II	8	VIVO
23	c.1077-2A>G, hom	F	Branco	SE	Não	5	E	II	8	VIVO
24	c.2853-19 del 19 e c.2808G>C	F	Branco	S	Não	7	E	II	9	VIVO
28	c.3788_3790delTCT e c.4199G>C	F	Branco	SE	Não	5	L	II	7	VIVO
33	c.3788_3790delTCT e c.4082A>C	M	Mulato	S	Não	11	L	III	Não	ND
37	c.1077-2A>G, hom	F	Branco	SE	Sim	16	E	II	Não	VIVO
38	c.1077-2A>G, hom	F	Branco	NE	Não	7	E	III	7	VIVO
39	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	S	Não	10	E	III	13	VIVO
41	c.1077-2A>G, hom	M	Branco	NE	Sim	5	L	II	6	VIVO
42	c.3788_3790del TCT e c.862G>T	M	Branco	S	Não	7	E	II	8	21
43	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	SE	Não	4	E	III	6	VIVO
44	c.3788_3790delTCT e c.4010+2T>C	F	Branco	S	Não	8	AU	II	Não	VIVO
48	c.3788_3790delTCT e c.3163C>G	F	Mulato	S	Não	6	L	I	Não	VIVO
49	c.1115_1118delTTGG e c.2535_2536delCT	F	Branco	S	Não	12	AU	II	Não	VIVO
50	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	S	Não	8	E	III	12	12
51	c.987_990delTCAC e c.784delA	F	Branco	S	Não	5	L	II	Não	VIVO
52	c.65G>A, hom	F	Mulato	SE	Sim	20	L	II	Não	VIVO
53	c.987_990delTCAC e c.2636C>T	F	Branco	S	Não	4	L	III	8	8
55	c.1077-2A>G, hom	F	Mulato	CO	Não	8	L	II	9	VIVO
57	c.3788_3790delTCT e c.2535_2536delCT	F	Mulato	CO	Não	7	L	II	Não	ND
58	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	NE	Sim	9	L	II	10	VIVO
60	c.2535_2536delCT, hom	M	Branco	SE	Sim	7	L	II	9	VIVO
62	c.3788_3790delTCT e ex29_30del	M	Branco	SE	Não	0,75	L	II	Não	ND
63	c.456+4 A>T, hom	M	Mulato	NE	Sim	13	L	II	15	16
66	c.1077-2A>G, hom	M	Mulato	NE	Não	8	E	III	Não	13
71	c.3788_3790delTCT e ex18_28del	F	Branco	S	Não	0,8	L	III	7	8
72	c.987_990delTCAC, hom	F	Branco	S	Sim	23	L	III	31	31
73	c.1077-2A>G, hom	F	Negro	CO	Não	20	E	II	24	VIVO
74	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	S	Não	13	L	II	Não	18
75	c.1077-2A>G e c.256C>T	F	Branco	CO	Não	4	L	II	6	VIVO
79	c.1077-2A>G, hom	F	ND	SE	ND	ND	ND	ND	ND	ND

continua

ID	Mutações	Gênero	Grupo étnico	Origem geográfica	Consanguinidade	Idade ao diagnóstico laboratorial	Extensão das malformações	Situação hematológica ao diagnóstico	Idade no TCTH	Idade do óbito
81	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	S	Sim	11	E	II	Não	VIVO
89	c.3788_3790delTCT e c.190-2A>T	M	Branco	SE	Sim	8	E	III	15	15
90	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	S	Não	9	L	II	Não	13
91	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	SE	Não	8	E	II	9	10
97	c.3788_3790delTCT e c.718C>T	M	Branco	SE	Não	2	E	II	8	VIVO
98	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	SE	Não	10	E	III	Não	13
99	c.1077-2A>G e c.1216dupC	M	Indígena	NO	Não	7	E	III	9	VIVO
101	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	S	Sim	4	L	II	9	VIVO
105	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	SE	Não	8	E	II	9	VIVO
108	c.3788_3790del TCT e c.2853-19 del 19	M	Mulato	NO	Não	8	L	III	8	VIVO
109	c.3788_3790del TCT, hom	F	Mulato	SE	Não	1	AU	I	Não	VIVO
110	c.1077-2A>G, hom	M	Branco	S	Sim	11	L	III	12	VIVO
111	c.3788_3790delTCT e c.2851C>T	F	Branco	SE	Não	7	E	II	8	VIVO
116	c.3788_3790delTCT e c.3638_3639delCT	M	Branco	S	Não	4	E	II	6	6
117	c.2853-19 del 19, hom	M	Branco	S	Sim	3	L	III	11	VIVO
120	c.65G>A, hom	F	Mulato	SE	Sim	5	L	III	6	VIVO
121	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	NE	Sim	18	L	II	Não	ND
124	c.1077-2A>G, hom	M	Branco	NE	Não	4	E	III	5	5
125	c.1077-2A>G e c.1433+1G>A	M	Branco	SE	Não	2	E	III	8	VIVO
128	c.1077-2A>G, hom	M	Mulato	SE	Sim	3	E	II	7	VIVO
129	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	S	Não	19	L	III	29	31
130	c.3788_3790delTCT e c.396dupT	F	Branco	SE	Não	1	E	II	6	VIVO
132	c.3788_3790delTCT, hom	F	Mulato	S	Não	4	E	II	Não	21
133	c.3788_3790delTCT e ex1_36del	M	Branco	SE	Não	2	L	II	6	VIVO
134	c.1077-2A>G, hom	F	Mulato	NO	Não	3	E	III	5	5
136	c.3788_3790del TCT e ex18_23del	F	Branco	SE	Não	10	L	II	Não	ND
140	c.2535_2536delCT e c.2604_2609delTCAGTT	F	Branco	SE	Sim	5	L	II	8	VIVO
141	c.3788_3790delTCT e c.718C>T	F	Branco	NE	Não	3	L	I	Não	VIVO
142	c.3788_3790delTCT e c.97delG	F	Branco	S	Não	6	L	II	Não	VIVO
143	c.3788_3790delTCT e ex15_28del	F	Branco	S	Não	11	L	II	Não	VIVO
146	c.3788_3790delTCT e c.3163C>G	M	Branco	S	Não	9	L	II	Não	VIVO
148	c.1077-2A>G e c.84+3A>C	M	Negro	NE	Não	11	L	III	12	12
151	c.1077-2A>G, hom	F	Branco	SE	Não	4	E	III	Não	6
152	c.3788_3790delTCT e c.3560dupG	M	Branco	SE	Não	2	E	II	Não	VIVO
155	c.987_990delTCAC, hom	M	Branco	S	Sim	7	L	III	8	VIVO
156	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	NE	Não	8	AU	III	11	12
157	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	S	Sim	8	E	II	9	10
158	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	S	Não	5	E	III	Não	ND
159	c.456+4 A>T e c.388delGinsAAAA	M	Branco	SE	Não	6	L	II	Não	VIVO
160	c.3788_3790delTCT e c.4198C>T	F	Branco	CO	Não	8	L	II	8	VIVO
161	c.1393C>T e c.996G>C	M	Negro	SE	Não	12	L	III	18	18
162	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	SE	Não	8	L	III	12	VIVO
164	c.1077-2A>G, hom	M	Mulato	NE	Não	7	E	III	7	VIVO

conclusão

ID	Mutações	Gênero	Grupo étnico	Origem geográfica	Consanguinidade	Idade ao diagnóstico laboratorial	Extensão das malformações	Situação hematológica ao diagnóstico	Idade no TCTH	Idade do óbito
166	c.3788_3790delTCTe ex18_23del	M	Mulato	NE	Não	6	L	II	7	VIVO
167	c.2853-19 del 19, hom	M	Mulato	NE	Sim	12	L	III	19	19
168	c.3788_3790delTCT e ex22_28del	F	Mulato	NE	Não	11	L	II	13	VIVO
171	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	S	ND	9	E	II	12	VIVO
172	c.3788_3790delTCT, hom	F	Mulato	S	Sim	6	L	II	9	VIVO
175	c.65G>A, hom	F	Mulato	NE	Não	8	L	III	8	VIVO
177	c.3788_3790delTCT e c.718C>T	M	Branco	CO	Não	5	L	II	7	VIVO
179	c.1077-2A>G, hom	M	Branco	SE	Não	1	E	II	3	VIVO
183	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	S	Não	9	E	II	10	VIVO
188	c.65G>A, hom	F	Mulato	SE	Não	13	L	II	14	VIVO
196	c.3788_3790delTCT e c.4082A>C	M	Branco	S	Não	6	L	II	11	VIVO
197	c.1077-2A>G e c.1158delC	M	Mulato	CO	Não	13	L	II	Não	VIVO
200	c.1393C>T e 450_451insA	F	Branco	S	Não	1	L	III	5	5
201	c.2535_2536delCT, hom	F	Branco	SE	Não	11	L	III	13	VIVO
203	c.2853-19 del 19, hom	M	Branco	CO	Não	6	L	II	8	VIVO
204	c.3788_3790delTCT e ex4_5del	F	Indígena	CO	Não	0,5	L	I	7	VIVO
207	c.1077-2A>G, hom	M	Branco	SE	Sim	11	E	II	12	VIVO
208	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	CO	Não	4	L	III	Não	8
209	c.987_990delTCAC e c.3696delT	F	Branco	S	Não	4	L	II	8	VIVO
215	c.3788_3790delTCT, hom	F	Mulato	SE	Não	10	L	I	Não	29
220	c.2853-19 del 19 e c.987_990delTCAC	F	Branco	S	Não	5	E	III	5	VIVO
221	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	SE	Não	7	L	II	9	VIVO
222	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	NE	Sim	13	L	III	Não	ND
224	c.3788_3790delTCT, hom	F	Branco	S	Não	10	L	II	Não	VIVO
226	c.1077-2A>G, hom	M	Mulato	CO	Sim	5	L	III	5	VIVO
228	c.1077-2A>G, hom	M	Branco	NE	Sim	5	L	III	8	10
229	c.3788_3790delTCT e ex6_8del	M	Mulato	CO	Não	8	L	III	Não	9
231	c.1077-2A>G e c.60T>A	M	Branco	SE	Não	12	L	III	13	VIVO
234	c.456+4 A>T e c.338G>A	M	Mulato	NE	Não	0,08	E	III	Não	ND
235	c.3788_3790delTCT, hom	M	Branco	S	Sim	10	E	II	10	VIVO
237	c.987_990delTCAC e c.3166_3185dup	M	Branco	SE	Não	4	L	III	14	14
239	c.1077-2A>G, hom	M	Negro	SE	Sim	3	L	III	5	6
240	c.1393C>T, hom	M	Branco	S	Não	6	L	III	9	VIVO
241	c.3788_3790delTCT e c.3696delT	M	Branco	SE	Não	7	E	III	10	VIVO
246	c.456+4 A>T, hom	M	Branco	CO	Sim	6	E	III	Não	8
247	c.1077-2A>G, hom	F	Branco	CO	Não	6	L	III	6	7
248	c.2535_2536delCT e c.1508dupA	F	Branco	NE	Não	3	E	I	6	VIVO
250	c.1077-2A>G e c.307+1G>C	M	Asiático	SE	Não	8	E	II	9	VIVO
252	c.1077-2A>G, hom	M	Branco	NE	Não	10	L	III	10	VIVO
253	c.3788_3790delTCT, hom	M	Mulato	SE	Não	8	L	III	10	12
255	c.2535_2536delCT e c.190-2A>T	M	Mulato	NE	Não	7	L	III	Não	VIVO

NOTA: Gênero: M= masculino, F= Feminino; Origem geográfica: S= Sul, SE= Sudeste, CO= Centro-Oeste, NE= Nordeste, NO=Norte; Extensão das malformações: Au= ausente, L= limitada, E= extensa; Situação hematológica ao diagnóstico: Grau I= sem falência medular; Grau II= falência medular inicial, Grau III= falência medular avançada; TCTH= Transplante de Células Tronco Hematopoéticas.



**APÊNDICE 2**  
**DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NOS 87 PACIENTES**  
**COM ALTERAÇÕES NO GENE *FANCA***

ID PACIENTE	SUBTIPO GENÉTICO	ALELO1			ALELO2		
		Exon	Mutação 1	Efeito	Exon	Mutação 2	Efeito
51	FA-A	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330AlafsX4	ex8	c.784del	p.Met262Cysfs*13
53	FA-A	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330AlafsX4	ex28	c.2636C>T	p.Arg879*
209	FA-A	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330AlafsX4	ex37	c.3696delT	p.Phe1232Leufs*15
237	FA-A	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330AlafsX4	ex32	c.3166_3185dup	p.Trp1063Serfs*4
72	FA-A	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330AlafsX4	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330Alafs*4
155	FA-A	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330AlafsX4	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330Alafs*4
09	FA-A	ex13	c.1115_1118delTTGG	p.Val372fs	ex32	c.3239G>A	p.Arg1080Gln
49 <sup>(1)</sup>	FA-A	ex13	c.1115_1118delTTGG	p.Val372fs	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846Glnfs*19
15	FA-A	ex13	c.1115_1118delTTGG	p.Val372fs	ex13	c.1115_1118delTTGG	p.Val372Alafs*42
140	FA-A	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846GlnfsX19	ex28	c.2604_2609delTCAGTT	p.Gln869_Phe870del
248	FA-A	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846GlnfsX19	ex16	c.1508dupA	p.Tyr503*
255	FA-A	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846GlnfsX19	2i	c.190-2A>T	splice
07	FA-A	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846GlnfsX19	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846Glnfs*19
60	FA-A	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846GlnfsX19	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846Glnfs*19
201	FA-A	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846GlnfsX19	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846Glnfs*19
24	FA-A	29i	c.2853-19_2853-1 del19	del	ex29	c.2808G>C	p.Glu936Asp
220 <sup>(1)</sup>	FA-A	29i	c.2853-19_2853-1 del19	del	ex11	c.987_990delTCAC	p.His330Alafs*4
117	FA-A	29i	c.2853-19_2853-1 del19	del	29i	c.2853-19_2853-1 del19	splice
167	FA-A	29i	c.2853-19_2853-1 del19	del	29i	c.2853-19_2853-1 del19	splice
203	FA-A	29i	c.2853-19_2853-1 del19	del	29i	c.2853-19_2853-1 del19	splice
01	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex18_23del	del
16	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex41	c.4124_4125delCA	p.Thr1375Serfs*49
17	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex28	c.2778+1G>T	splice
18	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex40	c.4006T>G	p.Tyr1336Asp
28	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex42	c.4199G>C	p.Arg1400Pro
33	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex41	c.4082A>C	p.Tyr1361Ser
42	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex10	c.862G>T	p.Glu288*
44	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex40	c.4010+2T>C	splice
48	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex32	c.3163C>G	p.Arg1055Gly
57 <sup>(1)</sup>	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex27	c.2535_2536delCT	p.Cys846Glnfs*19
62	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex29_30del	del
71	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex18_28del	del
89	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	2i	c.190-2A>T	Splice
97	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex8	c.718C>T	p.Gln240*
108 <sup>(1)</sup>	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	29i	c.2853-19_2853-1 del19	splice
111	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex29	c.2851C>T	p.Arg951Trp
116	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex37	c.3638_3639delCT	p.Pro1213Argfs*64
130	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex4	c.396dupT	p.His133Serfs*48
133	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex1_36del	del
136	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex18_23del	del
141	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex8	c.718C>T	p.Gln240*
142	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex2	c.97delG	p.Glu33Lysfs*11
143	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex15_28del	del
146	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex32	c.3163C>G	p.Arg1055Gly
152	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex36	c.3560dupG	p.His1188Thrfs*27

GENE FANCA

conclusão

ID PACIENTE	SUBTIPO GENÉTICO	ALELO1			ALELO2		
		Exon	Mutação 1	Efeito	Exon	Mutação 2	Efeito
160	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex42	c.4198C>T	p.Arg1400Cys
166	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex18_23del	del
168	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex22_28del	del
177	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex8	c.718C>T	p.Gln240*
196	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex41	c.4082A>C	p.Tyr1361Ser
204	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex 4_5del	del
229	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	del	ex6_8del	del
241	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex37	c.3696delT	p.Phe1232Leufs*15
185 <sup>(3)</sup>	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	NI	NI	NI
233 <sup>(3)</sup>	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	NI	NI	NI
02	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
04	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
06	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
12	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
11	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
39	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
43	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
50	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
58	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
74	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
81	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
90	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
91	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
98	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
101	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
105	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
109	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
121	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
129	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
132	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
156	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
157	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
158	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
162	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
171	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
172	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
183	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
208	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
215	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
221	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
222	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
224	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
235	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del
253	FA-A	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del	ex38	c.3788_3790del TCT	p.Phe1263del

(1) Ambas as mutações foram identificadas pelo teste de triagem de mutações; (2) Pacientes excluídos porque não foi possível identificar a segunda mutação envolvida

**APÊNDICE 3**  
**DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NOS 11 PACIENTES**  
**COM ALTERAÇÕES NO GENE *FANCC***

GENE *FANCC*

ID PACIENTE	SUBTIPO GENÉTICO	ALELO1			ALELO2		
		Exon	Mutação 1	Efeito	Exon	Mutação 2	Efeito
175	FA-C	ex1	c.65G>A	p.Trp22X	ex1	c.65G>A	p.Trp22*
188	FA-C	ex1	c.65G>A	p.Trp22X	ex1	c.65G>A	p.Trp22*
52	FA-C	ex1	c.65G>A	p.Trp22X	ex1	c.65G>A	p.Trp22*
120	FA-C	ex1	c.65G>A	p.Trp22X	ex1	c.65G>A	p.Trp22*
234	FA-C	4i	c.456+4 A>T	p.Gly116_Asn152del	ex3	c.338G>A	p.Trp113*
159	FA-C	4i	c.456+4 A>T	p.Gly116_Asn152del	ex4	c.388delGinsAAA	p.Glu130LysinsLys
63	FA-C	4i	c.456+4 A>T	p.Gly116_Asn152del	4i	c.456+4 A>T	p.Gly116_Asn152del
246	FA-C	4i	c.456+4 A>T	p.Gly116_Asn152del	4i	c.456+4 A>T	p.Gly116_Asn152del
200	FA-C	ex13	c.1393C>T	p.Gln465X	ex4	c.450_451insA	<i>Frameshift</i>
161	FA-C	ex13	c.1393C>T	p.Gln465X	ex9	c.996G>C	<i>Splice</i>
240	FA-C	ex13	c.1393C>T	p.Gln465X	ex13	c.1393C>T	p.Gln465*

**APÊNDICE 4**  
**DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NOS 28 PACIENTES**  
**COM ALTERAÇÕES NO GENE *FANCG***

## GENE FANCG

ID PACIENTE	SUBTIPO GENÉTICO	ALELO1			ALELO2		
		Exon	Mutação 1	Efeito	Exon	Mutação 2	Efeito
231	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	ex1	c.60T>A	p.Asn20Lys
148	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	2i	c.84+3A>C	Splice
75	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	ex3	c.256C>T	p.Gln86*
250	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	3i	c.307+1G>C	Splice
197	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	ex10	c.1158delC	p.Ser387Profs*16
99	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	ex10	c.1216dupC	p.Gln406Profs*13
125	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	ex10	c.1433+1G>A	Splice
23	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
37	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
38	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
41	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
55	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
66	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
73	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
79	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
110	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
124	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
128	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
134	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
151	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
164	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
179	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
207	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
228	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
226	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
239	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
247	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice
252	FA-G	8i	c.1077-2A>G	splice	8i	c.1077-2A>G	splice

**APÊNDICE 5**  
**DISTRIBUIÇÕES DE FREQUÊNCIAS DOS DADOS FENOTÍPICOS E DAS**  
**MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS 126 PACIENTES DE ACORDO COM AS**  
**MUTAÇÕES IDENTIFICADAS**



SUBTIPO GENÉTICO	MUTAÇÃO		GÊNERO		
			Feminino	Masculino	Total
FA-A	c.1115_1118delTTGG	n	3	0	3
		%	100,0	0,0	100,0
	c.2535_2536delCT	n	3	3	6
		%	50,0	50,0	100,0
	c.2853-19 del19	n	2	3	5
		%	40,0	60,0	100,0
	c.3788_3790delTCT	n	31	36	67
		%	46,3	53,7	100,0
FA-C	c.987_990delTCAC	n	4	2	6
		%	66,7	33,3	100,0
	c.1393C>T	n	1	2	3
		%	33,3	66,7	100,0
	c.456+4 A>T	n	0	4	4
FA-G		%	0,0	100,0	100,0
	c.65G>A	n	4	0	4
		%	100,0	0,0	100,0
	c.1077 - 2A>G	n	10	18	28
	%	35,7	64,3	100,0	

SUBTIPO GENÉTICO	MUTAÇÃO		CONSANGUINIDADE		
			Não	Sim	Total
FA-A	c.1115_1118delTTGG	n	2	1	3
		%	66,7	33,3	100,0
	c.2535_2536delCT	n	3	3	6
		%	50,0	50,0	100,0
	c.2853-19 del19	n	3	2	5
		%	60,0	40,0	100,0
	c.3788_3790del TCT	n	55	10	65
		%	84,6	15,4	100,0
FA-C	c.987_990delTCAC	n	4	2	6
		%	66,7	33,3	100,0
	c.1393C>T	n	3	0	3
		%	100,0	0,0	100,0
	c.456+4 A>T	n	2	2	4
FA-G		%	50,0	50,0	100,0
	c.65G>A	n	2	2	4
		%	50,0	50,0	100,0
	c.1077 - 2A>G	n	19	8	27
	%	70,4	29,6	100,0	

SUBTIPO GENÉTICO	MUTAÇÃO		GRUPO ÉTNICO					
			Asiático	Branco	Indígena	Mulato	Negro	Total
FA-A	c.1115_1118delTTGG	n	0	2	0	1	0	3
		%	0,0	66,7	0,0	33,3	0,0	100,0
	c.2535_2536delCT	n	0	4	0	1	1	6
		%	0,0	66,7	0,0	16,7	16,7	100,0
	c.2853-19 del19	n	0	4	0	1	0	5
		%	0,0	80,0	0,0	20,0	,0	100,0
	c.3788_3790del TCT	n	0	44	1	21	1	67
		%	0,0	65,7	1,5	31,3	1,5	100,0
FA-C	c.987_990delTCAC	n	0	6	0	0	0	6
		%	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	c.1393C>T	n	0	2	0	0	1	3
		%	0,0	66,7	0,0	0,0	33,3	100,0
	c.456+4 A>T	n	0	2	0	2	0	4
FA-G		%	0,0	50,0	0,0	50,0	0,0	100,0
	c.65G>A	n	0	0	0	4	0	4
		%	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0
	c.1077 - 2A>G	n	1	15	1	7	3	27
	%	0,7	55,6	3,7	25,9	11,1	100,0	

SUBTIPO GENÉTICO	MUTAÇÃO		EXTENSÃO DAS MALFORMAÇÕES		
			AU/L	E	Total
FA-A	c.1115_1118delTTGG	n	2	1	3
		%	66,7	33,3	100,0
	c.2535_2536delCT	n	5	1	6
		%	83,3	16,7	100,0
	c.2853-19 del19	n	3	2	5
		%	60,0	40,0	100,0
	c.3788_3790del TCT	n	43	23	66
%		65,2	34,8	100,0	
c.987_990delTCAC	n	6	0	6	
	%	100,0	0,0	100,0	
FA-C	c.1393C>T	n	3	0	3
		%	100,0	0,0	100,0
	c.456+4 A>T	n	2	2	4
		%	50,0	50,0	100,0
	c.65G>A	n	4	0	4
%		100,0	0,0	100,0	
FA-G	c.1077 - 2A>G	n	12	15	27
		%	44,5	55,5	100,0

SUBTIPO GENÉTICO	MUTAÇÃO		SITUAÇÃO HEMATOLÓGICA AO DIAGNÓSTICO		
			I/II	III	Total
FA-A	c.1115_1118delTTGG	n	3	0	3
		%	100,0	0,0	100,0
	c.2535_2536delCT	n	3	3	6
		%	50,0	50,0	100,0
	c.2853-19 del19	n	2	3	5
		%	40,0	60,0	100,0
	c.3788_3790del TCT	n	47	20	67
%		70,1	29,9	100,0	
c.987_990delTCAC	n	2	4	6	
	%	33,3	66,7	100,0	
FA-C	c.1393C>T	n	0	3	3
		%	0,0	100,0	100,0
	c.456+4 A>T	n	2	2	4
		%	50,0	50,0	100,0
	c.65G>A	n	2	2	4
%		50,0	50,0	100,0	
FA-G	c.1077 - 2A>G	n	11	16	27
		%	40,7	59,3	100,0

SUBTIPO GENÉTICO	MUTAÇÃO		TCTH		
			Não	Sim	Total
FA-A	c.1115_1118delTTGG	n	2	1	3
		%	66,7	33,3	100,0
	c.2535_2536delCT	n	2	4	6
		%	33,3	66,7	100,0
	c.2853-19 del19	n		5	5
		%	0,0	100,0	100,0
	c.3788_3790del TCT	n	28	39	67
%		41,8	58,2	100,0	
c.987_990delTCAC	n	1	5	6	
	%	16,7	83,3	100,0	
FA-C	c.1393C>T	n		3	3
		%	0,0	100,0	100,0
	c.456+4 A>T	n	3	1	4
		%	75,0	25,0	100,0
	c.65G>A	n	1	3	4
%		25,0	75,0	100,0	
FA-G	c.1077 - 2A>G	n	5	22	27
		%	18,5	81,5	100,0

**APÊNDICE 6**  
**ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS FENOTÍPICOS E DAS**  
**MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS 126 PACIENTES DE ACORDO COM AS**  
**MUTAÇÕES IDENTIFICADAS**

VARIÁVEL	MUTAÇÃO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
Idade ao diagnóstico (anos)	c.1115_1118delTTGG	3	10,0	12,0	3,0	15,0	6,2
	c.2535_2536delCT	6	7,2	7,5	3,0	11,0	2,8
	c.2853-19 del19	5	6,6	6,0	3,0	12,0	3,4
	c.3788_3790del TCT	67	7,6	8,0	0,5	25,0	4,2
	c.987_990delTCAC	6	7,8	4,5	4,0	23,0	7,5
	c.1393C>T	3	6,3	6,0	1,0	12,0	5,5
	c.456+4 A>T	4	6,3	6,0	0,08	13,0	5,3
	c.65G>A	4	11,5	10,5	5,0	20,0	6,6
Idade no TCTH	c.1077 - 2A>G	27	7,4	7,0	1,0	20,0	4,5
	c.1115_1118delTTGG	1	6,0	6,0	6,0	6,0	---
	c.2535_2536delCT	4	9,0	8,5	6,0	13,0	2,9
	c.2853-19 del19	5	10,4	9,0	5,0	19,0	5,3
	c.3788_3790del TCT	39	9,7	9,0	6,0	29,0	3,8
	c.987_990delTCAC	5	13,8	8,0	8,0	31,0	10,0
	c.1393C>T	3	10,7	9,0	5,0	18,0	6,7
	c.456+4 A>T	1	15,0	15,0	15,0	15,0	---
c.65G>A	3	9,3	8,0	6,0	14,0	4,2	
c.1077 - 2A>G	23	8,5	8,0	3,0	24,0	4,3	

**APÊNDICE 7**  
**ESTIMATIVA DE CUSTOS COM REAGENTES E INSUMOS PARA**  
**SUBTIPIFICAÇÃO GENÉTICA DE 100 PACIENTES**

## EXTRAÇÃO DO DNA

PRODUTO	QUANTIDADE	PREÇO UNITÁRIO (R\$)	PREÇO TOTAL (R\$)
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%	40g	1,50	60,00
Etanol 70%	500mL	0,50/ml	250,00
Etanol absoluto	500mL	1,0 /ml	500,00
Microtubos com capacidade p/ 1,5 mL	1 pacote	0,12	120,00
Ponteiras 10 a 40 µL, com filtro	2000 unidades	164,12	328,24
Ponteiras 40 a 200 µL, com filtro	2000 unidades	164,12	328,24
Ponteiras 200 a 1000 µL, com filtro	3000 unidades	170,00	510,00
Proteinase K (100Ug/mL)	25.000 µL	0,006	150,00
Tampão de lise de glóbulos vermelhos	500 mL	1,20ml	600,00
TOTAL			2.846,48

PESQUISA DE MUTAÇÕES COMUNS NOS GENES *FANCA*, *FANCC*, *FANCG* POR ENSAIOS DE PCR, PCR- ARMS E PCR-RFLP

PRODUTO	QUANTIDADE	PREÇO UNITÁRIO (R\$)	PREÇO TOTAL (R\$)
Microtubos com capacidade p/ 1,5 mL	1000 unidades	0,20	200,00
Ponteiras com filtro 0,5 a 10 µL	2000 unidades	164,12	328,24
Ponteiras com filtro 10 a 40 µL	1000 unidades	164,12	164,12
Ponteiras com filtro 40 a 200 µL	1000 unidades	164,12	164,12
Primer 200 nmoles	10 conjuntos	200,00	2000,00
dNTP (100 mM)	1/2 conjunto	600,00	300,00
Taq polimerase (5 unidades/ µL)	2 frascos	300,00	600,00
Tubo de reação para PCR c/ tampa	500 unidades	200,00	200,00
Enzima de restrição Mbo II	2 frascos	380,00	760,00
Enzima de restrição Sca I	1 frasco	380,00	380,00
Enzima de restrição Bsp1286 I	1 frasco	380,00	380,00
Enzima de restrição Dde I	1 frasco	420,00	420,00
Enzima de restrição Fok I	1 frasco	380,00	380,00
Enzima de restrição BssKI	1 frasco	380,00	380,00
Tampão TBE (10x) frasco c/ 4 L	01 unidade	410,00	410,00
Agarose	500g	700,00	700,00
Marcador de peso molecular	1 frasco	350,00	350,00
Filme	100 unidades	0,30	30,00
Brometo de etídio	1/2 frasco	129,05	64,75
TOTAL			8.211,23

TRIAGEM DE ALTERAÇÕES NA SEQUÊNCIA DO GENE *FANCA* POR MLPA

PRODUTO	QUANTIDADE	PREÇO UNITÁRIO (R\$)	PREÇO TOTAL (R\$)	
			100 testes	70 testes
Placas de reação - 10 unidades	3 caixas	350,00	1050,00	
Taq DNA Polimerase Platinum	2 frascos	300,00	600,00	
dNTPs (100 mM)	1/2 conjunto	600,00	300,00	
Polímero	1 frasco	1.700,00	1.700,00	
TAMRA size standard	1 frasco	1.300,00	1.300,00	
MLPA kit P031- Anemia de Fanconi	1 kit	5.294,10	<sup>(1)</sup> 5.294,1	
MLPA kit P032 - Anemia de Fanconi	1 kit	5.294,10	<sup>(1)</sup> 5.294,1	
Formamida	02 frascos	125,00	250,00	
Microtubos de 1,5 mL	1000 unidades	0,16	160,00	
Tubos de reação PCR com tampa Flat	500 unidades	212,40	212,40	
Ponteiras com filtro 0,5 a 10 µL	2000 unidades	164,12	328,24	
Ponteiras com filtro 10 a 40 µL	2000 unidades	164,12	328,24	
Ponteiras com filtro 40 a 200 µL	2000 unidades	164,12	328,24	
TOTAL			17.157,32	<sup>(1)</sup> 12.010,00

(1) Utilizando a estratégia de triagem de mutações frequentes não mais do que 70 pacientes entre os 100 considerados para o cálculo serão investigados por MLPA, visto que aproximadamente 30% dos pacientes são definidos na triagem de mutações.

ANÁLISE DOS GENES *FANCA*, *FANCC*, *FANCG* POR SEQUENCIAMENTO

PRODUTO	QUANTIDADE	PREÇO UNITÁRIO (R\$)	PREÇO TOTAL (R\$)	
			100 testes	67 testes
Placas de reação - 10 unidades	5 caixas	350,00	1.750,00	
Folhas seladoras p/ placas de reação, caixa c/ 100 unidades	1 caixa	756,00	756,00	
Arranjo de capilares	2unidades	2.250,00	4.500,00	
Conjunto de Primers <i>FANCA</i> com extensão M13	88 unidades	200,00	17.600,00	
Conjunto de Primers <i>FANCC</i> com extensão M13	30 unidades	200,00	6.000,00	
Conjunto de Primers <i>FANCG</i> com extensão M13	30 unidades	200,00	6.000,00	
Polímero	6 frascos	1.700,00	10.200,00	
Conjunto de reagentes para sequenciamento BigDye terminator	15kits	3.500,00	52.500,00	
Formamida	02 frascos	125,00	250,00	
Solução tampão com EDTA 10x	5 frascos	380,00	1900,00	
<i>Taq</i> DNA Polimerase Platinum	7 frascos	300,00	2.100,00	
dNTP (100 mM)	6conjuntos	600,00	3600,00	
Exo/sap	1200 reações	430,00	5160,00	
Microtubos de 1,5 mL	1000 unidades	0,16	160,00	
Tubos para reação PCR com tampa	500 unidades	212,40	212,40	
Ponteriras com filtro 0,5 a 10 µL	2000 unidades	164,12	328,24	
Ponteriras com filtro 10 a 40 µL	2000 unidades	164,12	328,24	
Ponteriras com filtro 40 a 200 µL	2000 unidades	164,12	328,24	
TOTAL			113.673,12	76.160,99

NOTA: De acordo com os resultados obtidos neste estudo 29,4% dos pacientes foram completamente identificados com o teste de triagem e 3,9% dos pacientes apresentam grandes deleções o que dispensa o sequenciamento em 33,3% dos casos. Sendo assim foram considerados 67 pacientes para o cálculo do sequenciamento, guardadas as proporções de frequências entre os genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*.

## CUSTO POR PACIENTE COM REAGENTES E INSUMOS PARA SUBTIPIFICAÇÃO GENÉTICA

MÉTODOS	CUSTO TOTAL POR PACIENTE (R\$)
Triagem por MLPA + sequenciamento	1336,76
Triagem inicial de mutações + MLPA complementado pelo sequenciamento dos casos não definidos na triagem	992,28

NOTA: A redução de custo com associação da triagem de mutações previamente ao MLPA e sequenciamento foi de 25,7%.

**ANEXOS**



**ANEXO 1**  
**TERMO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO CEP/HC/UFPR**

**HOSPITAL DE CLÍNICAS****UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

CEP/HC/UFPR

Curitiba, 11 de junho de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Daniela Vendresen Pilonetto**  
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITOS DOS SUBTIPOS GENÉTICOS NA EVOLUÇÃO DA ANEMIA DE FANCONI EM PACIENTES BRASILEIROS", foi analisado COM PENDÊNCIA pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de maio de 2010. Após, análise das pendências encaminhadas pelo pesquisador, este CEP/HC considera o projeto aprovado em 11 de junho de 2010. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

**CAAE: 0115.0.208.000-10**  
**Registro CEP: 2201.095/2010-05**

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 11 de dezembro de 2010.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Renato Tambara Filho'.

**Renato Tambara Filho**

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

**ANEXO 2**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS**



TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

O EFEITO DOS SUBTIPOS GENÉTICOS NA EVOLUÇÃO DA ANEMIA DE FANCONI  
EM PACIENTES BRASILEIROS

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Identificação: \_\_\_\_\_

**Investigador:** Daniela Vandresen Pilonetto

Laboratório de Imunogenética e Serviço de Transplante de Medula Óssea – HC / UFPR  
Rua Padre Camargo, 280 - 1º andar  
Fones: (41) 3360 7928/ (41) 9167 2001

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entenda. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

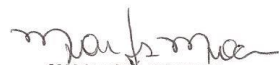
O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

**INTRODUÇÃO**

A anemia de Fanconi ocorre quando existe um defeito no material que é passado dos pais para os filhos, ou seja, nos genes herdados do pai e da mãe. Esta doença pode ser causada por alterações em diferentes genes sendo assim pode ser dividida em vários grupos ou subtipos genéticos. Algumas pesquisas realizadas em outros países demonstraram que a identificação destes subtipos genéticos classificados de acordo com o gene que se encontra alterado pode contribuir com o diagnóstico e ainda poderá ajudar a entender como será a evolução da doença.

**PROPÓSITO DO ESTUDO**

Identificar o subtipo genético dos pacientes, ou seja, qual o gene que está alterado. Para isso serão pesquisadas as mutações (alterações na sequência do DNA) nos genes mais frequentemente envolvidos (*FANCA*, *FANCC* e *FANCG*). De acordo com as alterações encontradas os médicos poderão entender se existe relação entre os tipos das mutações e a evolução da anemia de Fanconi; poderão explicar quais as chances de que seus irmãos e filhos também possam apresentar a doença e ainda identificar a frequência com que estas mutações ocorrem entre pacientes brasileiros.

  
**MÁRIA JOSÉ MOCELIN**  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do HC/UFPR  
Matricula 7462



### **SELEÇÃO**

Você será avaliado previamente pelo médico responsável quanto as suas condições de participar ou não do estudo como: acesso venoso e a possibilidade de incluir a amostra para estudo como parte de seus procedimentos clínicos sem que haja prejuízo para você. Todo o paciente que esteja em condições clínicas de doar uma amostra de sangue será convidado a participar do estudo.

### **PROCEDIMENTOS**

Se você concordar em participar do estudo, será solicitada pelo médico responsável (Dra Carmem Bonfim) a coleta de uma amostra de sangue. Isto será feito através da punção de sua veia (furar a sua pele com uma pequena agulha) para a retirada de uma pequena quantidade de sangue (aproximadamente 3 a 4 ml)

Primeiramente a pele do seu braço será descontaminada com uma solução anti-séptica (líquido utilizado para diminuir o risco de infecção). Então, a ponta de uma agulha será introduzida na pele até a veia. Um tubo será ligado ao final da agulha e o sangue será coletado. Você poderá sentir uma dor de intensidade variável (geralmente leve) quando a agulha for introduzida na pele. Esta amostra de sangue será encaminhada para o Laboratório de Imunogenética onde a investigação de alterações nos genes mais frequentemente encontrados entre pacientes com anemia de Fanconi será realizada. As amostras serão identificadas com um código para que sua identidade seja sempre preservada e não haja nenhuma informação pessoal sobre você. Qualquer resultado será informado através desta identificação dada à sua amostra para o seu médico.

### **BENEFÍCIOS ESPERADOS OU ANTECIPADOS**

1 - A identificação do subtipo genético que você pertence pode ajudar os médicos a entender se existe relação entre os tipos das mutações e a evolução desta doença e explicar qual a chance de que seus irmãos e filhos também possam apresentar a doença.

2 - Neste estudo serão realizados somente exames de laboratório, não envolvendo nenhum tipo de tratamento. Se a identificação do subtipo genético tiver sucesso, os resultados serão entregues para o seu médico no HC / UFPR (Dra Carmem Bonfim). Este médico será responsável por entregar os resultados para você.

### **BENEFÍCIOS ANTECIPADOS PARA A SOCIEDADE**

Espera-se que estes estudos possam identificar quais alterações são mais frequentemente observadas nestes genes entre pacientes com anemia de Fanconi brasileiros e correlacionar estes dados com as manifestações clínicas de pacientes de uma mesma origem étnica.

### **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

### **CUSTOS**

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

S



**PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO**

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago para participar do estudo.

**PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:**

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

**CONTATO PARA PERGUNTAS**

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe (Daniela V. Pilonetto, pelo telefone (41) 3360 7928 ou celular (41) 9167 2001). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:**

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL (Se menor ou incapacitado)	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR (Pessoa que aplicou o TCLE)	ASSINATURA	DATA

4

**ANEXO 3**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES**





HOSPITAL DE CLÍNICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO  
(PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES)

O EFEITO DOS SUBTIPOS GENÉTICOS NA EVOLUÇÃO DA ANEMIA DE FANCONI  
EM PACIENTES BRASILEIROS

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Identificação: \_\_\_\_\_

**Investigador:** Daniela Vandresen Pilonetto

Laboratório de Imunogenética e Serviço de Transplante de Medula Óssea – HC / UFPR  
Rua Padre Camargo, 280 - 1º andar  
Fones: (41) 3360 7928 / (41) 9167 2001

Seu filho está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entenda. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para que seu filho participe do estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Seu filho só deve participar do estudo se você quiser. Você pode não permitir a participação do seu filho ou retirá-lo deste estudo a qualquer momento.

**INTRODUÇÃO**

A anemia de Fanconi ocorre quando existe um defeito no material que é passado dos pais para os filhos, ou seja, nos genes herdados do pai e da mãe. Esta doença pode ser causada por alterações em diferentes genes sendo assim pode ser dividida em vários grupos ou subtipos genéticos. Algumas pesquisas realizadas em outros países demonstraram que a identificação destes subtipos genéticos classificados de acordo com o gene que se encontra alterado pode contribuir com o diagnóstico e ainda poderá ajudar a entender como será a evolução da doença.

**PROPÓSITO DO ESTUDO**

Identificar o subtipo genético dos pacientes, ou seja, qual o gene que está alterado. Para isso serão pesquisadas as mutações (alterações na sequência do DNA) nos genes mais frequentemente envolvidos (*FANCA*, *FANCC* e *FANCG*). De acordo com as alterações encontradas os médicos poderão entender se existe relação entre os tipos das mutações e a evolução da anemia de Fanconi; poderão explicar quais as chances de que os irmãos e filhos também possam apresentar a doença e ainda identificar a frequência com que estas mutações ocorrem entre pacientes brasileiros.

  
**MÁRIA JOSÉ MOÇELIN**  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do HC/UFPR  
Matrícula 7462





### **SELEÇÃO**

Seu filho será avaliado previamente pelo médico responsável quanto as condições dele de participar ou não do estudo como: acesso venoso e a possibilidade de incluir a amostra para estudo como parte de seus procedimentos clínicos sem que haja prejuízo seu filho. Todo o paciente que esteja em condições clínicas de doar uma amostra de sangue será convidado a participar do estudo.

### **PROCEDIMENTOS**

Se você concordar que seu filho participe do estudo, será solicitada pelo médico responsável (Dra Carmem Bonfim) a coleta de uma amostra de sangue. Isto será feito através da punção de uma veia do braço de seu filho (furar a pele com uma pequena agulha) para retirar uma pequena quantidade de sangue (aproximadamente 3 a 4 ml)

Primeiramente a pele do braço do seu filho será descontaminada com uma solução anti-séptica (líquido utilizado para diminuir o risco de infecção). Então, a ponta de uma agulha será introduzida na pele até a veia. Um tubo será ligado ao final da agulha e o sangue será coletado. Ele poderá sentir uma dor de intensidade variável (geralmente leve) quando a agulha for introduzida na pele. Esta amostra de sangue será encaminhada para o Laboratório de Imunogenética onde a investigação de alterações nos genes mais frequentemente encontrados entre pacientes com anemia de Fanconi será realizada. As amostras serão identificadas com um código para que a identidade de seu filho seja sempre preservada e não haja nenhuma informação pessoal sobre ele. Qualquer resultado será informado para o seu médico através desta identificação dada à amostra do seu filho.

### **BENEFÍCIOS ESPERADOS OU ANTECIPADOS**

1 - A identificação do subtipo genético ao qual seu filho pertence pode ajudar os médicos entender se existe relação entre os tipos das mutações e a evolução desta doença e explicar qual a chance de que os irmãos ou ainda as gerações futuras também possam apresentar a doença.

2 - Neste estudo serão realizados somente exames de laboratório, não envolvendo nenhum tipo de tratamento. Se a identificação do subtipo genético tiver sucesso, os resultados serão entregues para o médico do seu filho no HC / UFPR (Dra Carmem Bonfim). Este médico será responsável por entregar os resultados para você.

### **BENEFÍCIOS ANTECIPADOS PARA A SOCIEDADE**

Espera-se que estes estudos possam identificar quais alterações são mais frequentemente observadas nestes genes entre pacientes com anemia de Fanconi brasileiros e correlacionar estes dados com as manifestações clínicas de pacientes de uma mesma origem étnica.

### **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:**

Sua decisão em permitir a participação de seu filho neste estudo é voluntária. Você pode decidir que seu filho não participará do estudo. Uma vez que você decidiu que ele participará do estudo, você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Se você decidir que seu filho não continuará no estudo e retirar sua participação, seu filho não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual ele tem direito.

### **CUSTOS**

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

5



**PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO**

A participação de seu filho é voluntária, portanto você não será pago pela participação dele no estudo.

**PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:**

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

**CONTATO PARA PERGUNTAS**

Se você ou seus parentes tiverem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe (Daniela V. Pilonetto, pelo telefone (41) 3360 7928 ou celular (41) 9167 2001). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:**

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL (Se menor ou incapacitado)	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR (Pessoa que aplicou o TCLE)	ASSINATURA	DATA

5