

ADRIANE MARTINS DE FREITAS

**ESTUDO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA
DE PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI.**

**Trabalho de Graduação apresentado
ao curso de Ciências Biológicas, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.**

Orientadora: Prof^a. Enilze M. F. Ribeiro

**CURITIBA
1997**

À meus pais

AGRADECIMENTOS

À profª Enilze Maria de Souza F. Ribeiro, pela sua orientação e pela ajuda nos momentos de incertezas e “correria contra o tempo” durante a execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. Iglénir João Cavalli, pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Citogenética Humana e desenvolver um trabalho de iniciação científica, que foi de grande valia para minha formação acadêmica e profissional.

À Ana Teresa Leoni S. Braz e Déborah Afonso Cornélio, por tudo que aprendi durante estes quase dois anos de estágio neste laboratório, pela sua ajuda, pela sua paciência com minhas perguntas bobas e meus “esquecimentos” e pela sua amizade.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Humana, Lismeri, Juan, Gabriela e Guaracira (no “finzinho”), que contribuíram de maneira direta ou indireta durante o meu estágio e na execução deste trabalho.

À equipe do Serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) e Ambulatório de Hematologia do Hospital de Clínicas- UFPR, pelo material cedido para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Citogenética do Hospital de Clínicas- UFPR, pela preparação do material utilizado neste trabalho e pelo uso da infra-estrutura do laboratório para a análise e fotografia das metáfases. À Carmen, pelo material do DEB cedido para o meu trabalho.

Aos meus sempre amigos de todas as horas: Carolina, Fernanda, Viviane, Orlei, Mariana, João e Paulo e a todos os meus colegas de turma que, de uma maneira ou outra, contribuíram de forma significativa na minha formação.

A Paulo, pela sua enorme paciência, carinho e companheirismo. Obrigado por ter me ouvido nas horas tristes e ter vibrado nos momentos de alegria (obrigado pelo disquete!)

A meus pais, que podem nem entender do que se trata este trabalho, mas com certeza estão orgulhosos em saber que consegui finalizar mais uma importante etapa da minha vida. Obrigado por sempre poder contar com vocês.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	2
1.1.OBJETIVOS.....	11
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1.OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	12
2.2.PREPARAÇÃO CITOLÓGICA.....	12
2.3.BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO GTG.....	13
2.4.ANÁLISE E OBTENÇÃO DOS NEGATIVOS.....	13
3.RESULTADOS.....	15
4.DISSCUSSÃO.....	18
5.CONCLUSÕES.....	21
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença autossômica recessiva caracterizada clinicamente por uma progressiva pancitopenia, diversas malformações anatômicas congênitas e uma elevada predisposição à neoplasias. O diagnóstico clínico da doença é difícil, devido à grande variabilidade fenotípica da doença, sendo então necessária a confirmação citogenética, que consiste em adicionar agentes alquilantes à cultura celular, como mitomicina (MMC) ou diepoxibutano (DEB), que induzirão o aumento do número de quebras e formação de figuras radiais características da doença. A detecção de aberrações cromossômicas nestes pacientes é sugestiva de uma evolução clínica para leucemias, sendo portanto, de importância para fins terapêuticos e prognósticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a presença de aberrações cromossômicas clonais em amostras de medula óssea (MO) de 15 pacientes previamente diagnosticados para AF e na fase aplásica da doença. Dos 15 pacientes, 5 não apresentaram metáfases em sua MO ou estas estavam em quantidade insuficiente para análise. Entre os 10 pacientes que foram analisados, 6 apresentaram clones anormais em suas células. Três pacientes apresentaram cariótipo anormal envolvendo o cromossomo 17: caso 3, 46,XY,del (17)(p12); caso 5, 46,XY,i (17)(q10)/ 47,XY,+i (17)(q10) e o caso 15, que apresentou 46, XX, del (17)(p12) associado com del (7)(q22). O caso 8 apresentou o cariótipo anormal 46,XY, del(10)(q24); caso 10, 47,XX,+21 e caso 14, 47,XY,+11. Os resultados obtidos são inéditos na literatura, com exceção da 7q-, que associada a monossomia do 7 e translocações e deleções do cromossomo 1, são as mais comumente encontradas na fase pré-leucêmica da AF. Até a conclusão deste trabalho, nenhum paciente havia evoluído para leucemia e quatro pacientes foram a óbito, 3 por complicações decorrentes do transplante de medula óssea (TMO) e um pela grave pancitopenia.

1. INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) foi inicialmente descrita por Fanconi em 1927, como uma doença com padrão de herança autossômico recessivo e caracterizada por uma falência generalizada e progressiva da medula óssea (pancitopenia), bem como *facies* característico devido à microcefalia, microftalmia e formato triangular da face (figura 1) e diversas anormalidades anatômicas congênitas especialmente envolvendo o rádio, polegar (figura 2) e rins, retardo mental e de crescimento (figura 3), manchas de coloração café com leite na pele (figura 4), hipogonadismo e predisposição a vários tipos de neoplasias, especialmente leucemias (Fanconi, 1966; Swift, 1971; Schroeder e cols., 1976; Liu e cols., 1994).

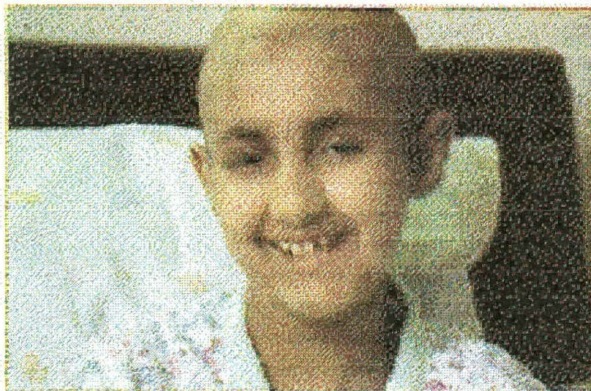


Figura 1 : Paciente do sexo feminino, 11 anos de idade, com *facies* típica de portadores de AF (vide texto). Foto gentilmente cedida pelo corpo clínico da Unidade de TMO - HC - UFPR.

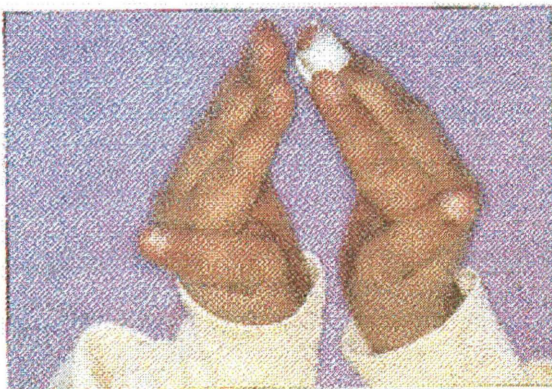


Figura 2 : Implantação anormal do polegar em paciente portador de AF. Foto gentilmente cedida pelo corpo clínico da Unidade de TMO - HC - UFPR.



Figura 3 : Comparação entre as estaturas de duas irmãs, uma de 11 anos de idade e portadora de AF (à direita) e a outra com 13 anos de idade (à esquerda). Foto gentilmente cedida pelo corpo clínico da Unidade de TMO - HC - UFPR.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR



Figura 4 : Áreas de hiperpigmentação da pele de um portador de AF. Foto gentilmente cedida pelo corpo clínico da Unidade de TMO - HC - UFPR.

O termo Anemia de Fanconi foi introduzido por Naegeli em 1931, que sugeriu que o mesmo fosse empregado naqueles pacientes com anemia aplástica familiar associada a anormalidades físicas congênitas. Usualmente, a doença se manifesta entre os cinco e nove anos de idade, afeta todos os grupos étnicos incluindo caucasóides, hispânicos, negróides, asiáticos, índios asiáticos e ameríndios e sua incidência é de 1 em 350.000 nascimentos na América do Norte (Swift, 1971).

afetados, em que mais de 40% das metáfases analisadas tinham rearranjos e quebras cromossômicas. As células dos portadores de AF mostram crescimento lento em cultura e uma fragilidade cromossômica caracterizada tanto por aumento espontâneo na taxa de quebras cromossômicas como por uma hipersensibilidade a agentes alquilantes, como a mitomicina C (MMC), o diepoxibutano (DEB) e outros (Auerbach e Wolman, 1976). Estes agentes induzem a formação de ligações cruzadas (*cross-linking*) na dupla hélice do DNA, tanto inter como intra-fita, o que leva a um bloqueio da replicação do DNA e transcrição de RNA, com efeitos potenciais na sobrevivência e função celular (Liu e cols., 1994). Após a exposição a estes agentes, as células de portadores de AF mostram alterações que incluem além da indução de aberrações cromossômicas (quebras e rearranjos), um retardo na fase G2 do ciclo celular com conseqüente diminuição de células em divisão e morte celular (Ishida e cols., 1982).

Baseados na hipersensibilidade cromossômica, desenvolveram-se técnicas de cultivo em que os linfócitos, fibroblastos, amniócitos ou células de vilosidades coriônicas são expostas a baixas concentrações destes agentes clastogênicos. A confirmação do diagnóstico da doença baseia-se na presença de quebras e figuras radiais em número aumentado (figura 5).

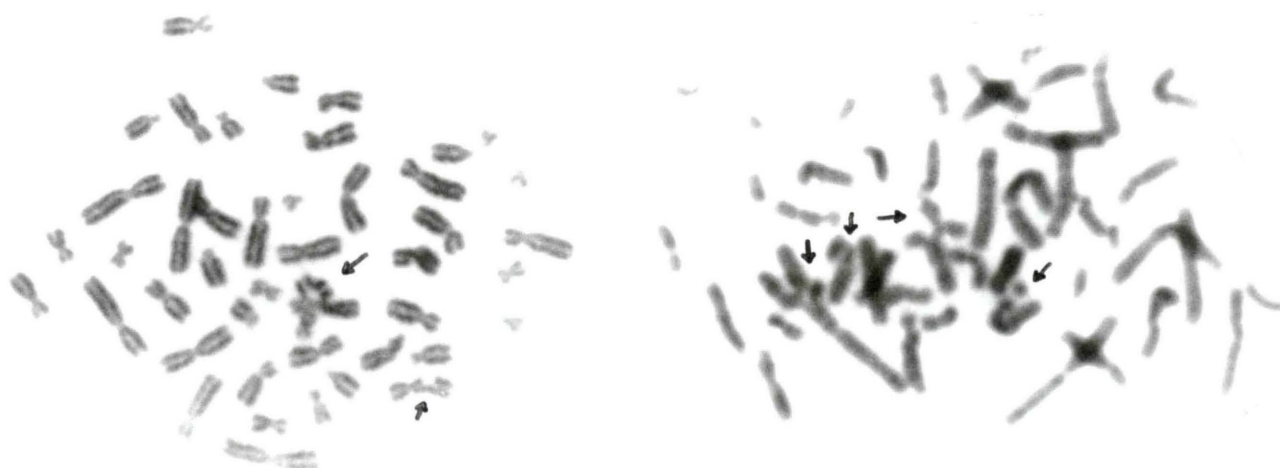


Figura 5 : Cromossomos metafásicos expostos ao DEB. As setas indicam as aberrações encontradas. Foto gentilmente cedida pela Unidade de Citogenética, Laboratório de Imunogenética, HC, UFPR.

Devido à grande variabilidade fenotípica, tanto em relação à presença como à gravidade dos sinais e sintomas, o diagnóstico puramente clínico é extremamente difícil. Segundo D'Andrea (1997), aproximadamente 33% dos pacientes com AF não possuem anormalidades congênicas características da doença, tornando a análise cromossômica imprescindível para um diagnóstico seguro e correto.

As quebras ocorrem casualmente em todos os cromossomos do genoma, porém as mesmas são observadas preferencialmente nas bandas G claras e sítios frágeis (Koskull e cols., 1973, Porfirio e cols., 1991), que têm sido associados com pontos de quebras em locos de oncogenes e outros genes envolvidos no processo cancerígeno (Hecht, 1988). Os fenótipos celulares de homozigotos e heterozigotos têm sido amplamente descritos e duas teorias gerais foram propostas para explicar a deficiência bioquímica básica : uma incapacidade da célula de superar o *stress* oxidativo ou a existência de uma proteína deficiente que não permita o reparo do DNA, seja no reconhecimento ou no reparo do dano (Santos e cols., 1994).

A sensibilidade anormal ao oxigênio foi demonstrada pelo baixo crescimento das células em um ambiente com 20% de tensão de oxigênio, mas com recuperação com a diminuição da tensão para 5% (Schindler e Hoehn, 1988). Estes autores sugerem, através de experimentos com citometria de fluxo, que a sensibilidade ao oxigênio se manifesta pela tendência dos fibroblastos se acumularem na fase G2 do ciclo celular, pois este efeito é reduzido quando células FA crescem em níveis baixos de oxigênio.

Devido à sensibilidade celular aos agentes clastogênicos, a AF é frequentemente comparada com outras síndromes que demonstram sensibilidade a drogas e instabilidade genômica, incluindo o Xeroderma pigmentoso (XP), a Ataxia-telangiectasia (AT), a Síndrome de Bloom, a Síndrome de Cockayne e o câncer de cólon hereditário não polipóide (HNPCC). Em todas estas doenças, já foi descrita a atuação de genes envolvidos com o reparo do DNA ou com a regulação do ciclo celular, sugerindo que a instabilidade genômica resulte de uma deficiência celular em um ou em vários processos, incluindo reparo do DNA, regulação do ciclo celular ou replicação do DNA (D'Andrea e Grompe, 1997).

A grande heterogeneidade fenotípica observada nestes pacientes, é acompanhada pela heterogeneidade genotípica, que somente pode ser demonstrada por análises de complementação, através de metodologia desenvolvida por Yoshida (1980). Este autor, hibridizando células de portadores de AF com fibroblastos normais, observou que as quebras espontâneas e induzidas por

MMC deixavam de ocorrer no híbrido. Utilizando esta metodologia, Zakrzewski e Sperling (1980) foram os primeiros a demonstrar heterogeneidade na AF a nível celular. Após a fusão de células normais com células de diferentes pacientes portadores de AF, verificaram que somente em alguns ocorria correção das quebras induzidas por MMC, identificando a existência de pelo menos dois grupos de complementação. Atualmente, já estão definidos cinco grupos de complementação (A a E), indicando a existência de pelo menos cinco genes que podem levar à AF (Duckworth-Rysiecki e cols., 1985; Strathdee e cols., 1992; Santos e cols., 1994). Recentemente, Joenje e cols. (1997), sugeriram a existência de pelo menos mais três grupos (F, G e H), elevando para oito o número provável de genes envolvidos na AF. Estes autores introduziram marcadores selecionados em uma linhagem celular original FA(E) (com o grupo de complementação E previamente identificado) e analisaram híbridos de fusão com três linhagens celulares classificadas como não-ABCD. Todos os híbridos foram complementados para sensibilidade à agentes alquilantes, indicando não se tratar do grupo E. As três linhagens foram então marcadas e todas as possíveis combinações híbridas para complementação foram examinadas, indicando que cada linhagem celular individual representava um novo grupo de complementação, denominados de F, G e H. Buchwald (1995) com base na análise de complementação de 47 pacientes com AF da Europa, EUA e Canadá, estimou a frequência de vários subtipos: 31 do grupo A (66%), 2 do grupo B (4,3%), 6 do grupo C (12,7%), 2 do grupo D (4,3%) e 6 do grupo E (12,7%). Três destes genes já tem localização cromossômica definida por hibridação *in situ*, FA(A) no cromossomo 16 (16q24.3) (Pronk e cols., 1995), FA (C) no cromossomo 9 (9q22.3) (Strathdee e cols., 1992) e FA(D) no cromossomo 3 (3p22-26) (Whitney e cols., 1995). Dois destes genes, o FA(C) e o FA(A) já foram clonados.

O primeiro gene a ser clonado foi o FA(C), através de complementação funcional das alterações celulares. Strathdee e cols.(1992) isolaram um DNAc que corrigia a sensibilidade das células do grupo FA(C) à MMC e DEB, mas não de outros grupos, o que confirmou a identidade deste DNAc como o verdadeiro DNAc do FA(C) . O gene FA(C) é composto por 14 exons e possui aproximadamente 80 kb e codifica para uma nova proteína de aproximadamente 63 kD (Gibson e cols., 1993), de localização citoplasmática (Youssoutian, 1994), sugerindo que não tenha uma ação direta no reparo do DNA, podendo no entanto, ser parte de uma via de reparo.

A clonagem do FA(A) foi realizada simultaneamente por dois diferentes grupos utilizando diferentes abordagens, como a clonagem posicional (Apostolou e cols., 1996) e a

complementação funcional (Lo Ten Foe e cols., 1996). Como sua publicação é mais recente, pouco se conhece sobre a proteína, mas há indicações de que o provável polipeptídeo FA(A) possui dois sinais de localização nuclear e uma seqüência de consenso com motivo tipo zíper de leucina, consistente com uma função nuclear, provavelmente como proteína de ligação ao DNA. O gene contém aproximadamente 80 kb e pelo menos 43 exons (Ianzano e cols., 1997).

A similaridade do fenótipo e das características celulares independe do grupo de complementação envolvido, levando à hipótese de que os genes envolvidos na AF atuem em conjunto, como um complexo molecular. É provável que as proteínas codificadas pelos genes FA tenham uma interação no interior da célula, seja através da formação de complexos proteicos ou por interação funcional. Vários modelos são possíveis. Primeiro, as proteínas FA podem se associar fisicamente em um complexo proteico que atuaria como um mecanismo de defesa, protegendo a célula do dano causado por agentes indutores de ligações cruzadas no DNA. Segundo, as proteínas podem funcionar como uma cascata enzimática, de forma seqüencial, resultando no reparo ou na remoção das macro-moléculas celulares com ligações cruzadas. Terceiro, as proteínas FA podem interagir em uma cascata de emissão de sinais que incluiria vários componentes, como um “sensor” do dano no citoplasma, um “transmissor” de sinais ao núcleo e um “indutor” de transcrição gênica, de novos processos de reparo no DNA ou retardo no ciclo celular. De acordo com este último modelo, a proteína FA(C) poderia exercer a função de “sensor” no citoplasma e a FA(A) teria ação direta no núcleo (D’Andrea e Grompe, 1997).

A clonagem dos genes FA está tendo um grande impacto no diagnóstico e no tratamento dos pacientes portadores de AF. Apesar do teste cromossômico com DEB ser altamente específico e sensível, ele não é capaz de distinguir entre os diferentes grupos de complementação e de identificar os heterozigotos para a mutação em um dos genes FA. A viabilidade do diagnóstico por análise direta do DNA dos genes FA(A) e FA(C) permite um diagnóstico mais rápido e preciso e será a base para diagnósticos pré-natais em famílias onde haja casos da doença (D’Andrea e Grompe, 1997). Em relação ao tratamento, independentemente do grupo de complementação, a maioria dos pacientes morre por complicações da falência medular. O transplante de medula óssea (TMO) é indicado, porém apesar de eliminar as manifestações hematológicas da doença, os pacientes são suscetíveis à complicações associadas ao uso de ciclofosfamida (Zanis-Neto e cols., 1995), além de uma grande parte dos pacientes não possuírem

doador histocompatível. Uma alternativa seria a transdução retroviral de um gene FA em células tronco hematopoéticas, opção bastante viável e que vem sendo estudada por vários centros.

Apesar de úteis, os estudos de transferência gênica assim como o TMO, não interferem com as anormalidades do desenvolvimento ou com o risco de câncer em tecidos não hematopoéticos. Assim, a clonagem e o melhor conhecimento dos genes e proteínas FA, poderão trazer maiores esclarecimentos sobre seu papel em outros aspectos clínicos da FA, como por exemplo a suscetibilidade ao câncer.

Há muitos anos atribui-se a esses pacientes um risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias de vários sistemas orgânicos incluindo a pele, sistemas gastrointestinais e ginecológico (D'Andrea e Grompe, 1997), mas principalmente leucemias mielóides agudas (LMA), presente em cerca de 15 a 20% dos pacientes que entram na segunda década de vida. Estes pacientes tem usualmente clones cariotipicamente anormais na medula óssea mas não exibem translocações cromossômicas envolvendo pontos de quebra associados a oncogenes específicos (Auerbach, 1992). Apesar da predisposição aumentada à leucemia estar relacionada à alteração genética básica da AF, a etiologia da leucemia nesses pacientes é desconhecida. Auerbach e Allen (1991) consideraram todos os pacientes portadores de AF como sendo pré-leucêmicos e que a AF representa um modelo para o estudo da etiologia da LMA. Mutações somáticas resultantes da instabilidade genética podem ter importância, assim como fatores ambientais podem ser agentes desencadeantes. Vários agentes alquilantes são carcinogênicos e aumentam a incidência de câncer na população em geral. Como exemplo, podemos citar o significativo aumento na incidência de LMA após tratamentos quimioterápicos com agentes alquilantes (Pedersen-Bjergaard, 1981). Com esses pacientes passam por uma fase pré-leucêmica, progredindo posteriormente para a LMA. Nestes pacientes, aberrações cromossômicas clonais, especialmente monossomias e deficiências dos cromossomos 7 e 5 (-7/-5 ou del (7q / 5q) foram descritas anteriormente ao aparecimento da leucemia. Outros carcinógenos considerados como leucemogênicos são o cloranfenicol, a fenilbutazona e o benzeno (Bloomfield e Brunning, 1976), sendo que o melhor documentado destes, o benzeno, está associado com quebras cromossômicas e desenvolvimento de anemia aplástica. Todos os casos de leucemias resultantes da exposição a estes carcinógenos são do tipo mielóide aguda. Assim, mesmo as pequenas quantidades destes agentes presentes no ambiente, podem contribuir para o aumento da incidência de LMA em pacientes hipersensíveis como os portadores de AF.

Apesar de relativamente poucos pacientes terem sido submetidos a estudos citogenéticos antes do início da leucemia, aberrações clonais tem sido descritas nos casos estudados, sugerindo clonalidade durante a fase aplásica da doença (Hirschman e cols., 1969; Lisker e Cobo, 1974; Berger e cols., 1980; Carbone e cols., 1984; Huret e cols., 1986; Huret e cols., 1988; Standen e cols., 1989; Schindler e cols., 1987). Várias evidências demonstram que a presença de clones anormais na medula óssea aumenta o risco de desenvolvimento de leucemia (Nowell e Besa, 1989).

A presença de clones com rearranjos cariotípicos complexos ou clones com monossomia ou deficiência no braço longo do cromossomo 7 em pacientes pré-leucêmicos, têm sido associada com prognóstico ruim e progressão para leucemia (Nowell e Besa, 1989). Uma revisão das correlações clínicas e citogenéticas em pré-leucemias, realizada no Sexto "Workshop" Internacional em Cromossomos e Leucemias, 1987 (1989), demonstrou que a presença de aberrações cromossômicas clonais nestes pacientes fornece uma forte indicação da natureza neoplásica da doença. Um curto tempo de sobrevida foi associado com um maior grau de complexidade clonal.

Estudos citogenéticos em pacientes que já haviam desenvolvido um quadro leucêmico são relativamente limitados (Bourgeois e Hill, 1977; Roosendall e Nelis, 1981; Rotzak e cols., 1982; Auerbach e cols., 1982; Stivrins e cols., 1984; Nowell e cols., 1984; Woods e cols., 1985; Huret e cols., 1986; Thompson e cols., 1991; Berger e cols., 1993; Butturini e cols., 1994; Ferti e cols., 1996). Auerbach e Allen (1991), revisaram 68 casos descritos na literatura, sendo 54 casos de leucemia e 14 casos de pré-leucemia. Aberrações cromossômicas clonais foram detectadas na maioria dos casos em que o estudo da medula óssea foi realizado. Berger e cols. (1993) analisaram células de medula óssea de cinco pacientes previamente diagnosticados como portadores de AF e obtiveram os seguintes resultados: no paciente 1, que apresentava síndrome mielodisplásica (MDS), foi encontrado um clone anormal $47,XY, \text{trp}(1)(q32q44), + \text{mar}$ em 13 metáfases e uma célula normal. No paciente 2, que apresentava LMA, 13 metáfases apresentaram o cariótipo $45,XY,-7$. No paciente 3, que também tinha LMA, 14 metáfases eram anormais: $46,XY, \text{add}(1)(p34), \text{del}(7)(p13)$. No paciente 4, dois cariótipos foram observados: $46,XX$ (8 metáfases) e $46,XX,-5,+8$ (5 metáfases). No paciente 5, foi encontrado o cariótipo $46,XX,+5,-21$ em 25 metáfases e cinco metáfases normais. Treze anos depois, o mesmo cariótipo anormal foi visto, em quatorze metáfases analisadas. As aberrações mais freqüentemente encontradas foram a

monossomia do cromossomo 7 e translocações e duplicações envolvendo o braço longo do cromossomo 1 (1q). Uma maior frequência de aberrações envolvendo estes cromossomos parece ser um consenso na maioria das publicações, porém rearranjos em vários outros cromossomos foram descritos, demonstrando uma grande diversidade também a nível citogenético. Ferti e cols. (1996) descreveram o caso de um paciente com AF e LMA onde análises citogenéticas de células da medula óssea revelaram o cariótipo anormal $47,XY,der(6)t(1;6)(q23;p22), + mar$ em todas as metáfases analisadas. Na AF, a $t(1;6)$ com vários pontos de quebra no 1q tem sido encontrada tanto em LMA como em pré-leucemias.

Anomalias estruturais envolvendo o cromossomo Y são raras em doenças clonais hematológicas. Thompson e cols. (1991) observaram em um paciente portador de AF e MDS a trissomia do cromossomo 8 em 50% das células da MO analisadas. Numa segunda observação, 18 meses depois, o número de células com trissomia do 8 aumentou para 80% e um clone anormal adicional que continha um cromossomo Y derivativo, resultante de uma translocação entre o cromossomo Y e 1, foi encontrado em 3 de 50 células analisadas. Em análises citogenéticas subsequentes, a $t(Y;1)$ não foi encontrada e a trissomia do cromossomo 8 voltou ao nível de 50% em 200 células analisadas.

É interessante ressaltar a ausência de translocações como a $t(8;21)$, $t(15;17)$ e o envolvimento de 11q, comumente observados nos casos de LMAs “de novo”, mas não em pré-leucemias, sugerindo que a AF seja uma condição pré-leucêmica para a LMA, onde o estudo citogenético tem importante valor prognóstico (Auerbach e Allen, 1991).

1.1. OBJETIVOS

1. Avaliar citogeneticamente, a partir de amostras da medula óssea, pacientes portadores de AF, visando uma contribuição para o estabelecimento de um melhor ou pior prognóstico.
2. Correlacionar a presença ou ausência de aberrações cromossômicas com a evolução clínica do paciente.
3. Verificar se as aberrações detectadas em nossa amostra estão de acordo com as descrições da literatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram analisadas amostras de medula óssea obtidas de 15 pacientes, 10 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com idades entre 2 e 13 anos (M=6), com diagnóstico de AF previamente confirmado pelo teste com DEB. A coleta foi realizada no Ambulatório de Hematologia ou da Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Cerca de 5ml de medula óssea foi aspirada a partir da crista ilíaca posterior ou da região esternal. O material foi enviado à Unidade de Citogenética Humana do Laboratório de Imunogenética, HC, UFPR, onde foi realizada a preparação citológica.

2.2. PREPARAÇÃO CITOLÓGICA

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras da medula óssea, foi utilizado o método descrito por Williams e cols.(1994), com modificações, conforme descrito a seguir.

Após a coleta, a seringa foi enviada ao laboratório de Citogenética, onde o material foi dividido em quatro recipientes contendo meio de cultura (RPMI 1640 - Difco) suplementado com 30% de soro bovino fetal. O material colocado em dois frascos de cultura foi incubado por 24 horas a 37°C e ao ser distribuído em dois tubos de centrifuga foi imediatamente adicionado 0,1 ml de colchicina houdé (1 mg / 25 ml de água bidestilada esterilizada).

1. Após 55 minutos de exposição à colchicina, o material foi centrifugado a 1000 rpm por 8 minutos.
2. Foi retirado o sobrenadante e adicionado 1 ml de KCl (0,075M) a 37°C. O material foi ressuspenso lentamente e foram adicionados mais 9 ml de KCl. Após cuidadosa ressuspenção, permaneceu em repouso por mais 30 minutos.
3. O material foi centrifugado a 1000 rpm por 8 minutos e foi retirado o sobrenadante.
4. Foi acrescentado 1 ml do fixador (3 volumes de metanol para 1 de ácido acético glacial) recém preparado. O material foi homogeneizado e o volume foi completado para 10 ml.

6. Posteriormente, foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos.
7. As etapas 4 e 6 foram repetidas pelo menos duas vezes, até se obter um botão de células límpido.
8. Ao sedimento final foi acrescentado 1 ml de fixador.
9. Duas gotas da suspensão foram distribuídas em lâminas, previamente lavadas e mantidas na geladeira em álcool absoluto.
10. Após a secagem, que ocorreu naturalmente, as lâminas foram estocadas para obtenção das bandas G.

2.3. BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO GTG

Foi utilizada a técnica de Scheres (1972), com modificações.

1. As lâminas foram imersas em solução de tripsina 0,01% diluída em tampão fosfato, pH 6,8, por 8 a 15 segundos, conforme o tempo decorrido desde a preparação citológica.
2. Foi interrompida a ação da tripsina mergulhando a lâmina rapidamente em solução fisiológica 0,9% por duas vezes.
3. As lâminas foram coradas em solução de Giemsa diluída em tampão fosfato, pH 6,8, na proporção de 1:30, durante 7 minutos.
4. As lâminas foram lavadas com água destilada e secas ao ar.

2.4. ANÁLISE CROMOSSÔMICA E OBTENÇÃO DOS NEGATIVOS

Após o bandejamento G, as metáfases foram analisadas em microscópio óptico comum. Foram utilizados como critérios para a classificação, descrição de possíveis rearranjos e para a definição de clonalidade cromossômica, àqueles recomendados pelo ISCN, 1995. Neste, define-se como clone, a presença de pelo menos duas células com a mesma aberração estrutural ou a presença adicional do mesmo cromossomo e a ocorrência de pelo menos três células com a ausência do mesmo cromossomo.

No mínimo duas metáfases de cada clone foram selecionadas, fotografadas em microscópio comum com câmara fotográfica automática e posteriormente cariotipadas.

3. RESULTADOS

Dos 15 pacientes cujas células foram submetidas à cultura, em quatro não houve a obtenção de cromossomos metafásicos (casos de número 2, 6, 11 e 13) e em um (caso 12) a quantidade foi considerada insuficiente para análise (5 metáfases). Esta frequência (33%) de não obtenção de metáfases está dentro do esperado devido às condições de aplasia medular dos pacientes. As características dos pacientes em relação a sexo, idade, cariótipo e evolução clínica se encontram na tabela 1.

Nos 10 pacientes em que se obteve cromossomos metafásicos, foram analisadas um total de 173 metáfases e observadas aberrações clonais em 19 (10,98%) células de 6 pacientes (60%) (casos de número 3, 5, 8, 10, 14 e 15). As aberrações encontradas estão demonstradas na figura 6. As aberrações estruturais foram mais frequentes (67% - casos 4, 5, 8 e 15) do que as numéricas (33% - trissomias dos cromossomos 21 e 11 observados nos casos 10 e 14). Entre as aberrações estruturais, as envolvendo o cromossomo 17 foram as mais frequentes, tendo sido encontradas em 3 dos 4 pacientes (75% - casos 6, 10 e 15) com este tipo de aberração. As envolvendo o cromossomo 7 (caso 15) e 10 (caso 8) foram observadas em um dos quatro pacientes (33%, respectivamente). Das 5 aberrações estruturais observadas, 4 delas (80%) foram deleções e 1 (20%) foi isocromossomo. No caso número 4, foram vistas 2 quebras no cromossomo 5 em diferentes metáfases e uma trissomia do cromossomo 4 não clonal, tendo sido, portanto, o cariótipo considerado como normal, mas com a recomendação de repetição do mesmo em um período máximo de 6 meses. Dos 14 pacientes com evolução clínica conhecida (exceção do caso 12), 7 foram submetidos ao TMO. Destes, 3 (43%) não apresentaram metáfases antes do TMO, sendo que 2 (67%) apresentaram boa evolução clínica e 1 (33%) foi a óbito; 3 (43%) apresentaram aberrações cromossômicas, sendo que 2 (67%) foram a óbito e 1 (33%) apresentou boa evolução clínica; 1 (14%) dos 7 pacientes apresentava cariótipo normal, tendo ido a óbito. Dos 7 pacientes cuja evolução clínica refere a apenas pancitopenia, 3 (43%) apresentaram cariótipo normal e 3 (43%) cariótipo anormal (1 dos quais foi a óbito) e 1 (14%) não apresentou metáfases. Nenhum dos pacientes evoluiu para leucemia até o momento ou anteriormente ao óbito.

Tabela 1 : Características dos pacientes e respectivos cariótipos e evolução.

Nº	Sexo	Idade (anos)	Cariótipo	Evolução clínica (até 15/11/97)
1	M	04	46,XY [20]	Pancitopenia
2	M	11	SM	Óbito após TMO.
3	M	06	46,XY, del (17)(p12) [04] / 46,XY [09]	TMO, boa evolução.
4	F	02	46,XX [17] Aberrações não clonais [03]	Pancitopenia
5	M	10	46,XY, i (17)(q10) [02] / 47,XY, + i (17) (q10) [02] / 46,XY [16]	Pancitopenia
6	M	07	SM	Pancitopenia
7	F	13	46,XX [11]	Pancitopenia
8	M	03	46, XY, del(10)(q24)[02] / 46, XY [19]	Pancitopenia
9	M	09	46,XY [23]	Óbito após 2º TMO não aparentado.
10	F	09	47,XX, + 21 [02] / 46,XX [18]	Óbito após TMO não aparentado.
11	M	06	SM	TMO, boa evolução.
12	F	05	QI [05]	??
13	M	06	SM	TMO, boa evolução
14	M	08	47, XY,+11 [02] / 46, XY [07]	Óbito após 2º TMO
15	F	04	46,XX, del(7)(q22),del(17)(p12) [05]/ 46, XX [06]	Pancitopenia severa, óbito por sangramento no SNC.

M = masculino

F = feminino

SM = sem metáfases

QI = quantidade insuficiente de metáfases.

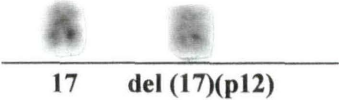

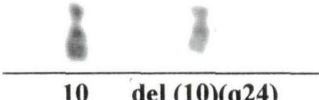
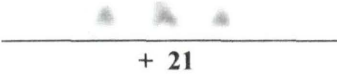


Nº do caso	CARIÓTIPOS PARCIAIS
3	 <p>17 del (17)(p12)</p>
5	 <p>17 i (17)(q10) + i (17)(q10)</p>
8	 <p>10 del (10)(q24)</p>
10	 <p>+ 21</p>
14	 <p>+ 11</p>
15	 <p>7 del (7)(q22) 17 del (17)(p12)</p>

Figura 6 : Cariótipos parciais (banda G) referentes aos casos 3, 5, 8, 10, 14 e 15.

4. DISCUSSÃO

Cerca de 15% dos pacientes portadores de AF desenvolvem LMA (Auerbach, 1992), sendo que a presença de aberrações cromossômicas é indicativa de evolução clínica para leucemia. Apesar disto, análises citogenéticas em pacientes portadores de AF que desenvolveram leucemias e mesmo mielodisplasias são relativamente pouco freqüentes (Bourgeois e Hill, 1977; Roosendall e Nelis, 1981; Rotzak e cols., 1982; Auerbach e cols., 1982; Stivrins e cols., 1984; Nowell e cols., 1984; Woods e cols., 1985; Huret e cols., 1986; Thompson e cols., 1991; Berger e cols., 1993; Butturini e cols., 1994; Ferti e cols., 1996). São também relativamente raros os estudos citogenéticos na fase de aplasia medular da doença (Hirschman e cols., 1969; Lisker e Cobo, 1974; Berger e cols., 1980; Carbone e cols., 1984; Huret e cols., 1986; Schindler e cols., 1987; Huret e cols., 1988; Standen e cols., 1989), onde a presença de aberrações clonais têm sido correlacionada positivamente com um maior risco de desenvolvimento de leucemia.

Realizamos, neste estudo, a análise citogenética em células da medula óssea de 15 pacientes portadores de AF, após confirmação do diagnóstico com o teste com DEB e em fase de aplasia medular, sem evidências clínicas ou hematológicas de mielodisplasia ou leucemia. Destes, 5 (33%) pacientes não apresentaram ou tiveram número insuficiente de metáfases na preparação citológica e, entre os 10 restantes, 6 (60%) apresentaram aberrações cromossômicas clonais (tabela 1). Entre as aberrações encontradas, as estruturais foram mais freqüentes (67%) que as numéricas (33%), sendo que o braço curto do cromossomo 17 esteve envolvido no cariótipo de 3 dos 4 pacientes com aberrações estruturais (75%). Em um dos pacientes (caso 5), identificou-se a presença de dois clones relacionados portadores de um isocromossomo formado pelos braços longos do cromossomo 17, i (17q). Esta é uma aberração freqüentemente descrita em doenças hematológicas, especialmente como aberração secundária na evolução da leucemia mielóide crônica (LMC), onde é encontrada em cerca de 10% dos casos (Heim e Mitelman, 1995). Cerca de 20 casos de LMA foram descritos contendo i(17q) como aberração isolada (Mitelman e cols., 1973, Mertens e cols., 1994), além de estar presente em cerca de 1 a 5% das mielodisplasias (MDSs) e como aberração secundária ou em cariótipos hiperdiploides na LLA. Também ocorreu em raros casos de mielofibrose idiopática e em alguns tumores sólidos como o neuroectodermico. Na LMA, Becher e cols. (1990), sugeriram que a presença isolada do i(17q) identifica um subgrupo de pacientes com doenças displásicas, às vezes mieloproliferativas, caracterizadas por rápida progressão para LMA, pouca resposta à quimioterapia e curto tempo de sobrevida após a

transformação. A formação deste cromossomo aberrante leva à ausência (monossomia) de um dos braços curtos do cromossomo 17 e à trissomia (tetrassomia no segundo clone) do braço longo do mesmo. Apesar dos estudos moleculares não terem fornecido informações mais concretas, alguns autores sugerem que a perda do braço curto possa ter um efeito importante, pois leva à perda de um alelo de cada gene localizado em 17p, incluindo o gene supressor TP53, cujas mutações têm sido descritas na maioria das doenças neoplásicas (Heim e Mitelman, 1995). A mesma consequência molecular poderia ser sugerida nos casos 3 e 15, onde uma deleção no braço curto do cromossomo 17, (17p-) foi detectada, como única aberração no caso 1 e concomitante com uma deleção no braço longo do cromossomo 7 (7q-) no caso 15. O envolvimento de 17p têm sido correlacionado a casos de LMA e MDS secundárias, assim como a maioria das aberrações descritas em portadores de AF. O envolvimento do cromossomo 7, presente em nossa amostra no caso 15, é o mais freqüentemente citado na literatura, seja como monossomia total (-7) ou parcial (7q-) e têm sido associado a um pior prognóstico. Apesar de não haver relato clínico de evolução para leucemia da paciente número 15, podemos observar que esta apresentou uma evolução bastante desfavorável, com pancitopenia severa e óbito por sangramento no sistema nervoso central (SNC).

No caso 8, observamos uma deleção no braço longo do cromossomo 10 (10q-). Esta é uma aberração pouco citada na literatura, com somente 9 casos descritos em LLA e 4 em LMA, nenhum deles em pacientes portadores de AF (Mitelman e cols., 1997).

Dois pacientes (casos 10 e 14) apresentaram aberrações numéricas isoladas. No caso 10 foi detectada uma trissomia do cromossomo 21, aberração encontrada com uma freqüência relativamente alta em várias doenças hematológicas, especialmente LLAs, mas também em cerca de 5% das LMAs e em 5 a 10% das MDSs, em geral como aberração secundária e já descrita como associada à fase pré-leucêmica da AF (Auerbach e Allen, 1991). No caso 14, uma trissomia do cromossomo 11 foi identificada. Só há descrições desta trissomia em doenças hematológicas mielóides, LMAs ou MDSs, sendo que em um terço aparece como aberração isolada (Heim e Mitelman, 1995).

Comparando as aberrações cromossômicas encontradas em nossa amostra com as descritas na literatura, notamos que, com exceção do envolvimento do cromossomo 7 em um caso (número 15), todas as outras aberrações encontradas não foram ainda descritas em portadores de AF, apesar de serem relativamente comuns em portadores de LMAs ou MDSs,

especialmente secundárias. Este fato é teoricamente esperado, considerando que estes pacientes apresentam uma hipersensibilidade a agentes genotóxicos conforme mencionado na introdução deste trabalho.

Em relação à evolução clínica dos pacientes, podemos observar (tabela 1) que de 14 com evolução conhecida, 5 (35,7%) foram a óbito, sendo 4 por complicações decorrentes do TMO (casos 2, 9, 10 e 14) e 1 por sangramento no SNC (caso 15). Destes, 1 não apresentou metáfases na análise citogenética (caso 2), 1 tinha cariótipo normal (caso 9) e 3 tinham cariótipos anormais (caso 10 (+21), caso 14 (+11) e caso 15 (7q- e 17p-)). Entre os que permanecem vivos, dois foram submetidos ao TMO e estão apresentando boa evolução (casos 3 (17p-) e 11 (SM)) e os 6 restantes (casos 1, 4, 5, 6, 7 e 8) estão pancitopênicos e aguardando TMO. Nenhum deles apresentou, até a conclusão deste trabalho, evolução para LMA ou MDS. Com exceção do caso 15, onde o óbito foi em decorrência da própria doença e não de complicações do TMO e havia uma aberração cromossômica (7q-) indicada por diversos autores como associada a um prognóstico ruim, acreditamos que não podemos fazer uma correlação direta entre o cariótipo e a evolução clínica dos pacientes, o que já era esperado pelas poucas informações disponíveis de estudos citogenéticos na fase aplásica da AF. Este fato, aliado ao alto índice de aberrações cromossômicas encontradas em uma amostra reduzida como a que estudamos, justifica que os estudos citogenéticos devam ser intensificados na fase acima referida da AF. Isto, não só pela aplicabilidade das informações obtidas para fins terapêuticos e prognósticos, como também para a identificação das regiões cromossômicas envolvidas que poderão ser avaliadas com maior profundidade pelo emprego de metodologias moleculares.

5. CONCLUSÕES

- Neste trabalho, foram encontradas aberrações clonais em seis pacientes dos dez que apresentaram uma quantidade suficiente de metáfases para análise, índice bastante alto, considerando estudos anteriores similares.
- Entre as aberrações encontradas, somente em um caso (caso 15: del(7)(q22)) houve correlação com as aberrações mais comumente descritas na literatura (envolvendo o cromossomo 7 e 1), além de um caso (caso 10) descrito com trissomia do cromossomo 21. As demais aberrações encontradas em nossa amostra não haviam sido descritas anteriormente em pacientes portadores de AF na fase pré-leucêmica.
- Acharmos relevante o envolvimento do braço curto do cromossomo 17, que foi encontrado em 75% dos casos com aberrações estruturais.
- O fato de 7 pacientes terem sido submetidos ao TMO, dificultou uma correlação direta com a evolução clínica.
- A alta frequência de aberrações cromossômicas indica a importância dos estudos citogenéticos em pacientes com AF, conforme os objetivos deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

APOSTOLOU,S.; WHITMORE,S.A.; CRAWFORD,J.; ALON,N.; WIJKER,M.; PARKER,L.; LIGHTFOOT,J.; CARREAU,M.; CALLEN,D.F.; SAVOIA,A.; CHENG,N.C.; VAN BERKEL,C.G.M.; STRUNK,M.H.P.; GILLE,J.J.P.; PALS,G.; KRUYT,F.A.E.; PRONK,J.C.; ARWERT,F.; BUCHWALD,M.; JOENJE,H. Positional cloning of Fanconi anaemia group A gene. **Nat Genet** 14:324, 1996.

APPELBAUM,F.R.; BARRALL,J.; STORB,R.; RAMBERG,R.; DONEY,K.; SALE,G.E.; THOMAS,E.D. Clonal cytogenetic abnormalities in patients with otherwise typical aplastic anemia. **Exp Hematol** 15 : 1134-1139, 1987.

AUERBACH,A.D. Fanconi anaemia and leukaemia : tracking the genes. **Leukaemia** 6 : 1-4, 1992.

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

AUERBACH,A.D.; WEINER,M.A.; WARBURTON,D.; YEBOA,K.; LU,L.; BROXMEYER,H.E. Acute myeloid leukemias as the first hematologic manifestation of Fanconi Anemia. **Am J Hematol** 12 : 289-300, 1982.

AUERBACH,A.D.; ALLEN,R.G. Leukemia and preleukemia in Fanconi Anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. **Cancer Genet Cytogenet** 51 : 1-12, 1991.

BERGER,R.; BERNHEIM,A.; LE CONIAT,M.; VECCHIONE,D. SCHAISON,G. Chromosomal studies of leukemic and preleukemic Fanconi's anemia patients. **Hum Genet** 56 : 59-62, 1980.

BERGER,R.;LE CONIAT,M. Cytogenetics studies in AF: induced chromosomal breakage and cytogenetics of leukemia. In: **Fanconi Anemia. Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects**. TM Schroeder-Kurt, AD Auerbach, G Obe, eds. Springer, Berlin, pp.93-99.

BERGER,R.; LE CONIAT,M.; SCHAISON,G. Chromosome abnormalities in bone marrow of Fanconi anemia patients. **Cancer Genet Cytogenet** 65 : 47-50, 1993.

BLOOMFIELD,C.D.; BRUNNING,R.D. Acute leukemia as a terminal event in nonleukemic hematopoietic disorders. **Semin Oncol** 3 : 297-316, 1976.

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

BUCHWALD,M. Complementation groups: one or more per gene? **Nat Genet** 11:228-230, 1995.

- BUTTURINI,A.; GALE,R.P.; VERLANDER,P.C.; ADLER-BRECHER,B.; GILLIO,A.P.; AUERBACH,A.D. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia : an International Fanconi Anemia Registry study. **Blood** 84 : 1650-1655, 1994.
- CARBONE,P.; BARBATA,G.; MIRTO,S.; GRANATA,G. Inherited aplastic anemia with abnormal clones in bone marrow and increased endoreduplication in peripheral lymphocytes. **Cancer Genet Cytogenet** 13 : 259-266, 1984.
- D'ANDREA,A.D.; GROMPE,M. Molecular biology of FA: Implication for diagnosis and therapy. **Blood** 90(5): 1725-1736, 1997.
- DUCKWORTH-RYSIECKI,G.; CORNISH,K.; CLARKE,C.A.; BUCHWALD,M. Identification of two complementation groups in Fanconi anaemia. **Somat Cell Molec Genet** 11 : 35-41, 1985.
- FANCONI,G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi anemia (F.A.). I.Clinical aspects. **Semin Hematol** 4 : 233-240, 1966.
- FERTI,A.; PANANI,A.; DERVENOULAS,J.; RAPTIS,S.A. Cytogenetic findings in a Fanconi anemia patient with AML. **Cancer Genet Cytogenet** 90 : 182-183, 1996.
- GIBSON,R.A.; BUCHWALD,M.; ROBERTS,R.G.; MATHEW,C.G. Characterisation of the exon structure of the Fanconi anaemia group C gene by vectorette PCR. **Hum Mol Genet** 2:35, 1993.
- HECHT,F. Fragile sites, cancer chromosome breakpoints and oncogenes all cluster in light G bands. **Cancer Genet Cytogenet** 31:17-24, 1988.
- HEIM,S.; MITELMAN,F. Cancer Cytogenetics- Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells. **Wiley-Liss, Inc.**, 1995, 536 p.
- HIRSCHMAN,R.J.; SHULMAN,N.R.; ABUELO,J.G.; WHANG-PENG,J. Chromosomal aberrations in two cases of inherited aplastic anemia with unusual clinical features. **Ann Intern Med** 71 : 107-117, 1969.
- HURET,J.L.; BENZ,E.; GUILHOT,F.; BRIZARD,A.; TANZER,J. Fluctuation of a clone 46,XX,i (7q) in bone marrow in a Fanconi anaemia. **Hum Genet** 74 : 98-100, 1986.
- HURET,J.L.; TANZER,F.; GUIHOT,F.; FROCRAIN-HERCHKOVITCH,C.; SAVAGE,J.R.K. Karyotype evolution in the bone marrow of a patient with Fanconi anemia : breakpoints in clonal abnormalities of this disease. **Cytogenet Cell Genet** 48 : 224-227, 1988.
- IANZANO,L.; D'APOLITO,M.; CENTRA,M.; SAVINO,M.; LEVRAN,O.; AUERBACH,A.D.; CLETON-JANSEN,A.-M.; DOGGETT,N.A.; PRONK,J.C.; TIPPING,A.J.; GIBSON,R.A.; MATHEW,C.G.; WHITMORE,S.A.; APOSTOLOU,S.; CALLEN,D.F.; ZELANTE,L.; SAVOIA,A. The genomic organization of the Fanconi Anemia group A (FAA) gene. **Genomics** 41:309, 1997.

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

KOSKULL,H.; AULA,P. Nonrandom distribution of chromosome breaks in Fanconi's anaemia. **Cytogenet cell Genet** 12:423-434, 1973.

LISKER,R.; COBO de GUTIERREZ,A. Cytogenetic studies in Fanconi's anemia. Description of a case with bone marrow clonal evolution. **Clin Genet** 5 : 72-76, 1974.

LIU,J.M.; BUCHWALD,M.; WALSH,C.E.; YOUNG,N.S. Fanconi anemia and novel strategies for therapy. **Blood** 84: (12)3995-4007, 1994.

LO TEN FOE,J.R.; ROOIMANS,M.A.; BOSNOYAN-COLLINS,L.; ALAN,N.; WIJKER,M.; PARKER,L.; LIGHTFOOT,J.; CARREAU,M.; CALLEN,D.F.; SAVOIA,A.; CHENG,N.C.; VAN BERKEL,C.G.; STRUNK,M.H.; GILLE,J.J.; PALS,G.; KRUYT,F.A.; PRONK,J.C.; ARWERT,F.; BUCHWALD,M.; JOENJE,H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anemia gene, FAA. **Nature Genet** 14:320, 1996.

MITELMAN,F.; MERTENS,F.; JOHANSSON,B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. **Nature Genet** 15:417-473, 1997.

NOWELL,P.C.; BERGMAN,G.; BESA,E.C.; WILMOTH,D.; EMANUEL,B. Progressive preleukemia with a chromosomally abnormal clone in a kindred with the Estren-Dameshek variant of Fanconi's anemia. **Blood** 64 : 1135-1138, 1984.

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

PEDERSEN-BJERGAARD,J.; PHILIP,P.; MORTENSEN,B.T.; ERSBOLL,J.; JENSEN,G.; PANDURO,J.; THOMSEN,M. Acute nonlymphocytic leukemia, preleukemia, and acute myeloproliferative syndrome secondary to treatment of other malignant diseases. Clinical and cytogenetic characteristics and results of in vitro culture of bone marrow and HLA typing. **Blood** 57 : 712-723, 1981.

PIERRE,R.V.; CATOVSKY,D.; MUFTI,G.J.; SWANSBURY,G.J.; MECUCCI,C.; DEWALD,G.W.; RUUTU,T.; VAN DEN BERGHE,H.; ROWLEY,J.D.; MITELMAN,F.; REEVES,B.R.; ALIMENA,G.; GARSON,O.M.; LAWLER,S.D.; DA LA CHAPELLE,A. Sixth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1987. Clinical-cytogenetic correlations in myelodysplasia (preleukemia). **Cancer Genet Cytogenet** 40 : 140-161, 1989.

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

PRONK,J.C.; GIBSON,R.A.; SAVOIA,A.; WIJKER,M.; MORGAN,N.S.; MELCHIONDA,S.; FORD,D.; TEMTAMY,S.; ORTEGA,J.J.; JANSEN,S.; HARENGA,C.; COHN,R.J.; DE RAVEL,T.J.; ROBERTS,I.; WESTERVELD,A.; EASTON,D.J.; JOENJE,H.; MATHEW,C.G.; ARWERT,F. Localization of the Fanconi anemia complementation group a gene to chromosome 16q24.3. *Nat Genet* 11:338, 1995.

ROOZENDALL,K.J.; NELIS,K.O.A.H. Leukemia in a case of Fanconi's anemia. *Clin Genet* 25 : 208, 1981.

ROTZAK,R.; KAPLINSKI,N.; CHAKI,R.; BLEIF,F.; BERKOVITZ,M.; GOLDMAN,B.; FRANKL,O. Giant marker chromosome in Fanconi's anemia transforming into erythroleukemia in an adult. *Acta Haematol* 67 : 214-216.

SANTOS,C.C.; GAVISH,H.; BUCHWALD,M. Fanconi Anemia revisited : old ideas and new advances. *Stem Cells* 12 : 142-153, 1994.

SCHINDLER,D.; KUBBIES,M.; HOEHN,H.; SCHINZEL,A.; RABINOVITCH, P.S. Confirmation of Fanconi's anemia and detection of a chromosomal aberration (1q12-32 triplication) via BrdU Hoechst flow cytometry. *Am J Pediatr Oncol* 9 : 172-177, 1987.

SCHROEDER,T.M.; TILGEN,D.; KRUGER,J.; VOGEL,F. Formal genetics of Fanconi's anemia. *Hum Genet* 32 : 257-288, 1976.

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

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

STRATHDEE,C.A.; BUCHWALD,M. Molecular and cellular biology of Fanconi anaemia. *Am J Pediatr Haematol Oncol* 14 : 177-185, 1992.

STRATHDEE,C.A.; DUNCAN,A.M.; BUCHWALD,M. Evidence for at least four Fanconi anemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet* 1:196, 1992.

SWIFT,M. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. *Nature* 230 : 370-373, 1976.

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

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

WOODS,W.C.; NESBIT,M.E.; BUCKLEY,J.; LAMPKIN,B.C.; McCREADIE,S.; KIM,T.H.; PIOMELLI,S.; KERSEY,J.H.; BERSTEIN,I.; HAMMOND,D. Correlation of chromosome abnormalities with patient characteristics, histological subtype, and induction success in children with acute nonlymphocytic leukemia. **J Clin Oncol** 3 : 3-11, 1985.

YOSHIDA,M.C. Suppression of spontaneous and mitomycin C-induced chromosome aberrations in Fanconi's anemia by cell fusion with human fibroblasts. **Hum Genet** 62:321, 1982.

YOUSSOUFIAN,H. Localization of Fanconi anemia C protein to the cytoplasm of mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 91:7975, 1994.

ZAKRZEWSKI,S.; SPERLING,K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. **Hum Genet** 56:81, 1980.

ZANIS-NETO,J.; RIBEIRO,R.C.; MEDEIROS,C.; ANDRADE,R.J.; OGASAWARA,V.; HUSH(TREMA),M.; MAGDALENA,N.; FRIEDRICH,M.L.; BITENCOURT,M.A.; BONFIM,C.; and PASQUINI,R. Bone marrow transplantation for pacientes with Fanconi anemia: a study of 24 cases from a single institucion. **Bone marrow transplatation** 15: 293-298, 1995.