

LUCIANA ZAMBELLI CAPUTO

**Implantação da técnica de quebras
cromossômicas com diepoxibutano (DEB) em
laboratório de citogenética: estudo de 148 casos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Dr. Israel Bendit

São Paulo

2002

DEDICATÓRIA

**Aos meus queridos pais,
Laércio ♥ Líbia,
pelo exemplo de vida,
perseverança, amor e
humor com que,
diariamente, mantêm a
nossa família.**

**Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o
que ensina.**

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

- ▶ Ao **Dr. Israel Bendit**, pela orientação, confiança e amizade a mim dedicados durante à elaboração deste trabalho.
- ▶ À **Dra Elvira D. R. P. Velloso**, por toda disponibilidade, valiosa paciência, prazerosa amizade e principalmente empolgação demonstrada desde a escolha do tema até à finalização deste trabalho, que foi concretizado depois de seu grande esforço pessoal.
- ▶ À **Dra Mônica C. R. de Mello**, pela dedicação e paciência ao me ensinar a reconhecer os primeiros cromossomos, pela contribuição nas primeiras revisões e principalmente pela preciosa amizade e incentivo à finalização deste trabalho.
- ▶ Às grandes amigas **Cristina A. Kumeda, Tânia A. S. Vieira e Daniela Borri**, pelo suporte técnico, não só na implantação deste teste, mas pelo companheirismo na exaustiva rotina do laboratório de Citogenética, possibilitando, muitas vezes, minha dedicação a pós graduação, no cumprimento dos créditos e na realização deste trabalho.
- ▶ Ao **Prof Dr Pedro E. D. Llacer**, Diretor Técnico-científico da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, responsável pela minha permanência no Serviço de Citogenética e conseqüente concretização desse trabalho.
- ▶ Ao **Prof Titular Dalton A. F. Chamone**, Presidente da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, por permitir a realização desse trabalho.
- ▶ À **Dra Mina Holsman** e ao **Dr. Jorge D. C. Aivazoglou**, do Serviço de Hematologia Pediátrica, no envio de amostras do Instituto da Criança imprescindíveis na execução deste trabalho.
- ▶ Aos grandes médicos e meus ídolos **Drs Vicente Odone Filho** (pela doação de um dos primeiros lotes de DEB utilizados no trabalho) e **Lilian M. Cristofani**,

pela dedicação, paciência e competência em mantêr a esperança e devolver a alegria em um dos momentos mais difíceis para mim e minha família.

- ▶ Ao **Dr Marcelo G. Cliquet** pela autorização na abordagem dos doadores voluntários de sangue.
- ▶ À **Dra Chong A. Kim**, do Serviço de Genética Clínica do Instituto da Criança, no envio de algumas amostras para a realização deste teste e também pelo fornecimento de fotos de pacientes com AF.
- ▶ Ao **Dr Juan Llerena**, geneticista do INCA, pelas primeiras orientações na leitura do teste.
- ▶ Aos **Drs Hélio Lotério, Maria de Lourdes F. Chauffaille e Sandra Gualandro** pelas sugestões no exame de qualificação.
- ▶ Ao **Prof. Dr Jorge E. Kalil Filho**, Diretor do Laboratório Sírio Libanês, pelas sugestões durante a minha aula-treino e pela oportunidade de trabalho no laboratório.
- ▶ Às minhas doces irmãs **Daniela e Larissa**, pela ajuda na elaboração de algumas figuras e gráficos, elaboração da lista de abreviaturas e bibliografia e pelas incansáveis palavras de críticas e também de apoio à realização deste trabalho.
- ▶ A minha irmã **Cristiane** e ao meu irmão gêmeo **Luciano** que além das sugestões ortográficas e da imprescindível contribuição financeira, respectivamente, sempre me incentivaram à finalização deste trabalho.
- ▶ Aos meus cunhados **Elaine e Lauro** por aumentar a alegria na nossa família com a chegada dos meninos: Léo, Bibi e Pedrinho.
- ▶ Aos amigos **Reinaldo Manhani, Mafalda M. Y. Novaes, Mônica V. Marquezini, Cora Hors, Henrique Boccardo, Gedalva Vasconcellos e Sílvia Ciola**, que colaboraram para o término deste trabalho de forma direta ou indireta,

ajudando com sugestões ou mesmo uma palavra de apoio num momento de indecisão.

- ▶ A amiga **Madalena M. N. da S. Pares**, pesquisadora da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, pela grandiosa ajuda em toda a formatação e diagramação; além de sempre lembrar-me da importância do término desta dissertação na minha vida profissional.
- ▶ Ao amigo **Carlos Benevides**, “web designer”, pela paciência virtual demonstrada na confecção da capa deste trabalho.
- ▶ As amigas **Sônia e Tânia**, secretárias da pós graduação, que tornaram minha passagem pela Pós Graduação mais suave e alegre.
- ▶ À amiga **Maria Cécilia de M. Coelho**, do Laboratório de Investigação Médica do Serviço de Cirurgia Pediátrica, pela troca de idéias e sugestão de protocolo para a implantação do teste.
- ▶ À minha amiga **Cláudia Castro**, pelas sugestões, colaboração na revisão e pelas palavras de apoio, sempre na hora e momento certos.
- ▶ À **Rita de Cássia Ortega**, bibliotecária do Hospital Sírio Libanês, pela disponibilidade, preocupação e colaboração na obtenção de alguns periódicos antigos.
- ▶ À **Profa Clarice P. Ribeiro**, pela revisão gramatical deste trabalho.
- ▶ À **Mariana Curi**, pela competente análise estatística, na condução deste trabalho.
- ▶ À **Clara M. dos S. Silva**, auxiliar de enfermagem da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo pela coleta das amostras, sempre com um sorriso no rosto.

- ▶ Aos **amigos e amigas** do Laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês, não só pela companhia diária, mas também pelos alegres “happy hours”, fundamentais para o relaxamento, inspiração e finalização deste trabalho.

- ▶ Aos **doadores voluntários de sangue** da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, que colaboraram para a amostragem controle normal do teste.

- ▶ Aos **pacientes**, fonte maior de inspiração e desafios aos alicerces e estruturas de nosso empenho profissional.

- ▶ E finalmente, a **Deus**, que me presenteou com uma alegre, bem humorada e unida família e que colocou no meu caminho todos essas pessoas especiais.

Meu Muito Obrigada a Todos!



SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS _____	X
LISTA DE FIGURAS _____	XI
LISTA DE SIGLAS _____	XII
LISTA DE SÍMBOLOS _____	XIII
LISTA DE TABELAS _____	XIV
RESUMO _____	XV
SUMMARY _____	XVI
INTRODUÇÃO _____	1
OBJETIVOS _____	4
REVISÃO DA LITERATURA _____	5
2.1 Histórico _____	5
2.2 Etiopatogenia _____	7
2.3 Quadro clínico _____	11
2.3.1 Considerações Gerais _____	11
2.3.2 Anormalidades Congênitas _____	13
2.3.3 Anormalidades hematológicas e neoplasias _____	17
2.3.4 Variantes clínicas da AF _____	18
2.4 Perfil genético _____	19
2.4.1 Herança e Meio Ambiente _____	19
2.4.2 Síndromes de instabilidade cromossômica _____	20
2.4.3 Agentes clastogênicos _____	22
2.5 Testes citogenéticos para AF _____	24
2.5.1 Não induzido _____	24
2.5.2 Induzido _____	26
2.6 Padronização do teste de DEB _____	28
2.6.1 Concentração do DEB _____	28
2.6.2 Leitura do teste _____	29
2.6.3 Tipos de anormalidades cromossômicas encontradas na AF _____	30
2.6.4 Escore do teste de DEB _____	33
2.7 Correlação do teste de DEB com a clínica _____	34
2.8 Correlação do teste de DEB com o ciclo celular _____	35
CASUÍSTICA E MÉTODOS _____	39
3.1 Casuística _____	39
3.2 Métodos _____	41
3.2.1 Obtenção do material para estudo do cariótipo _____	41

3.2.2	Preparação dos cromossomos	41
3.2.3	Preparo e manipulação do DEB	42
3.2.4	Cultura com DEB	43
3.2.5	Cultura sem DEB	43
3.2.6	Incubação com colchicina	44
3.2.7	Solução hipotônica	44
3.2.8	Fixação do material	44
3.2.9	Preparação da lâmina	45
3.2.10	Coloração convencional	45
3.2.11	Bandamento	46
3.2.12	Leitura do teste de DEB	46
3.2.13	Cariotipagem	47
3.2.14	Estratégia de ensaio	48
3.2.15	Metodologia da análise estatística	48
	RESULTADOS	50
4.1	Características dos grupos estudados	50
4.2	Determinação do valor de referência para o DEB	51
4.3	Determinação da freqüência das anormalidades cromossômicas	53
4.4	Associação das variáveis cromossômicas com o valor de corte (DEB positivo e negativo).	55
4.5	Verificação da porcentagem de casos positivos, negativos e duvidosos nas populações definidas clinicamente	58
4.6	Verificação da freqüência de variáveis clínicas e hematológicas na população DEB positiva	60
4.7	Distribuição da faixa etária nos três grupos classificados como DEB positivo, DEB negativo e DEB duvidoso.	62
4.8	Verificação do parâmetro porcentagem de células anormais no total de células analisadas (%A/T) como valor de referência.	62
4.9	Grupo DEB duvidoso classificado pelo índice de quebras por células totais: verificação do ESA e alterações cromossômicas significantes	64
4.10	Verificação das alterações fenotípicas e dos dados clínicos que se associam ao teste DEB positivo, verificando o escore padronizado pelo RIAF na população estudada.	65
4.11	Verificação das alterações citogenéticas do cariótipo com banda G das culturas espontâneas em toda população estudada.	69
	DISCUSSÃO	71
	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE ABREVIATURAS

A	ADENINA
C	CITOSINA
del	DELEÇÃO
dra.	DOUTORA
et al.	E OUTROS
fen	ALTERAÇÃO FENOTÍPICA
G	GUANINA
G1	INTERVALO 1 DA INTÉRFASE
G2	INTERVALO 2 DA INTÉRFASE
h+	HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA ADICIONAL
Hb	HEMOGLOBINA
inv	INVERSÃO
M	MITOSE
máx.	MÁXIMO
mín.	MÍNIMO
OUTROS	OUTROS DIAGNÓSTICOS HEMATOLÓGICOS
p.	PÁGINA
pb	PARES DE BASE
%A/T	PORCENTAGEM DE CÉLULAS ANORMAIS EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS TOTAIS
S	SÍNTESE
v.	VOLUME
T	TIMINA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CRIANÇAS PORTADORAS DE AF.....	P. 14
FIGURA 2. TIPOS DE FIGURAS QUADRIRRADIAIS.....	P. 32
FIGURA 3. METÁFASE EM ENDORREDUPLICAÇÃO.....	P. 33
FIGURA 4. HISTOGRAMA DE INDIVÍDUOS NORMAIS E PORTADORES DA AF.....	P. 36
FIGURA 5. CARIÓTIPO COM BANDAMENTO G.....	P. 48
FIGURA 6A. METÁFASES COM ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS VISTAS NA AF: PRESENÇA DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS.....	P. 56
FIGURA 6B. METÁFASES COM ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS VISTAS NA AF: PRESENÇA DE FIGURAS RADIAIS.....	P. 57
FIGURA 6C. METÁFASES COM ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS VISTAS NA AF: PRESENÇA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS.....	P. 57
FIGURA 7. MODELO DA REQUISIÇÃO PARA ESTUDO CITOGENÉTICO COM DEB UTILIZADO NA FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE HEMOCENTRO DE SÃO PAULO.....	P. 76

LISTA DE SIGLAS

AAA	ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA
AAC	ANEMIA APLÁSTICA CONSTITUCIONAL
AD	ANEMIA DISERITROPOIÉTICA
ADN	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
AF	ANEMIA DE FANCONI
AFED	ANEMIA DE FANCONI TIPO ESTREN-DAMESHEK
APSV	APLASIA PURA DE SÉRIE VERMELHA
ARMS	SISTEMA DE MUTAÇÃO REFRACTÁRIA À AMPLIFICAÇÃO
ATMO	AMBULATÓRIO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
BLM	BLEOMICINA
CERCLA	COMPREHENSIVE ENVIRONMENTAL RESPONSE, COMPENSATION, E LIABILITY ACT
CN	CONTROLE NEGATIVO
CP	CONTROLE POSITIVO
DC	DISQUERATOSE CONGÊNITA
DEB	DIEPOXIBUTANO
EPI	EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL
ESA	ESCORE SIMPLIFICADO DE AUERBACH
FAC	GRUPO DE COMPLEMENTAÇÃO C DA AF
FANCC	GENE DO GRUPO DE COMPLEMENTAÇÃO C DA AF
FANCA	GENE DO GRUPO DE COMPLEMENTAÇÃO A DA AF
FPSHSP	FUNDAÇÃO PRÓ SANGUE HEMOCENTRO DE SÃO PAULO
HCFMUSP	HOSPITAL DE CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HNPCC	CÂNCER DE CÓLON HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE (HEREDITARY NON-POLYPOSIS COLON CANCER)
IAF	IRMÃOS DE AF
ICR	INSTITUTO DA CRIANÇA
IOR	INTERMEDIÁRIOS DO OXIGÊNIO REATIVO
ISCN	SISTEMA INTERNACIONAL DE NOMENCLATURA EM CITOGENÉTICA
IVIC	INSTITUTO VENEZUELANO DE INVESTIGAÇÕES CIENTÍFICAS
LA	LEUCEMIA AGUDA
LMA	LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA
MMC	MITOMICINA C
MMII	MEMBROS INFERIORES
MMSS	MEMBROS SUPERIORES
MN	MOSTARDA NITROGENADA
MO	MEDULA ÓSSEA
NIH	NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
PHA	FITHEMAGLUTININA
RCRA	RESOURCE CONSERVATION AND RECOVERY ACT
RIAF	REGISTRO INTERNACIONAL DE ANEMIA DE FANCONI
SARA	SUPERFUND AMENDMENTS E REAUTHORIZATION ACT
SC	SEM CARACTERIZAÇÃO
SMD	SÍNDROME MIELODISPLÁSTICA
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SP	SANGUE PERIFÉRICO
SSCP	POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DO FILAMENTO ÚNICO
TAR	TROMBOCITOPENIA COM AUSÊNCIA DE RÁDIO
TCI	TROCAS ENTRE CROMÁTIDES IRMÃS
TMO	TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA
TSCA	TOXIC SUBSTANCES CONTROL ACT

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	CENTÍMETRO
dL	DECILITRO
2n	DIPLÓIDE
g	GRAMA
°C	GRAU CELSIUS
h	HORA
±	MAIS OU MENOS
≥	MAIOR OU IGUAL A
<	MENOR DO QUE
≤	MENOR OU IGUAL A
μg	MICROGRAMA
μL	MICROLITRO
mL	MILILITRO
mm³	MILÍMETRO CÚBICO
n	AMOSTRAGEM
-	NEGATIVO
+	POSITIVO
%	PORCENTAGEM
P, p	PROBABILIDADE
rpm	ROTAÇÕES POR MINUTO
U	UNIDADE

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DOENÇAS CARACTERIZADAS POR INSTABILIDADE GENÔMICA E ASSOCIADAS A RISCO ELEVADO DE DESENVOLVIMENTO DENEOPLASIAS.....	P. 21
TABELA 2 - AGENTES QUÍMICOS QUE INDUZEM QUEBRA CELULAR NA AF.....	P. 22
TABELA 3 - COMPARAÇÃO DE ESTUDOS NÃO INDUZIDOS EM PACIENTES AF E EM INDIVÍDUOS SEM ALTERAÇÃO HEMATOLÓGICA E COM CARIÓTIPO NORMAL.....	P. 25
TABELA 4 - REPRESENTAÇÃO DAS VARIANTES CROMOSSÔMICAS.....	P. 29
TABELA 5 - VALORES DE REFERÊNCIA (AUERBACH) PARA O TESTE DE DEB.....	P. 34
TABELA 6 - PROBABILIDADE (P) DO TESTE DE DEB SER POSITIVO.....	P. 35
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	P. 51
TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO VALORES DE REFERÊNCIA PARA TESTE DE DEB CALCULADO EM TRÊS PARÂMETROS DISTINTOS.....	P. 52
TABELA 9 - ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS PRESENTES NAS CULTURAS ESPONTÂNEA E INDUZIDA NOS GRUPOS DEB (+), DEB (-) E DEB DUVIDOSO.....	P. 54
TABELA 10 - FREQUÊNCIA DEB (+), DEB (-) E DEB DUVIDOSOS NOS GRUPOS DEFINIDOS CLINICAMENTE.....	P. 58
TABELA 11 - VARIÁVEIS CLÍNICAS NA POPULAÇÃO DEB (+).....	P. 60
TABELA 12 - VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS NA POPULAÇÃO DEB (+).....	P. 61
TABELA 13 - FAIXA ETÁRIA NAS POPULAÇÕES DEB (+), DEB (-) E DEB DUVIDOSOS.....	P. 62
TABELA 14 - CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS O TESTE DE DEB POR ÍNDICE DE QUEBRAS/ CÉLULAS E % DE CÉLULAS ANORMAIS.....	P. 63
TABELA 15 - ANÁLISE DEB DUVIDOSO POR: PARÂMETROS DE QUEBRAS E %A/T, ESA E ACHADOS CROMOSSÔMICOS SIGNIFICANTES.....	P. 64
TABELA 16 - ESCORE SIMPLIFICADO DE AUERBACH NA POPULAÇÃO DEB (+).....	P. 66
TABELA 17 - ESCORE DO RIAF NA POPULAÇÃO DEB DUVIDOSOS.....	P. 67
TABELA 18 - ESCORE DO RIAF NA POPULAÇÃO DEB (-).....	P. 68
TABELA 19 - DISTRIBUIÇÃO ESCORE SIMPLIFICADO DE AUERBACH EM CADA GRUPO.....	P. 69
TABELA 20 - CARIÓTIPO COM BANDAMENTO G NAS TRÊS POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	P. 70

RESUMO

Anemia de Fanconi (AF), doença autossômica recessiva, se caracteriza por anormalidades congênitas e predisposição a desenvolvimento de aplasia medular, leucemias e tumores sólidos. As anormalidades congênitas nem sempre são evidentes, como na forma variante, conhecida por Estren Dameshek. Outras síndromes congênitas apresentam alterações fenotípicas semelhantes às encontradas na AF, necessitando de diagnóstico laboratorial diferencial. A AF decorre da instabilidade cromossômica e seu diagnóstico é baseado na alteração dos cromossomos a agentes clastogênicos, sendo o teste padrão a quebra induzida por diepoxibutano (DEB). Analisamos 120 amostras de sangue periférico de 120 pacientes encaminhados para realização do teste de DEB. Foram incluídos também 28 amostras – controle negativo. Seguindo protocolo de Auerbach, foram realizadas duas culturas para cada amostra com e sem indutor (DEB 0,1µg/ml), analisadas de 30 a 100 metáfases para análise das anormalidades cromossômicas e 10 metáfase com bandamento G. Três parâmetros de leitura foram realizados: 1.) cálculo do índice de quebras por células totais; 2.) cálculo do índice de quebras por células anormais; 3.) cálculo da porcentagem de células anormais (%A/T). O diagnóstico dos pacientes foi realizado retrospectivamente por dois hematologistas através da análise dos prontuários, sendo caracterizados seis grupos: alteração fenotípica (fen) – 8, anemia aplástica constitucional (AAC) – 10, anemia aplástica adquirida (AAA) – 31, irmão de AF (iAF) – 13 e outros diagnósticos (OUTROS) – 5, sem caracterização clínica (SC) – 36 pacientes. O valor de DEB (quebras/células) considerado positivo foi maior ou igual 0,74 e o negativo menor ou igual 0,08. De acordo com estes valores dividiu-se a amostragem em três grupos: DEB positivo (25 amostras); DEB negativo (102 amostras) e DEB duvidosos (21 amostras). O teste de DEB foi positivo em oito pacientes, sendo um irmão de portador da AF, em quatro com o diagnóstico inicial de AAC e em três pacientes do grupo SC. As alterações cromossômicas evidenciadas na cultura induzidas com DEB são consideradas marcadores citogenéticos dessa doença, pois com exceção do cromossomo em anel e endorreduplicação, todas as anormalidades cromossômicas foram encontradas em alta frequência no grupo DEB positivo. As amostras com teste de DEB positivo apresentaram concordância de 100% com o escore clínico simplificado de Auerbach. No grupo DEB duvidoso, a realização de outros testes com outros agentes clastogênicos, como a Mitomicina C devem ser considerados.

SUMMARY

Fanconi Anemia is an autosomal recessive disease characterized by some congenital abnormalities and predisposition to medullar aplasia, leukemia and solid tumors. Nevertheless, congenital abnormalities have not been always evident and the majority of the patients are referring for pancitopenia, otherwise congenital syndromes have a differential diagnosis with phenotypic alterations in FA. The disease is due chromosome instability and the diagnoses is based upon the action of clastogenic agents causing chromosomes abnormalities, and the gold standard test is the employment of diepoxybutane as a cause of chromosome breaking. We analyzed 148 peripheral blood samples from 120 patients refer for the DEB test and 28 negative controls. In each sample we performed 2 culture with and without DEB (0.1 $\mu\text{g/mL}$) following Auerbach's protocol and 30 to 100 metaphases were analyzed for chromosomal abnormalities and 10 Giemsa- banded metaphases. The cells were scored for breaks/cell, breaks/abnormal cell and percentage of abnormal cells. The patients' charts were scrutinized by 2 independent hematologist and 6 groups were sorted beside the positive (17) and negative controls (28) as follow: phenotypic abnormalities (phen) – 8; constitutional aplastic anemia (CAA) – 10; acquired aplastic anemia (AAA) – 31; sibs of FA (sFA) – 13 and others (OTHERS). – 5. In 36 patients no clinical characterization was possible for other reasons. The DEB positive and negative value (breaks/cell) considered in this study was ≥ 0.74 and ≤ 0.08 respectively and according to this we classified our population in 3 distinctive groups: DEB-sensitive (8 patients and 17 positive control), DEB-insensitive (102 samples), and DEB-doubtful (21 samples). 8 patients belowed DEB sensitive: 1 of them was a sFA, 4 were just diagnosed as CAA and 3 patients had no clinical characterization. Chromosomal abnormalities were highly frequent in the DEB-sensitive group with the exception of ring chromosomes and endoreduplication, while breaks and gaps were frequent in the DEB-insensitive group. The DEB-sensitive group had 100% agreement with the Auerbach's simplified score and in the DEB-doubtful group Mitomycin-C should be considered as another clastogenic agent.

INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença com herança autossômica recessiva, caracterizada por anormalidades congênitas, principalmente esqueléticas, renais, cardíacas, alterações pigmentares da pele e por alta frequência (mais de 90%) de pancitopenia progressiva e aumento da predisposição ao desenvolvimento de neoplasias (AUERBACH, 1995). A frequência da doença foi estimada em 1:360.000 na população europeia e norte americana (GLUCKMAN, 1994). É raramente encontrada na raça negra. MACDOUGALL et al., (1990) descreveram 25 crianças africanas negras vistas em um período de 11 anos, e estimaram a prevalência de homocigoto nesta população em 1:476.000.

A AF é uma patologia caracterizada pelo aumento da fragilidade cromossômica à exposição de agentes mutagênicos, assim como a Ataxia Telangectasia, Síndrome de Bloom, Xeroderma Pigmentoso e Síndrome de Cockayne. Os sintomas iniciais decorrem geralmente da pancitopenia progressiva por hipoplasia medular, podendo haver evolução para aplasia grave, mielodisplasia (SMD) ou leucemia; raramente o indivíduo chega à vida adulta. Apesar da resposta inicial ao tratamento com andrógenos, o transplante de medula óssea (TMO) alogênico é o único tratamento efetivo. (AUERBACH et al.,1989; GLUCKMAN, 1994).

O diagnóstico laboratorial pode ser feito através da demonstração de quebras espontâneas de cromátides e cromossomos em preparações citogenéticas de linfócitos estimulados por fitohemaglutinina (PHA). O teste deve ser realizado também incubando-se linfócitos com agentes DNA “*crosslinks*” como mostarda nitrogenada (MN), mitomicina C (MMC), sendo o agente mais específico e recomendado pelo Instituto de Registro Internacional de Anemia de Fanconi (RIAF) o diepoxibutano (DEB). O teste deve ser comparado com o de um controle normal, submetido à mesma técnica. A leitura do teste deve ser padronizada, incluindo a leitura do número de alterações cromossômicas do tipo: quebras, falhas, fragmentos, figuras trirradiais e quadrirradiais. Entretanto, estes achados citogenéticos não são de fácil leitura e interpretação, devendo ser realizados em laboratórios com experiência no teste (AUERBACH, 1993; BERGER et al., 1993). Também foi demonstrado que a presença de determinadas alterações fenotípicas e hematológicas se associam à alta probabilidade de o teste com DEB ser positivo, conhecido como “escore clínico simplificado de Auerbach” (AUERBACH et al., 1989).

No complexo do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), são vários os Serviços que atendem a pacientes com suspeita clínica desta patologia. No entanto, em vista da heterogeneidade fenotípica da AF é necessária a confirmação através de um teste laboratorial.

O nosso interesse na padronização da técnica surgiu da observação de amostras de pacientes com suspeita de AF que apresentavam um número de quebras espontâneas e induzidas aparentemente menor que o descrito pela Dra Auerbach, nossa referência.

OBJETIVOS

Implantação da técnica de DEB e determinação do valor de referência em nosso laboratório, analisando:

- A frequência das variáveis (alterações cromossômicas) em cultura induzida e não induzida por DEB.
- A associação das diferentes variáveis (alterações cromossômicas) com o resultado do teste DEB positivo e DEB negativo.
- A porcentagem do teste de DEB positivo em populações definidas clinicamente.
- As variáveis hematológicas e os dados clínicos que se associam ao teste DEB positivo, bem como a conformidade com o escore clínico simplificado de Auerbach em nossa população

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A AF foi descrita em 1927 pelo pediatra suíço Guido Fanconi, que relatou o achado de três irmãos com idade entre cinco e sete anos que apresentavam anemia aplástica rapidamente fatal, malformações esqueléticas, retardo no crescimento, hipogonadismo, manchas hipopigmentadas e hiperpigmentadas no tronco. Em 1931 Naegeli sugeriu o termo “Anemia de Fanconi” para designar os pacientes com anemia aplástica familiar e malformações congênitas. (FANCONI, 1927 apud FANCONI 1967).

Em 1959, GARRIGA e CROSBY relataram um caso de leucemia como complicação fatal na AF e, em 1974, foi confirmado o aumento do risco de neoplasias nessa população. (LÉVY et al., 1974). Em 1964, SCHROEDER et al., descreveram a presença de quebras cromossômicas espontâneas na cultura de linfócitos dos pacientes com AF. Os mesmos autores em 1976, utilizando análise de segregação em 90 famílias com AF, estabeleceram o padrão autossômico recessivo de herança, e também sugeriram a existência de heterogeneidade genética. (SCHROEDER et al., 1976a).

A existência da consangüinidade dos pais foi observada como variante importante ao diagnóstico da AF, em 1978 (LI e POTTER, 1978).

Em 1981, AUERBACH et al. desenvolveram um teste citogenético para diagnóstico da AF usando o DEB na cultura de linfócitos com o intuito de aumentar o nível de quebras cromossômicas. Em 1989 essa mesma autora demonstrou que a hipersensibilidade aumentada ao efeito clastogênico do DEB poderia ser usado como indicador da AF. Em 1992, foram descritas anormalidades citogenéticas clonais como a monossomia do cromossomo 7 e a duplicação do braço longo do cromossomo 1 nas leucemias mielóides agudas (LMAs) secundárias à AF.

Em 1980 surgem os primeiros achados moleculares na investigação da AF, primeiramente demonstrando-se a existência de dois grupos de complementação (ZAKRZEWSKI e SPERLING, 1980). Posteriormente, foi confirmado a existência de oito grupos de complementação gênica na AF (JOENJE et al., 1997). STRATHDEE et al. (1992) realizaram a clonagem do gene do grupo de complementação C da AF (FANCC) e dois grupos diferentes de pesquisadores, APOSTOLOU et al. (1996) e LO TEN FOE et al. (1996) realizaram a clonagem do gene do grupo de complementação A da AF (FANCA). A partir de 1998 os estudos moleculares foram iniciados, caracterizando as mutações na AF.

2.2 ETIOPATOGENIA

A AF é uma doença de falha no reparo do DNA; as células destes pacientes apresentam uma tendência anormal ao aparecimento de alterações cromossômicas estruturais espontâneas, o que sugere deficiência do sistema reparador do DNA (SASAKI, 1975; SASAKI, 1980; BARTRAM, 1980; KIDSON, 1980). O uso de agentes clastogênicos potencializa a dificuldade no reparo do DNA (CLARKE, 1998).

Existem evidências de que as células de AF têm prejudicada a capacidade de remover ligações cruzadas (“crosslinks”) que ocorrem inter e intra filamentos de DNA, tese baseada em experimentos realizados com fibroblastos de AF submetidos à ação de MMC e/ou cisplatina (FUJIWARA et al, 1977; GRUENERT e CLEAVER, 1985; ARLETT, 1986; AVERBECK et al., 1988; HANSSON et al., 1991; ZHEN et al., 1993). A anormalidade no reparo do DNA parece ocorrer predominantemente no reparo por excisão que ocorre durante o período G2 (intervalo 2 da intérfase) e prófase do ciclo celular (PARSHAD et al, 1983).

Atualmente aceita-se que a ação dos agentes clastogênicos nessas células, decorre de uma ação bifuncional, ou seja, o agente alquilante parece ser o iniciador de uma seqüência de eventos que, associados a outros desencadeados também pelo agente, colaboram com a incapacidade de reparo do DNA. Os principais modelos formulados para a análise da

bifunção desse agente são baseados: na hipersensibilidade ao oxigênio em células de pacientes com AF, na desregulação do seu ciclo celular e em apoptose anormal.

A melhora na instabilidade cromossômica após a adição da catalase ou superóxido-desmutase às culturas celulares (NORDENSON, 1977) e a maior frequência de aberrações cromossômicas em altas tensões de oxigênio (JOENJE e OOSTRA, 1983 e 1986) são, entre outras, evidências da presença de um estado pró-oxidante na AF (SCHINDLER e HOEHN, 1988; DEGAN et al., 1995; EMERIT et al., 1995 e PAGANO et al., 1997).

RUPPITSCH et al. (1997) sugerem que ocorra alteração no metabolismo do oxigênio por produção aumentada de intermediários do oxigênio reativo (IOR), ou por eliminação diminuída dos IOR. Estes autores determinaram a capacidade de reparo das células AF tratadas com agentes que causam “crosslinks” no DNA, analisaram vários sistemas biológicos que estão envolvidos no metabolismo do oxigênio e sugeriram que defeitos enzimáticos no metabolismo do oxigênio mediam o fenótipo AF através de uma reatividade deteriorada com os IOR.

Entre os linfócitos normais, o ciclo celular varia em duração mas, para a maioria das células, é um pouco menor que vinte horas. Na AF, o ciclo celular é mais lento, sendo que a sua duração é aproximadamente duas vezes maior que o dos indivíduos normais (ELMORE e SWIFT, 1975;

DUTRILLAUX e FOSSE, 1976; WEKSBREG et al., 1979 e POOT et al., 1996), com prolongamento da fase G2. Estudos com citometria de fluxo demonstraram que células de AF tratadas com agentes alquilantes falham em se dividir, passam pela replicação do DNA e acumulam-se na fase G2/M (mitose) do ciclo celular (KAISER et al., 1982; SCHINDLER et al., 1985; MIGLIERINA et al., 1990 e MIGLIERINA et al., 1991). Não foi demonstrada alteração em proteínas que regulam o “checkpoint” do ciclo celular (HEINRICH et al., 1998). O ciclo celular lento associa-se ao aumento das anormalidades cromossômicas, as células mais lentas apresentando mais figuras radiais do que as células mais rápidas no mesmo paciente (DUTRILLAUX et al., 1982).

Como a apoptose provocada pela irradiação com raios gama está drasticamente reduzida na AF (ROSSELLI et al. 1995) e a apoptose provocada pela radiação é dependente da proteína p53, foi levantada a hipótese desta proteína ser importante na estabilidade genômica, na progressão do ciclo celular e na resposta celular ao dano e estar alterada na AF. Experimentos elegantes, utilizando transfecção em células AF do grupo de complementação C (FAC), mostraram que a expressão da proteína FAC normal libera a parada na fase G2 dependente da MMC e suprime a ativação do *TP53*. Entretanto, não se demonstrou que o gene *TP53* seja causador da iniciação da apoptose dependente de MMC (KRUYT et al. 1996 e KRUYT et al., 1997). Além disso, nenhuma diferença no nível de expressão do *BCL-2*, um inibidor da apoptose, foi notada entre as células AF e as não-AF tanto na ausência como na presença da MMC. Todos estes achados levaram os autores a inferir que a

proteína FAC pode funcionar em uma via da apoptose ainda a ser identificada, e que é independente do *TP53*. RIDET et al. (1997) mostraram que a alteração no controle da apoptose na AF está associada à via de ativação do Fas e mostraram também que a expressão do gene FAC normal (“wild-type”) corrige a sensibilidade aumentada à MMC, às anomalias na apoptose, e às alterações do ciclo celular nas células AF.

Em relação à predisposição a desenvolver aplasia medular e neoplasias, acredita-se que as células dos pacientes com AF, na tentativa de reparar danos ao genoma, acumulam aberrações que muito provavelmente contribuem para o risco aumentado de leucemia e mielodisplasia (PALLAVICINI, 1997). O aumento da atividade da telomerase, assim como a redução no comprimento do telômero em células mononucleares de pacientes com AF fizeram Li et al proporem um modelo para a AF. Defeitos genéticos levariam as células hematopoiéticas à morte pela apoptose; algumas células remanescentes proliferariam rapidamente, levando ao encurtamento do telômero e senescência. A ativação da telomerase seria um mecanismo compensatório para promover a hematopoese com diferenciação celular, mas seria insuficiente para manter o comprimento do telômero. Isto levaria à instabilidade genética e à emergência de clones leucêmicos (LI et al.,1997).

2.3 QUADRO CLÍNICO

2.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As primeiras descrições da AF na literatura se reportavam a pacientes com anemia aplástica e anormalidades físicas pouco específicas, encontradas também em outras patologias genéticas (DUCKWORTH-RYSIECKI et al., 1984; AUERBACH et al., 1989; ALTER, 1993).

Em estudo compreendendo mais de 800 casos de AF diagnosticados entre 1977 a 1991 observou que a idade média para diagnóstico foi de 7.9 anos, com relação masculino:feminino de 1.3/1. Observou-se que cerca de 13.8% dos pacientes não apresentavam anormalidades físicas ou estas eram muito discretas (paciente com aparência normal, assim como estatura baixa e/ou alterações na pele), sendo denominados de Anemia de Estren-Dameshek. Na realidade, foram observados dois grupos extremos de apresentação da AF: 19% dos casos com diagnóstico por volta dos 16 anos de idade; 5% dos pacientes referidos para tratamento de pressuposta anemia aplástica adquirida pelo NIH; 3% dos casos diagnosticados entre o nascimento e um ano de idade (muitos deles já com alteração hematológica) (National Institute of Health) eram portadores de AF (YOUNG e ALTER, 1994).

O grupo da Universidade de Rockefeller, estudando pacientes incluídos no RIAF, confirmou a heterogeneidade das manifestações clínicas destes pacientes, algumas vezes observadas em pacientes sem AF.

Anormalidades hematológicas e congênitas foram observadas em 39% dos pacientes referidos a este centro, 30% deles portadores apenas de aplasia medular e erroneamente diagnosticados como portadores de anemia aplástica adquirida (BUTTURINI et al., 1994). Assim observou-se que aproximadamente 1/3 dos pacientes com AF não apresentavam achados clássicos e cerca de 7% deles eram encaminhados com idade superior a 16 anos. Além disso, o fenótipo também se mostrava variável em pacientes da mesma família (CAVENAGH et al., 1996).

GIAMPIETRO et al. em 1993, constataram que 220/370 pacientes (60%) apresentavam malformações congênitas, algumas inclusive não descritas anteriormente (alterações cardíacas, genitais, gastrointestinais, de sistema nervoso central e várias anormalidades esqueléticas, incluindo alterações no polegar). Posteriormente, utilizando a presença ou não de alterações hematológicas, os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo I (159/220 - 43%) que apresentavam as duas alterações com predominância de anormalidades da pele (hipopigmentação) e alterações auriculares (surdez), grupo II (61/220 - 17%) sem alterações hematológicas e apresentando, com maior frequência, alterações esquelética, gastrointestinais e no Sistema Nervoso Central (SNC). Observou-se que aproximadamente 1/3 dos pacientes não apresentavam malformações congênitas e 20% deles apresentavam alterações congênitas menores. O diagnóstico nesses casos é tardio e é feito somente após apresentarem disfunção hematológica. Um outro trabalho complementar a este, em 1997,

mostrou que, na realidade, a presença de anormalidades congênitas ocorriam na AF, podendo ser estas descritas como alterações na altura, peso etc. (GIAMPIETRO et al., 1994 e GIAMPIETRO et al., 1997).

2.3.2 ANORMALIDADES CONGÊNITAS

O diagnóstico da AF entre outras doenças genéticas é difícil, pois as alterações esqueléticas e outras malformações presentes nessa doença são comuns também a outras patologias de caráter genético, como a Anemia de Blackfan-Diamond, Trombocitopenia com Ausência de Rádio (TAR) e as síndromes reportadas pelo Instituto Venezuelano de Investigações Científicas (IVIC), também denominadas de Síndrome Óculo-Oto-Radial. Estas evoluem também com anormalidades hematológicas. Outras síndromes como Holt-Oram, VATER e VACATERL (defeitos vertebrais, ânus imperfurado, fístula traqueoesofágica, displasia radial e renal, malformações cardíacas e de membros), também cursam com malformações semelhantes a AF, mas sem comprometimento hematológico (ALTER, 1992 ; POOLE et al., 1992).

O quadro clínico clássico da AF inclui baixa estatura, anormalidades nos polegares, microcefalia, manchas café-com-leite, hipopigmentação, face peculiar, que inclui alargamento de base do nariz, micrognatia, pregas de epicânto e alterações renais (FIGURAS 1A e 1B). Uma das características da AF que a difere de outras síndromes (como a TAR) é a concomitância de anormalidades do rádio e polegar (YOUNG e ALTER, 1994). (FIGURA 1)

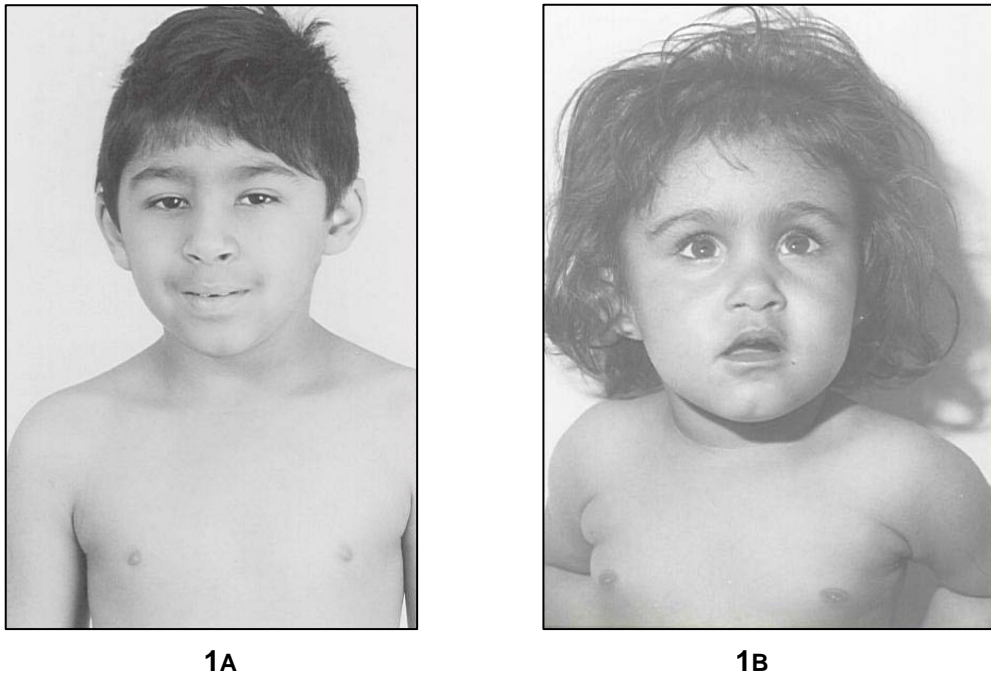


Figura 1. Crianças portadoras de AF.

1A: grupo controle positivo n° 30;

1B: grupo controle positivo n° 29, irmã do controle positivo n° 30.

Os achados clínicos que foram evidenciados nos portadores da AF são, em ordem de prevalência:

1. Alterações na pele do tipo manchas café com leite, hiperpigmentação ou hipopigmentação. A hiperpigmentação é comum, dando aspecto de pele bronzeada.
2. Alterações no crescimento (baixa estatura, atraso no desenvolvimento). Decorrem do déficit nutricional e da deficiência do hormônio do crescimento.
3. Alterações nos membros superiores (MMSS), polegar (ausência ou hipoplásico, supranumerário, sindactilia, bífido, rudimentar, curto,

implantação baixa, trifalangeal, tubular, inserção anormal, subluxado, hiperextensível), no rádio (ausência ou hipoplásico), nas mãos (clinodactilia, eminente hipoplasia tenar, supranumerário, ausência do 1^o metacarpo, dedos anormais ou curtos), na ulna (displasia). As anormalidades em membros superiores são muito características mas pode ser sutis, sendo observada apenas uma tênue hipoplasia tenar.

4. Alterações das gônadas masculinas (hipogenitália, criptorquidia, hipospadia, ausência ou atrofia de testículos, azospermia, fimose e uretra anormal, micropênis e desenvolvimento tardio ou retardado). Encontrada em 10% dos meninos.
5. Alterações das gônadas femininas (hipogenitália, útero bicornuado, formação anormal, aplasia de útero e vagina, atresia de ovário, útero, cérvix e vagina e alterações menstruais). São menos encontradas do que a alteração gonadal dos meninos, exceto pela alta freqüência de alterações menstruais.
6. Outras alterações esqueléticas na cabeça e face (microcefalia, hidrocefalia, micrognatia, face peculiar, face “passarinho”, cabeça achatada, bossa frontal, assimetria facial, face triangular, testa inclinada, escafocefalia, atresia das coanas, palato em ogiva, hipopigmentação do cabelo; no pescoço (curto, implantação baixa, escápula alada), na coluna (espinha bífida, torácica, lombar, cervical, sacral, escoliose, anormalidades vertebrais, anormalidades nas costelas, aplasia coccigeal, alteração na fusão vertebras, vértebra extra, no tórax, assimetria, pectus excavatum).

-
7. Alterações oculares (microftalmia, olhos próximos, estrabismo, pregas epicêntricas, hipertelorismo, ptose, catarata, astigmatismo, cegueira, epífora, nistagmo, proptose e íris pequena).
 8. Alterações auriculares (surdez, forma anormal, atresia, displasia, implantação baixa, grande ou pequena, infecções múltiplas, ouvido médio anormal, ausência de conduto, rotação e estenose de canal).
 9. Alterações renais (rim ectópico ou pélvico, anormal, em forma de ferradura, hipoplástico ou displástico, ausente, hidronefrose ou hidroureter, sistema duplo de coleta, infecção, duplicado, invertido, refluxo, hiperplasia, não funcional e com artéria anormal). A maior parte dos problemas renais é estrutural, podendo ocorrer problemas funcionais decorrentes de infecção e refluxo.
 10. Alterações gastro-intestinais (palato ogival, atresia duodeno, esôfago e jejuno, fístula tráqueo-esofageal, úvula, hipoplásica e megacólon).
 11. Alterações nos membros inferiores (MMII) (pé chato, dedos supranumerário, fêmur anormal e alterações nas pernas).
 12. Alterações cardiopulmonares (persistência de ducto arterioso, defeito em septo ventricular, anormal, estenose pulmonar, estenose da aorta, coartação, ausência de lobo pulmonar, malformação vascular, ateroma aórtico, defeito em septo atrial, tetralogia de Fallot, pseudotronco, hipoplasia da aorta, drenagem pulmonar anormal, arco aórtico duplo, miopatia cardíaca, prolapso de válvula mitral, "situs inversus" e subclávia esquerda anormal) (YOUNG e ALTER, 1994; FAIVRE et al., 2000).

2.3.3 ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS E NEOPLASIAS

A mediana de sobrevida dos pacientes com AF é de 15 anos (AUERBACH, 1992), sendo as causas de óbito decorrentes das complicações de anemia aplástica grave e, menos freqüentemente, da evolução para Síndrome Mielodisplástica (SMD), leucemia aguda (LA) ou outras neoplasias malignas (AUERBACH e ALLEN, 1991; ALTER et al., 1993).

Alterações hematológicas como plaquetopenia, anemia, leucopenia e leucemia foram observadas em respectivamente 80%, 72%, 66% e 4% dos pacientes encaminhados para diagnóstico, sendo observadas em pacientes com mediana de idade de 7 anos (AUERBACH et al., 1989; BUTTURINI et al., 1994). Cerca de 85% dos pacientes se apresentam com anormalidades do sangue periférico decorrentes, geralmente, de hipoplasia medular (BUTTURINI et al., 1994).

A incidência de neoplasias está bastante aumentada nos portadores de AF, havendo controvérsias sobre portadores heterozigotos; alguns autores relatam que estes apresentam risco de 3.4 vezes maior para o desenvolvimento de neoplasias em comparação à população geral. (SWIFT, 1971; SWIFT et al., 1974; HILL, 1976; SWIFT et al., 1980; POTTER et al., 1983). Várias anormalidades citogenéticas clonais são descritas na evolução para SMD e LMA nos pacientes com AF. Em 10% dos casos, os achados citogenéticos clássicos não aleatórios são o envolvimento dos telômeros.

Cerca de 15% dos pacientes portadores de AF desenvolvem LMA (10%) ou SMD (5%) (AUERBACH, 1992). A LMA tem evolução clínica ruim, sendo observada com alterações citogenéticas clonais como 5/del(5q), e -7/del(7q) e a duplicação do braço longo do cromossomo 1 (STIVRINS et al., 1984; ALTER, 1996; CAVENAGH et al., 1996).

Outros tumores malignos de diferentes órgãos têm sido descritos predominando os localizados em fígado (5%), pele, trato gastrointestinal e urogenitais; geralmente são carcinomas de células escamosas que ocorrem em pacientes mais velhos, em torno de 23 anos (ALTER, 1996).

2.3.4 VARIANTES CLÍNICAS DA AF

A Anemia de Fanconi do tipo Estren-Dameshek (AFED) é uma variante de AF que se apresenta sem ou com discretas malformações congênitas. ALIMENA et al. (1983) relataram o estudo citogenético com DEB dos genitores de um paciente portador de hipoplasia e falecido por LMA. Analisando o resultado da cultura sem e com o indutor, revelou-se um aumento dos índices de quebras cromossômicas. Conclui-se que se tratava provavelmente da existência de uma heterozigose nos pais do afetado, e o paciente seria portador de AFED.

A Anemia de Fanconi forma variante foi descrita por DOSIK et al. (1979). Foi observada em duas irmãs com pancitopenia e aumento de células tetraplóides (endorreduplicações) em cultura do sangue periférico

estimulada com agente mitógeno, havendo também a expressão do antígeno viral SV-40. Em 1977, LUBINIECK et al. mostraram um grande estudo, envolvendo 76 voluntários sadios, o significativo aumento desse antígeno em pacientes com AF.

2.4 PERFIL GENÉTICO

2.4.1 HERANÇA E MEIO AMBIENTE

A freqüência de portadores heterozigotos foi estimada entre 1:200 a 1:300 nos Estados Unidos, Europa e Japão. (SWIFT, 1971). A prevalência de indivíduos homozigotos na comunidade de descendentes de holandeses na África do Sul, foi estimada em 1:22.000 nascimentos, com a freqüência de heterozigotos sendo de aproximadamente 1:77, e atribuíram esta alta freqüência incomum do gene nesta população a um efeito fundador. (ROSENDORFF e BERNSTEIN, 1988).

A AF é uma doença com herança autossômica recessiva e monogênica, confirmada através da análise de segregação realizada em 90 famílias por SCHROEDER et al. (1976a) e de 88 pacientes do RIAF realizada por ROGATKO e AUERBACH (1988).

Em estudo de 21 famílias de diferentes países europeus e de 69 famílias relatadas na literatura, SCHROEDER et al. (1976b) observaram baixa

correlação intrafamiliar em relação à idade de início dos sintomas e ao número e gravidade das malformações, indicando heterogeneidade genética.

Segundo ALTER (1993) existe considerável variação fenotípica dentro de uma mesma família e entre famílias diferentes, sugerindo que o ambiente, tanto externo quanto interno (outros genes), pode ser importante.

DE VROEDE et al. (1982) observaram início simultâneo da pancitopenia em um irmão e uma irmã afetados com AF, com cinco anos de diferença de idade cronológica no momento do início dos sintomas, sugerindo uma possível exposição a um agente externo comum. Por outro lado, existem também relatos de irmãos com AF que desenvolveram a anemia aplástica na mesma idade (SCHROEDER et al., 1976a; JONES, 1976). Vários pacientes com AF desenvolveram a anemia aplástica logo após doenças virais, micoplasma, hepatite ou tuberculose primária (CASSIMOS e ZANNOS, 1952; BEARD et al., 1973; JONES, 1976 e DE VROEDE et al., 1982), e outros logo após o tratamento com cloranfenicol (SKIKNE et al., 1978; VOSS et al., 1981; ROMERO e ORTIZ, 1984).

2.4.2 SÍNDROMES DE INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

A AF é há muito tempo considerada uma das síndromes com instabilidade cromossômica (LOVISETTO et al., 1977; GERMAN, 1980). As síndromes com instabilidade cromossômica são assim chamadas por apresentarem um aumento das quebras cromossômicas ou um aumento do

número de trocas entre cromátides irmãs (TCI), ou um aumento em ambas (GERMAIN e BERNHEIM, 1982). As outras doenças comumente associadas com uma alta frequência de quebras cromossômicas são: Ataxia Telangiectasia (Síndrome de Louis-Bar), a Síndrome de Bloom, o Xeroderma Pigmentoso, a Síndrome de Cockayne, o câncer de Cólon sem Polipose Hereditário (HNPCC), a Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1, e a Síndrome de Nijmegen. (SCHROEDER, 1982; MEYN, 1993; HOJO et al., 1995; TOMASSETTI et al., 1995; D'ANDREA e GROMPE, 1997; VARON et al., 1998) (TABELA 1).

TABELA 1 - Doenças caracterizadas por instabilidade genômica e associadas a risco elevado de desenvolvimento de neoplasias (PASQUINI, 2000)

DOENÇA	SENSIBILIDADE	NEOPLASIA POTENCIAL	FUNÇÃO DO GENE AFETADO
Anemia de Fanconi	Agentes clastogênicos	LMA, Tumores hepáticos, gastrointestinais e ginecológicos	Desconhecida
Xeroderma pigmentoso	Luz ultra violeta	Carcinoma de células escamosas	Reparo na excisão
Ataxia-teleangiectasia	Radiação ionizante	Linfoma	Via aferente para p53
Síndrome de Bloom	Agentes alquilantes	Leucemia linfóide aguda	Regulação do ciclo celular
Síndrome de Cockayne	Luz ultra violeta	Carcinoma basocelular	Reparo da transcrição acoplada
HNPCC	Desconhecido	Adenocarcinoma de cólon e câncer de ovário	Reparo de DNA incompatível

2.4.3 AGENTES CLASTOGÊNICOS

Todos os agentes que promovem a quebra do DNA das células dos portadores da AF são referidos como agentes clastogênicos (o grego “*Klastos*” que significa quebrar).

Todos os compostos alquilantes utilizados no diagnóstico laboratorial da AF são clastogênicos, entretanto, nem todos clastogênicos pertencem à categoria dos alquilantes, conforme listados na Tabela 2.

TABELA 2 - Agentes químicos que induzem a quebra celular na AF (YOUNG e; ALLEN, 1994).

AGENTE QUÍMICO	CATEGORIA
Tetrametansulfonil-d-mannit	Agente alquilante
Radiação	
Radiação ultra violeta	
8-MOP/UVA	“crosslink” interfilamentos
Cafeína	Antimetabólico
Mitomicina C (MMC)	Alquilante Bifuncional, reativo com radicais de oxigênio
Irradiação gama	
Diepoxibutano (DEB)	Alquilante, mutagênico e carcinogênico
Mostarda nitrogenada (MN) (mecloretamina HCl)	Alquilante Bifuncional
Cisplatina	“crosslink” interfilamentos
Metabólicos da Ciclofosfamida	Antimetabólitos
Ciclofosfamida	
Ácido Cis-retinóico	

Os agentes alquilantes foram pela primeira vez utilizados em cultura de linfócitos de portadores da AF em 1969 por SCHULER et al. O grupo alquil designa em termos gerais um grupo de átomos de carbono e hidrogênio covalentemente ligados, como os grupos metil (-CH₃) ou etil (-CH₂CH₃); esses grupos podem ser formados pela remoção de um átomo de hidrogênio de um alcano. Os agentes alquilantes são extremamente reativos e ligam-se facilmente a grupos fosfatos, aminos, hidroxilas e imidazólicos, que são encontrados nos ácidos nucleicos. A alquilação do DNA pode produzir pontes entre grupos adjacentes à hélice (inter e intra DNA), resultando em quebra da cadeia, depurinação ou erros de codificação das seqüências gênicas, ocasionando portanto, a quebra da cadeia do DNA e conseqüentemente, a morte da célula (citotoxicidade) (DAGLI, 1996).

O Diepoxibutano, conhecido como algumas sinonímias, Butadiene Diepoxide; Butadiene Dioxide; 2,2'-Bioxirane; 1,2:3,4-Diepoxabutane; 3,4-diepoxabutane; Erythritol anhydride; Bioxirane; 1,3-Butadiene diepoxide, é um agente clastogênico da categoria dos alquilantes, formado por quatro átomos de carbono, seis de hidrogênio e dois de oxigênio (C₄H₆O₂).

Trata-se de um agente carcinogênico líquido e incolor, com 97% de pureza e densidade de 1.113g/mL, principalmente absorvido pela pele ou inalado quando manipulado. Deve ser manipulado em fluxo laminar vertical, com luvas de borracha e demais equipamentos de proteção individual

(EPIs), pelo menos até a primeira parte do procedimento, ou seja, até a fixação do material em ácido acético e metanol.

Todo o material que esteve em contato com o DEB deve ser colocado imediatamente em uma solução de ácido clorídrico a seis molar (HCl-6M) por 48 horas (AUERBACH, et al., 1989).

O National Occupational Exposure Survey (1981-1983) e o National Occupational Hazard Survey (NIOSH de 1972 a 1974) não têm nenhuma estimativa de possível exposição de trabalhadores a esta substância química. Entretanto, de acordo com a legislação americana vigente, esse reagente é liberado somente para pesquisas e trabalhos experimentais, desde 1978. É regulamentado pelo Resource Conservation and Recovery Act (RCRA), Comprehensive Environmental Response, Compensation, e Liability Act (CERCLA), Superfund Amendments e Reauthorization Act (SARA), e Toxic Substances Control Act (TSCA) (http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/8_RoC/RAC/Diepoxybutane.html).

2.5 TESTES CITOGENÉTICOS PARA AF

2.5.1 NÃO INDUZIDO

GIRAUD et al. (1976) mostraram que pacientes sem AF apresentam aumento na frequência de quebras espontâneas cromossômicas sem correspondência fenotípica e, para definir essa situação, usam a expressão

“fragilidade cromossômica constitucional”. Observou-se que os sítios dessas quebras em indivíduos normais, apesar de não ocorrerem ao acaso, também não são as mesmas encontradas nos pacientes com AF (TABELA 3).

TABELA 3 - Resumo comparando os diversos estudos não induzidos em pacientes com AF e em indivíduos sem alteração hematológica e com cariótipo normal

TIPOS de indivíduos	REGIÕES COM EXCESSO DE QUEBRAS	QUEBRAS COM RELAÇÃO AS BANDAS	QUEBRAS EM RELAÇÃO AO CENTRÔMERO	QUEBRAS COM RELAÇÃO AO BANDAMENTO
NÃO PORTADORES DE AF*	3p1, 7q1, 7q3, 9p1, 14q1, 14q3, 16q2 e Xq2	3p14, 7q35, 9q11, 14q13 e 16q23	Teloméricas, centromérica e mediana	bandas R claras ou G escuras (A=T)
PORTADORES DE AF	1p22, 3q27, 6p12 e 13q32	1p36, 1p22, 1q21, 3p14 e 3q21	Teloméricas	bandas R escuras ou G claras (C≡G)

* Indivíduos sem alteração hematológica e com cariótipo normal

Vários são os trabalhos que relatam a presença de quebras cromossômicas espontâneas em indivíduos com cariótipos normais, e que não apresentam nenhuma alteração hematológica, levando a evidências de que esse método isoladamente não pode ser utilizado para o diagnóstico da AF (AYME, et al., 1976; FUNDIA et al. 1994).

2.5.2 INDUZIDO

O primeiro agente alquilante testado em células de portadores de AF foi o 1-2-5-6-tetrametansulfonil-d-mannit (R-52), sendo evidenciadas as peculiaridades cromossômicas “in vitro” descritas na AF (SCHULER et al., 1969).

GEBHART et al. (1985), realizaram análise citogenética com diferentes agentes clastogênicos na amostra de sangue periférico de dois irmãos portadores de AF, seus pais e em amostras controle. Concluíram que o uso desses agentes clastogênicos [substância ionizante, 4-nitroquinolina-1-óxido (NQO) e o DEB] não era somente um bom método para assegurar o diagnóstico da AF nos casos com baixo número de quebras espontâneas, mas também para definir os indivíduos heterozigotos.

A hipersensibilidade das células da AF ao efeito dos agentes clastogênicos é o único marcador para o diagnóstico citogenético desta patologia. Numerosos estudos foram realizados nos últimos 24 anos com diversos agentes clastogênicos na avaliação desta hipersensibilidade. Os agentes clastogênicos mais utilizados para o diagnóstico da AF foram: MMC, MN, bleomicina (BLM) e o DEB. Trabalho utilizando linhagens celulares de AF mostraram diferentes respostas citogenéticas a estes agentes, sendo o mais eficaz o DEB (COHEN et al., 1982).

O estudo realizado por AUERBACH et al. (1989) com 328 amostras de sangue periférico de pacientes considerados prováveis portadores da AF, registrados no RIAF, revelou importantes achados e considerações à aplicação do estudo citogenético na AF pelo método de indução das quebras com o agente DEB. Mostrou que a hipersensibilidade que os pacientes com AF apresentam ao efeito clastogênico do DEB é um fator discriminante para o diagnóstico. Para a validação do método com DEB, muitos foram os trabalhos reportados pelo RIAF. Muitas evidências mostraram que pacientes irmãos de AF, sem malformação congênita, mas com DEB positivo desenvolveram anormalidades hematológicas e nenhum irmão de afetado, com DEB negativo desenvolveu essas anormalidades. Demonstraram assim, ter o teste de DEB alto valor preditivo (99%) no desenvolvimento das anomalias hematológicas, indicando ter esta um baixo valor de resultados falso positivo e falso negativo (AUERBACH, 1993). Este teste, entretanto, é controverso no diagnóstico da AF heterozigoto (AUERBACH e WOLMAN, 1978; GEBHART et al, 1985; ROSENDORF e BERNSTEIN, 1988)

Em relação a MMC, este foi um dos primeiros agentes utilizados nos diversos laboratórios. Comparando a indução cromossômica pelo DEB e MMC, SCHROEDER-KURTH et al. em 1979 (apud AUERBACH, 1993) mostraram que, em pelo menos 25% dos casos induzidos pela MMC, não foi evidenciada variação significativa do número de quebras por células entre os pacientes com AF e sem AF. Concluíram que a sensibilidade a MMC não é um critério para o diagnóstico da AF. Em linhagens celulares, a alta

concentração de MMC foi capaz de induzir um alto índice de quebra em AF e AF heterozigotos (COHEN et al, 1982).

2.6 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE DEB

2.6.1 CONCENTRAÇÃO DO DEB











Em trabalho da Dra Auerbach, foram testadas duas concentrações diferentes de DEB: 0,01ug/ml e 0,1ug/ml. Em alta concentração há aumento na freqüência de rearranjos complexos, envolvendo três, quatro ou mais cromossomos (figuras trirradiais e quadrirradiais) e pequeno efeito clastogênico em células de indivíduos normais (AUERBACH et al., 1981). Portanto a concentração final comumente utilizada é 0,1µg/ml, adicionados na cultura induzida ou tratada, após 24 horas de incubação (37⁰C, 5% CO₂ e umidade relativa de 87%). O efeito mitótico, usualmente, não é inibido com essa concentração de DEB. As células ficam expostas a essa concentração por 48 horas, quando então, prossegue-se com o protocolo padrão para obtenção dos cromossomos metafásicos (AUERBACH et al, 1989). O tempo de exposição ao DEB de 48h, provou ser melhor do que o de 24h, levando no mínimo ao aumento de duas vezes a freqüência das aberrações cromossômicas (GEBHART et al, 1985).

2.6.2 LEITURA DO TESTE

De acordo com os achados citogenéticos citados abaixo, é dado um valor para cada alteração cromossômica. A maior parte dos trabalhos citam o escore da pesquisadora Auerbach, onde é dado um índice de quebras cromossômicas pelo total de células avaliadas, porcentagem de aberrações por células e índice de quebras por células anormais. Neste trabalho o primeiro índice parece ser o ideal e por isso mais comumente adotado.

O índice é calculado com a somatória dos valores matemáticos atribuídos a cada alteração e dividindo-se esse, pelo total de células avaliadas. A presença das falhas cromossômicas ou de cromátides não são computadas, mas as quebras cromatídicas, as quebras e fragmentos cromossômicos, devem ser considerados como um evento cada um. Os cromossomos dicêntricos, em anel, rearranjos e figuras radiais são considerados como dois eventos cada um (SCHROEDER et al, 1976b; COHEN et al, 1982; DUCKWORTH-RYSIECKI et al, 1984) (TABELA 4).

TABELA 4 - Representação das variantes cromossômicas

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Variantes cromossômicas										
Pontuações	2	2	1	0	1	0	1	2	2	2

(A): cromossomo em anel; (B): dicêntrico; (C): fragmentos; (D): falha de cromátide; (E): quebras de cromátides; (F): falha de cromossomo; (G): quebra de cromossomo; (H): figura triradial; (I): figura quadriradial e (J): rearranjo. Coloração Giemsa.

2.6.3 TIPOS DE ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS ENCONTRADAS NA AF

2.6.3.1 FRATURAS E FRAGMENTOS

As fraturas cromossômicas podem ser espontâneas ou induzidas por agentes mutagênicos. Contrariamente ao que ocorre com as extremidades normais (livres) dos cromossomos, os fragmentos tendem a se unir, visando reparar a fratura.

Das fraturas podem resultar:

Deleção: perda de um segmento cromossômico, podendo ser terminal ou intersticial na presença de uma ou duas fraturas no mesmo cromossomo, respectivamente.

Translocação: quando ocorre reordenamento de mais de uma fratura na mesma célula.

Fragmentos cêntricos: segmentos cromossômicos com centrômero, também denominados de cromossomos marcadores.

Cromossomos dicêntricos: resultado da junção telomérica de dois seguimentos cromossômicos cêntricos.

Cromossomo em anel: quando ocorre união das extremidades do fragmento cêntrico.

Cromossomos diminutos: segmento cromossômico intersticial que não reúne suas extremidades, podendo se manter ao longo de várias metáfases.

De acordo com a fase do ciclo celular onde ocorre a fratura, pode ocorrer a formação de quebra de cromossomo (quando esta é durante a fase G1: intervalo 1 da intérfase e se perpetua até a fase S: fase de síntese da

intérfase) ou a formação de quebra de cromátide (durante a fase G2) então, as quebras de cromátides resultam de danos após a replicação do DNA (AYME et al., 1976; THERMAN e SUSMAN, 1996; MUSTACCHI e PERES, 2000).

2.6.3.2 FIGURAS RADIAIS

São configurações que resultam na tentativa de reparo de fraturas. Quando ocorrem entre cromossomos, dão origem às figuras quadrirradiais. As configurações quadrirradiais podem ser de dois tipos, dependendo da posição do centrômero: simétricas (equilibrada) ou assimétricas (não equilibradas) (FIGURA 2). As configurações cromossômicas trirradiais são formas mais raras. Existem três mecanismos diferentes sobre a origem dos cromossomos trirradiais: endoreduplicação parcial (quando somente um segmento cromossômico se replica duas vezes), um fragmento de cromátide permanece associado à sua cromátide irmã na anáfase, um cromossomo fraturado se insere em um intervalo formado por uma fratura de cromátide. O ponto de ramificação de um trirradial é com frequência, um sítio frágil. (THERMAN e SUSMAN, 1996).

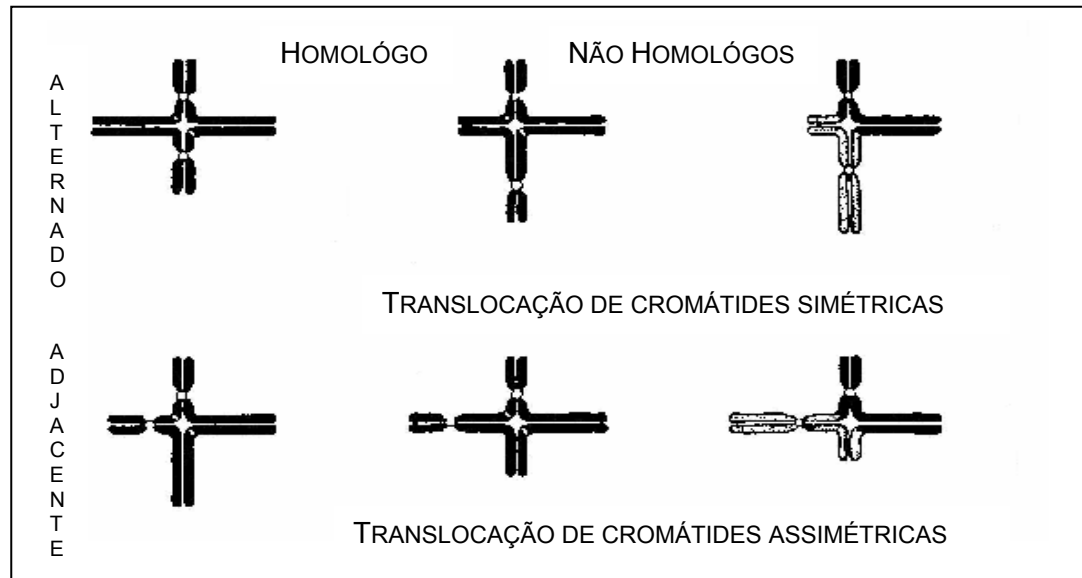


Figura 2. Tipos de figuras quadrirradiais. Classificação das configurações quadrirradiais segundo Therman e Kuhn, 1976. Nos cromossomos homólogos as fraturas ocorrem no mesmo local em cada cromossomo. Em contrapartida, em cromossomos não homólogos, ocorrem em pontos diferentes.

2.6.3.3 ENDORREDUPLICAÇÃO

É decorrente da lentidão do ciclo celular em G2, gerando figuras com duplicação dos pares cromossômicos que não se separam. É um achado que deve ser pesquisado ao microscópio em objetiva de menor aumento (THERMAN e SUSMAN, 1996), sendo freqüente na AF variante (DOSIK et al., 1979) (FIGURA 3).



Figura 3. Metáfase em endorreduplicação (endorreduplicação observada em caso estudado n°57).

2.6.4 ESCORE DO TESTE DE DEB

A Dra Auerbach estudou três diferentes parâmetros de cálculo para leitura do teste de DEB (AUERBACH et al., 1981; AUERBACH et al., 1989). Foram eles:

Cálculo do índice de quebras por células totais: somatória das pontuações das anormalidades em várias metáfases dividido pelo número das metáfases analisadas.

Cálculo do índice de quebras por células anormais: somatória das pontuações das anormalidades em várias metáfases dividido pelo número das metáfases com anormalidades.

Cálculo da porcentagem do número de células com aberrações:

porcentagem do número de metáfases com anormalidades dividido pelo número de metáfases analisadas.

Os valores dos três parâmetros analisados em culturas induzidas de SP, para os portadores da AF e não AF estão mostrados na TABELA 5.

TABELA 5 - Valores de referência padronizados por Auerbach* para o teste de DEB

PARÂMETROS	GRUPOS	ESCORE MÍN	ESCORE MÁX
Quebras por células	AF +	1.30	23.90
	AF(-)	0.00	0.36
Quebras por células com aberrações	AF +	3.60	24.90
	AF(-)	0.00	6.00
Porcentagem de células com quebras	AF +	12.60	100.0
	AF(-)	0.00	22.00

* Pesquisadora que padronizou o teste de DEB para AF.

Aplicando o mesmo método de leitura para amostras de líquido amniótico, notou-se que o valor do índice de quebra por células é inferior (0.08) ao do SP, sendo este teste útil no diagnóstico pré-natal (AUERBACH et al., 1981).

2.7 CORRELAÇÃO DO TESTE DE DEB COM A CLÍNICA

Segundo trabalho da Dra Auerbach foi possível calcular a probabilidade de o teste de DEB ser positivo, a partir de oito parâmetros (sete clínicos e um hematológico). Foi dado um ponto para seis variáveis (retardo no crescimento, marcas de nascimento, anomalias renal e urinária,

microftalmia, anomalias no rádio e polegar e trombocitopenia) e subtraído um ponto para outras duas variáveis (dificuldade no aprendizado e outras anomalias esqueléticas que não de rádio e polegar). Esta relação é conhecida como “escore clínico simplificado de Auerbach” (ESA), variando de -2 a 6. (TABELA 6)

TABELA 6 - Probabilidade (P) do teste de DEB ser positivo de acordo com o escore obtido (AUERBACH et al., 1989)

Escore Simplificado	AF¹ (n)	Não AF² (n)	P³
-1	0	5	0.00
0	5	20	0.20
1	27	59	0.31
2	53	18	0.75
3	59	5	0.92
4+	58	1	0.98
TOTAL	202	108	

1: pacientes com manifestações clínicas de AF segundo RIAF; **2:** pacientes sem manifestações clínicas de AF segundo RIAF; **3:** coeficiente da probabilidade de o teste de DEB ser positivo.

2.8 CORRELAÇÃO DO TESTE DE DEB COM O CICLO CELULAR

Existe boa correlação entre o teste de DEB e a avaliação de ciclo celular pela citometria de fluxo, que demonstra aumento no compartimento G₂/M do ciclo celular. Entretanto, falso-negativos têm sido observados na citometria quando existe evolução para SMD ou LMA em portadores de AF

(LATT et al., 1982; SCHINDLER et al., 1985; BERGER et al., 1993; SEYSCHAB et al., 1995) (FIGURA 4).

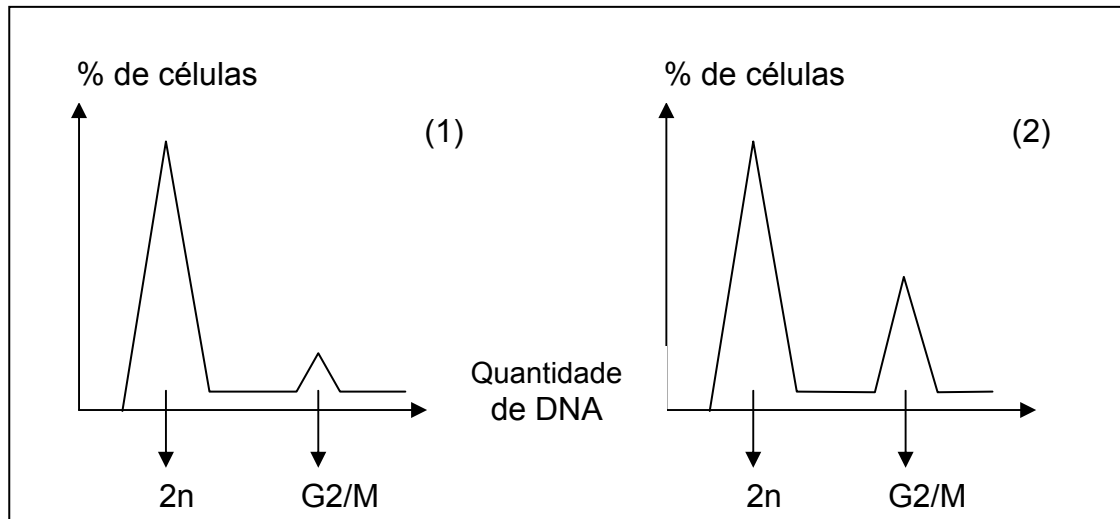


Figura 4. Modelo de histograma em indivíduos normais e portadores da AF. Efeito de agente clastogênico no ciclo celular de linfócitos do sangue periférico após cultura com PHA. (1) Histograma de ciclo celular em células de indivíduos normais; (2) Histograma em células de AF representando o pico diplóide (2n) e o prolongamento da fase G2/M. Gráficos representativos do índice de DNA avaliado por citometria de fluxo (quantidade do DNA pela porcentagem de células).

A utilização do teste de DEB para pesquisa de quebras cromossômicas, particularmente em pacientes com mosaïcismo, pode apresentar resultados falso-negativos; tem-se documentado pacientes com fenótipo clínico da AF e que não expressam quebras cromossômicas. Portanto, um teste de DEB negativo em pacientes com fenótipo de AF não descarta este diagnóstico (SCHINDLER et al., 1985). As células dos portadores heterozigotos geralmente não apresentam sensibilidade a agente clastogênicos (D'ANDREA; GROMPE, 1997). Um considerável progresso no

campo da pesquisa molecular da AF vem contribuindo de forma efetiva no diagnóstico de AF nesses casos.

Além disso, através de testes moleculares, usando a amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), foram identificados oito diferentes grupos de complementação (correção) gênica: de A a H, sendo os grupos A e C os mais freqüentes (JOENGE et al., 1997).

Vários casos de AF da Europa e da América do Norte parecem pertencer ao grupo de complementação A. No Brasil não se conhece a freqüência da AF. O FANCA, localizado no cromossomo 16q24.3, é responsável por cerca de 65% dos casos da doença nas populações caucasóides já estudadas. Um trabalho recente da Universidade Federal do Paraná, com 30 indivíduos com diagnóstico clínico inicial da AF, identificou por métodos moleculares [PCR e SSCP (Polimorfismo de Conformação do Filamento Único)] 37 variantes do FANCA, constituídas por 13 mutações idiomórficas em 60% (18/30) e 24 mutações polimórficas em 30% (9/30). O teste do Sistema de Mutação Refratária à Amplificação (ARMS) identificou que o haplótipo A,G,T,T,G,G,C,T foi comum em todos os casos com a mutação idiomórfica 3788-3790del no FANCA. Este fato indica um provável efeito fundador para esta mutação na população brasileira (MAGDALENA, 1999).

O FANCC está localizado no braço curto do cromossomo 9 região 22.3. Possui 1674 pb codificantes, divididas em 14 exons (STRATHDEE et al., 1992). O gene codifica uma proteína de cerca de 63.000 daltons e 558 aminoácidos (FAC proteína). Estudos recentes têm observado que apenas uma pequena porção desta proteína (10-20%) localiza-se no núcleo de algumas células (HOATLIN et al., 1998); o restante dessa proteína encontra-se solúvel no citoplasma celular, colocando em dúvida a sua participação direta no reparo do DNA (KUPFER e D'ANDREA, 1996).

Mutações no FANCC acometem aproximadamente 15% dos casos de AF diagnosticados. Em análise de 174 famílias catalogadas pelo RIAF, identificaram-se 8 diferentes variantes em 32 famílias. As mais freqüentes (90%) foram a del G322 e a IVS4 + 4A→T (VERLANDER et al., 1994). A mutação del G322 resulta em um fenótipo leve da AF, usualmente sem malformações congênitas; já a mutação IVS4+4A→T resulta num quadro grave de AF com malformações congênitas graves (YAMASHITA et al., 1996; GIAMPIETRO et al., 1997).

CASUÍSTICA E MÉTODOS

De 228 amostras de SP encaminhadas ao laboratório para a realização do teste citogenético com DEB, de março de 1997 a fevereiro de 2002, 120 foram analisadas pelo mesmo protocolo laboratorial, sendo incluídos 28 controles negativos, totalizando 148 amostras.

3.1 CASUÍSTICA

A grande maioria dos pacientes encaminhados para estudo de cariótipo com pesquisa de instabilidade cromossômica com DEB eram provenientes do Instituto da Criança (ICR), Serviço de Hematologia da Divisão de Clínica Médica e pacientes do Ambulatório de Transplante de Medula Óssea (ATMO) do HCFMUSP. Algumas amostras procederam de outros hospitais da região de São Paulo e algumas de outros estados. A análise retrospectiva dos prontuários médicos foi realizada no ano de 2002 por dois hematologistas, sendo esta possível em 72 casos. Os pacientes foram classificados em grupos: AF, alteração fenotípica (fen), anemia aplástica constitucional (AAC), anemia aplástica adquirida (AAA), irmãos de AF (iAF) e pacientes com outros diagnósticos hematológicos (OUTROS).

A casuística foi dividida em oito grupos, segundo os critérios:

Grupo 1: Controle negativo (CN) constituído por 26 doadores de sangue da Fundação Pró Sangue Hemocentro de São Paulo (FPSHSP) e duas crianças acompanhadas no ambulatório de hemofilia do Serviço de Hematologia do HCFMUSP. Esse grupo foi definido como grupo controle negativo do ensaio.

Grupo 2: Controle positivo (CP) constituído por 17 pacientes que apresentavam um diagnóstico clínico inicial de AF, confirmado por alterações clínicas e hematológicas consistentes com essa patologia.

Grupo 3: Alteração fenotípica (fen) constituído por oito pacientes que apresentavam alteração fenotípica, porém duvidosa frente ao diagnóstico diferencial com AF.

Grupo 4: Anemia aplástica constitucional (AAC) constituído por 10 pacientes que apresentavam diagnósticos clínicos iniciais de AAC, ou seja, aplasia medular acompanhada por alguma alteração fenotípica.

Grupo 5: Anemia aplástica adquirida (AAA) constituído por 31 pacientes que apresentavam diagnósticos clínicos iniciais de AAA, ou seja, aplasia medular sem alteração fenotípica, independente da idade de apresentação da aplasia.

Grupo 6: Irmãos de AF (iAF) constituído por 13 pacientes irmãos portadores da Anemia de Fanconi.

Grupo 7: Outros diagnósticos hematológicos (OUTROS) constituído por cinco pacientes com diagnósticos diversos, como Aplasia Pura de Série Vermelha (APSV), Anemia Diseritropoiética (AD), SMD, Pancitopenia e Disqueratose Congênita (DC).

Grupo 8: Sem caracterização (SC) constituído por 36 pacientes cujo diagnóstico não pôde ser confirmado devido à ausência do prontuário para revisão. O teste para pesquisa da instabilidade cromossômica foi solicitado, geralmente, pela presença de citopenias e/ou alteração fenotípica.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL PARA ESTUDO DO CARIÓTIPO

As amostras de sangue periférico (10mL) foram obtidas por punção venosa (seringa plástica descartável estéril, B.D., Becton, Dickison, PR, Brasil) e heparinizada. O material foi submetido à sedimentação mecânica por centrifugação 330 rpm, por 15 minutos e processou-se a cultura celular em fluxo laminar horizontal (Holten, Lanin Air, HB2448K, Germany).

3.2.2 PREPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS

Cultura celular: Foram realizadas quatro culturas de cada amostra sendo, duas com o indutor de quebras e duas sem o indutor (DEB) (Aldrich – Milwaukee, USA). Cada frasco (Falcon-Becton Dickison NJ, USA) foi identificado conforme modelo abaixo:

CITOGENÉTICA
Nº de Ordem: _____ / ano.
Tipo de cultura: Com DEB
Dia da Colheita: _____

CITOGENÉTICA
Nº de Ordem: _____ / ano.
Tipo de cultura: Sem DEB
Dia da Colheita: _____

Em cada um desses frascos de cultura, foi colocado meio composto de RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) quantidade suficiente para 5 mL, 20% de soro fetal bovino (Gibco-BRL, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco - BRL, NY, USA), 1% de antibiótico (penicilina/estreptomocina, preparada com 5.000U/mL de penicilina G sódica e 5.000µg/mL de sulfato de estreptomocina em 0.85% de solução salina, Gibco-BRL, NY, USA) e 200 µL de PHA P (Difco, Detroit Michigan, USA). Foi retirada com o auxílio de uma pipeta pasteur estéril a camada de células intermediárias entre o sobrenadante e o precipitado do tubo recém centrifugado. Transferiu-se uma quantia de aproximadamente dois mL, dessa camada, dividida em partes iguais entre os quatro frascos. Simultaneamente foi processada amostra de paciente doador de sangue (CN) do mesmo sexo do paciente investigado. Essas culturas foram delicadamente homogeneizadas e incubadas em estufa (Hepa Filtered, IR Incubator, Forma Scientific) a 37°C, pCO₂ de 4.9% e umidade de 85%, por 24h.

3.2.3 PREPARO E MANIPULAÇÃO DO DEB

A diluição do DEB foi realizada no mesmo dia do seu uso e em fluxo laminar, com cuidados inerentes à manipulação de agente alquilante, volátil e canceroso. Foi utilizada na concentração final de 0.1µg/mL por cultura, obtida da seguinte maneira:

Foram identificados três tubos de vidro (1), (2) e (3); com volumes de 10mL, 6mL e 4.5 mL, respectivamente. Foram pipetados 10 μ L de DEB no tubo (1) e, após homogeneização, foram transferidos quatro mL dessa solução para o tubo (2), homogenizando-se novamente; a seguir 0.5 mL da solução do tubo (2) foram transferidos para o tubo (3), seguido de uma nova homogeneização (solução de uso do DEB). Todos os materiais que estiveram em contato com o agente foram descartados em recipiente com solução de HCl 6 M.

3.2.4 CULTURA COM DEB

Após as primeiras 24h de incubação, foram pipetados 12,5 μ L do DEB recém diluído em cada uma das culturas identificadas: COM DEB. Reincubam-se essas culturas repetindo-se as mesmas condições de temperatura, umidade e pressão de CO₂ por mais 48 horas, completando um tempo total de cultivo de 72h.

3.2.5 CULTURA SEM DEB

Após as primeiras 24h de incubação, nenhum reagente foi adicionado a essas culturas, identificadas: SEM DEB. Uma leve e delicada homogeneização foi realizada no interior da própria estufa. Foram deixadas nessa mesma condição por mais 48h, completando também um tempo total de cultivo de 72h.

3.2.6 INCUBAÇÃO COM COLCHICINA

Após o tempo proposto de incubação, os frascos foram retirados da incubadora e transferido o material para tubos cônicos de 15 mL para centrifuga (Cornig, Cambridge, USA), e adicionado 0.1 mL de colchicina (Sigma, Saint Louis, USA). Os frascos foram fechados novamente e homogeneizados suavemente. Depois foram incubados a 37⁰C em banho-maria (Fanem-modelo 100, São Paulo, Brasil) por aproximadamente uma hora. Depois centrifugados (Eppendorf-5403) a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado com auxílio de pipeta pasteur descartável (1.9 mL, Sigma, Saint Louis, USA) e o precipitado ressuspenso.

3.2.7 SOLUÇÃO HIPOTÔNICA

Ao material ressuspenso, geralmente um a dois mL, acrescentou-se uma quantidade de solução hipotônica (0.075M de cloreto de potássio, Merck, Rio de Janeiro, Brasil) até completar 10 mL. Os frascos foram incubados a 37⁰C em o banho-maria por 20 minutos, e centrifugados, sendo o sobrenadante desprezado. Esta etapa tem como finalidade o rompimento ou apenas a fragilização da membrana citoplasmática.

3.2.8 FIXAÇÃO DO MATERIAL

As amostras foram lavadas três a cinco vezes com solução fixadora (solução de Carnoy), que consiste em três partes de metanol (Synth, São

Paulo, Brasil) para uma parte de ácido acético glacial (Merck, São Paulo, Brasil). A primeira lavagem foi realizada em solução gelada (2 a 8^oC) visando-se boa separação do material nuclear. Após essas lavagens, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em um volume final de um a dois mL e estocado -20^oC.

3.2.9 PREPARAÇÃO DA LÂMINA

A partir do material fixado, antes de ser congelado, uma gota foi pingada sobre uma lâmina limpa (Perfecta, São Paulo, Brasil). Rapidamente esta lâmina foi exposta a uma chama de bico de Bunsen (Fireboy, Tecnicra); sendo o sucesso desta etapa dependente da experiência de quem a processa. Se as células não estão suficientemente dispersas, os cromossomos não vão se separar adequadamente. Se a diluição for muito grande, um tempo maior vai ser gasto na procura de metáfases de boa qualidade, sem muitas sobreposições. As gotas foram lançadas de uma pipeta pasteur (Fisher, Alabana, USA) a uma distância relativamente curta em relação à lâmina (aproximadamente 15 cm) pois, para esses casos, onde foi efetuada à estimulação através de agentes mitógenos, os cromossomos se dispersam com muita facilidade.

3.2.10 COLORAÇÃO CONVENCIONAL

Essa etapa foi realizada para a leitura das 10 variantes (anormalidades cromossômicas) estipuladas pela literatura. O bandamento

não deve ser realizado porque, seja ele qual for, dificulta a visualização e ou diferenciação entre falhas e quebras. Para cada amostra com e sem DEB, procuramos preparar seis lâminas, das quais duas foram submetidas à etapa seguinte (bandamento G) e as demais coradas convencionalmente, usando-se Giemsa a 20% em tampão fosfato 0.06M e pH=6,8.

3.2.11 BANDAMENTO

Essa etapa só foi realizada para a análise dos cromossomos da cultura sem o agente indutor, onde foram cariotipadas as metáfases. Após o gotejamento do material nas lâminas, essas foram embrulhadas em papel Flor Post (Ripel, São Paulo, Brasil) e permaneceram assim por três a 10 dias. Esta espera é sempre necessária para o envelhecimento da lâmina, o que ajuda o bandamento dos cromossomos e a melhor visualização das bandas. Algumas vezes as lâminas foram colocadas por 30 minutos a 100°C em placa aquecida (agitador magnético com aquecimento, Cole Parmer, Chicago, USA) com o objetivo de acelerar o envelhecimento.

3.2.12 LEITURA DO TESTE DE DEB

As lâminas coradas convencionalmente das culturas induzida e não induzida foram analisadas em microscopia óptica comum em aumento de 1000x, sempre por um único observador. Foram adotados os mesmos critérios para a leitura do teste, citados anteriormente (Padronização do Teste: Leitura do Teste).

O escore foi determinado de acordo com os achados cromossômicos. As falhas ou intervalos de cromátide ou de cromossomos, definidas como regiões de pouca área acromática, não foram considerados na soma dos eventos. As quebras de cromátide ou de cromossomos, representando grandes áreas acromáticas, foram computadas como um evento. Os fragmentos representados por pedaços acêntricos de cromossomos foram considerados um evento. Os rearranjos, cromossomos dicêntricos, em anel, figuras trirradiais e quadrirradiais, por envolverem duas quebras, foram considerados como dois eventos (AUERBACH et al. 1989).

Analisamos 25 metáfases de cada cultura, sem e com o indutor DEB. O número mínimo de metáfases observadas foi de 10 para cada tipo de cultura. Para cada caso, foram também cariotipadas 10 metáfases pelo bandamento G, adotando, para alguns casos hipocelulares e/ou com baixo índice mitótico, o número mínimo de cinco metáfases.

3.2.13 CARIOTIPAGEM

Para cada amostra sem o indutor, foi também realizado um cariótipo com bandamento G, de acordo com as normas da Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) de 1995. A cada cromossomo é dado um número correspondente ao tamanho decrescente dos mesmos (exceção aos cromossomos 21 e 22) e identificados pela sua morfologia, dado pelas bandas correspondentes a cada um, conforme a Figura 5.

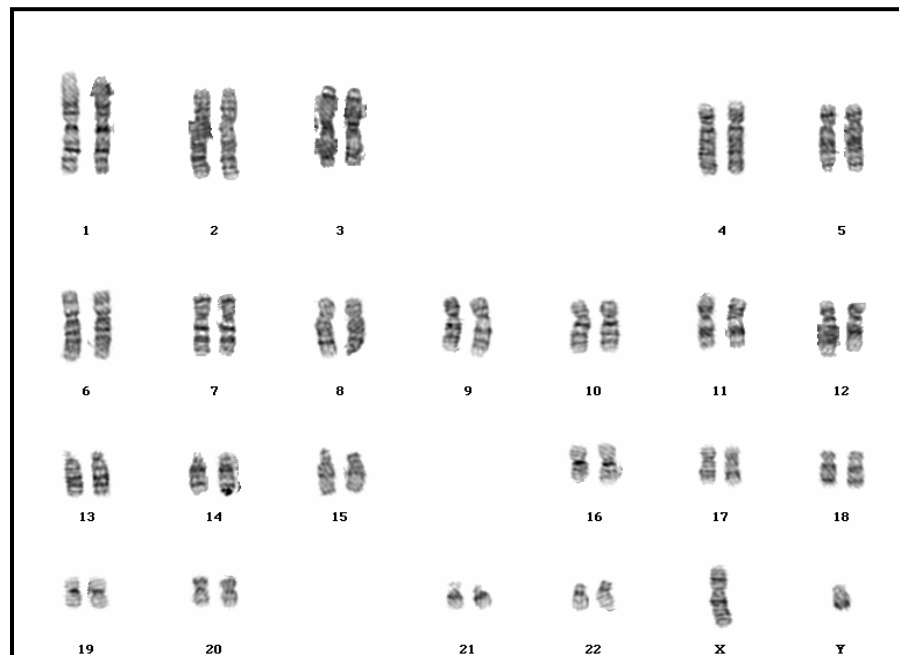


Figura 5. Cariótipo com bandamento G

Cariótipo masculino normal de SP, sem DEB, com bandamento G.

Conclusão: 46,XY (Caso fen 49).

3.2.14 ESTRATÉGIA DE ENSAIO

A mesma amostra de cada paciente e de cada controle positivo e negativo foi submetida à análise de cariótipo com bandamento G e com e sem o indutor DEB.

3.2.15 METODOLOGIA DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

As distribuições das leituras do teste de DEB espontâneo e induzido foram comparadas entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis (ROSNER, 1986). As amostras que estavam abaixo do valor máximo de DEB induzida do grupo controle negativo foram classificados como DEB

negativas. Aquelas que estavam acima do valor mínimo de DEB induzida do grupo AF foram classificadas como DEB positivas. E aquelas que estavam entre o máximo do grupo controle negativo e o mínimo do grupo AF foram classificadas como resultado duvidoso.

A proporção dos resultados das anormalidades cromossômicas nos presentes nos três grupos (DEB positivo, negativo e duvidoso) foi comparada através do teste exato de Fisher (ROSNER, 1986).

Como análise multivariada, utilizou-se a análise discriminante (JOHNSON e WICHERN et al., 1992) para identificar quais as anormalidades cromossômicas mais importantes na diferenciação dos grupos DEB positivo e DEB negativo. O método de seleção "stepwise" foi adotado para a seleção das variáveis com um nível de significância de entrada igual a 0.10 e de saída igual a 0.05.

RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS

A amostragem do controle negativo, foi representada por 12 homens e 16 mulheres com mediana de 29 (4-53) anos e média de 29.78 ± 11.86 anos.

O controle positivo, denominado de portadores de AF, representado por cinco homens e 12 mulheres, mediana de idade ao diagnóstico de 8 (2-13) anos e média de 7.29 ± 3.23 . Esse grupo foi assim classificado pela presença de alterações clínicas e hematológicas consistentes com esta patologia. A frequência dos achados genéticos, clínicos e hematológicos foi: alteração pâncreo-estatural 85.7% (12/14), alterações na pele 66.7% (10/15), consangüinidade 63.6% (7/11), alterações nos membros superiores 62.5% (10/16), alterações genitourinárias 43.7% (7/16), alterações gastrointestinais 20% (3/15), alterações auriculares 18.2% (2/11), microftalmia 15.4% (2/13), alterações no aprendizado 14.3% (2/14), alterações nos membros inferiores 7.7% (1/13), alterações cardiopulmonares 7.1% (1/14), pancitopenia 91.7% (11/12) e hipocelularidade medular ao mielograma e/ou a biópsia da medula óssea 76.9% (10/13) (TABELA 7).

TABELA 7 - Características dos grupos estudados

GRUPOS/AMOSTRA*	SEXO**	IDADE (ANOS)***
CN n= 28	M:12 F: 16	Mediana: 29 (4-53) Média ±DP: 29.78 ± 11.86
CP n= 17	M: 05 F: 12	Mediana: 8 (2-13) Média ±DP: 7.29 ± 3.23
Fen n= 8	M: 06 F: 02	Mediana: 1.8 (0.1-12) Média ±DP: 4.07 ± 4.73
AAC n= 10	M: 06 F: 04	Mediana: 10 (2.3-19) Média ±DP: 10.18 ± 6.02
AAA n= 31	M: 19 F: 12	Mediana: 11 (1.8-49) Média ±DP: 15.36 ± 10.96
IAF n= 13	M: 07 F: 06	Mediana: 10 (1-17) Média ±DP: 9.67 ± 4.85
Outros n= 5	M: 02 F: 03	Mediana: 18 (0.6-34) Média ±DP: 16.72 ± 13.63
SC n= 36	M: 22 F: 14	Mediana: 14 (0-41) Média ±DP: 15.34 ± 10.76
TOTAL n=148	M: 79 F: 69	Mediana: 12 (0-53) Média ±DP: 15.8 ± 12.35

CN=controle negativo; CP=controle positivo; Fen=alteração fenotípica; AAC=anemia aplástica constitucional; AAA=anemia aplástica adquirida; iAF=irmãos de Anemia de Fanconi; SC=sem caracterização clínica.** M=sexo masculino e F=sexo feminino. *** DP=desvio padrão.

4.2 DETERMINAÇÃO DO VALOR DE REFERÊNCIA PARA O DEB

Foram utilizadas as populações de CN e CP, para determinação do valor de referência para DEB positivo e negativo. O índice de quebras espontâneas e induzidas foi calculado por três parâmetros distintos:

quebras/total de células, porcentagem de células com quebras cromossômicas e índice de quebras/células alteradas, conforme a Tabela 8

TABELA 8 - Distribuição dos valores de referência para o teste de DEB calculado em três parâmetros distintos.

PARÂMETROS	GRUPO	N	MÉDIA	MEDIANA	MÍN	MÁX	P
QUEBRAS/TOTAL DE CÉLULAS (ESPONTÂNEO)	CP	17	0.16	0.12	0.00	0.36	<0.001
	CN	28	0.01	0.00	0.00	0.08	
QUEBRAS/TOTAL DE CÉLULAS (INDUZIDO)	CP	17	3.49	2.20	0.74	12.8	<0.001
	CN	28	0.02	0.00	0.00	0.08	
CÉLULAS COM QUEBRAS (%) (ESPONTÂNEO)	CP	17	12.39	12.0	0.00	28.0	<0.001
	CN	28	1.57	0.00	0.00	16.0	
CÉLULAS COM QUEBRAS (%) (INDUZIDO)	CP	17	78.76	76.19	42.0	100.0	<0.001
	CN	28	4.43	4.43	0.00	12.0	
QUEBRAS/TOTAL DE CÉLULAS ANORMAIS(ESPONTÂNEO)	CP	17	1.22	1.14	0.00	2.5	<0.001
	CN	28	0.29	0.00	0.00	2.0	
QUEBRAS/TOTAL DE CÉLULAS ANORMAIS(INDUZIDO)	CP	17	3.83	2.71	1.62	12.8	<0.001
	CN	28	0.38	0.00	0.00	2.00	

CP: controle positivo; CN: controle negativo.

Observa-se que houve diferenças significantes entre grupo CP e CN quando se avaliaram os três tipos de análise, tanto nas culturas espontâneas como induzidas por DEB.

Optou-se pela utilização do índice de quebras induzidas obtidas por células totais, criando-se três tipos de classificação. O grupo com DEB negativo, que correspondeu ao valor de DEB menor ou igual a 0.08; teste DEB positivo, que correspondeu àqueles onde o valor do DEB induzido era maior ou igual a 0.74 e o grupo DEB duvidoso que foi representado pelos valores do DEB compreendidos entre 0.08 e 0.74.

O valor de 0.08 representa o valor máximo do índice de quebras/células encontrado na cultura induzida do grupo CN. O valor de 0.74 representa o menor índice de quebras/células observadas também na cultura induzida, porém no grupo CP.

4.3 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DAS ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS

Após a obtenção do valor de referência para DEB, foram criadas três populações, assim constituídas:

DEB positivo: 25 amostras (17 do grupo de AF, quatro do grupo de AAC, três sem dados clínicos, um irmão de AF).

DEB negativo: 102 amostras (28 CN, cinco AAC, 21 AAA, seis com alteração fenotípica, 10 irmãos de AF, 27 sem dados clínicos e quatro com outros diagnósticos).

DEB duvidoso: 21 amostras (dois com alteração fenotípica, nove com AAA, um com AAC, dois irmãos de AF, seis sem dados clínicos e um com outro diagnóstico).

A presença de anormalidades cromossômicas, (pelo menos uma anormalidade visualizada na metafases por caso), encontradas nas culturas induzida e espontânea, nos três grupos acima classificados, estão resumidas na Tabela 9.

TABELA 9 - Frequência das anormalidades cromossômicas presentes nas culturas espontânea e induzida nos grupos DEB positivo, negativo e duvidoso.

TIPO DE ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS/CULTURA	DEB -* (102) N (%)	DEB + ** (25) N (%)	DEB DUVIDOSO*** (21) N (%)
ANEL			
Esponatnea	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)
Induzida	0 (0%)	5 (20%)	0 (0%)
DICÊNTRICO			
Esponatnea	9 (8.8%)	7 (28%)	4 (19%)
Induzida	9 (8.8%)	12 (48%)	14 (66.7%)
FRAGMENTO			
Esponatnea	3 (2.9%)	4 (16%)	2 (9.5%)
Induzida	4 (3.9%)	20 (80%)	6 (28.6%)
FALHA DE CROMÁTIDE			
Esponatnea	14 (13.7%)	8 (32%)	3 (14.3%)
Induzida	25 (24.5%)	18 (72%)	7 (33.3%)
QUEBRA DE CROMÁTIDE			
Esponatnea	11 (10.8%)	14 (56%)	9 (42.8%)
Induzida	26 (25.5%)	24 (96%)	12 (57.1%)
FALHA DE CROMOSSOMO			
Esponatnea	7 (6.9%)	4 (16%)	5 (23.8%)
Induzida	18 (17.6%)	17 (68%)	7 (33.3%)
QUEBRA DE CROMOSSOMO			
Esponatnea	9 (8.8%)	10 (40%)	3 (14.3%)
Induzida	13 (12.7%)	25 (100%)	6 (28.65%)
FIGURA TRIRRADIAL			
Esponatnea	0 (0%)	3 (12%)	0 (0%)
Induzida	0 (0%)	24 (96%)	2 (9.5%)
FIGURA QUADRIRRADIAL			
Esponatnea	0 (0%)	2 (28%)	0 (0%)
Induzida	0 (0%)	21 (84%)	0 (0%)
REARRANJO			
Esponatnea	1 (1%)	2 (28%)	0 (0%)
Induzida	0 (0%)	15 (60%)	0 (0%)
ENDORREDUPLICAÇÃO			
Esponatnea	0 (0%)	4 (16%)	0 (0%)
Induzida	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)

* Grupo dos pacientes com teste de DEB negativo; ** Grupo de pacientes com o teste de DEB positivo; *** Grupo de pacientes que apresentaram o teste de DEB duvidoso. Em negrito, as variáveis mais freqüentes por tipo de cultura e/ou de grupo.

Observa-se alta frequência de quebra espontânea de cromossomo e cromátide e de todas as anormalidades, a exceção de cromossomos em anel e endorreduplicação na cultura induzida no grupo DEB positivo.

No grupo DEB negativo, apenas as falhas e as quebras de cromátide estiveram presentes em mais de 10% dos casos nas culturas induzidas e espontâneas. A presença de falha e quebra de cromossomos foi observada em 10% dos casos somente na cultura induzida.

4.4 ASSOCIAÇÃO DAS VARIÁVEIS CROMOSSÔMICAS COM O VALOR DE CORTE (DEB POSITIVO E NEGATIVO).

Para as culturas espontâneas, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos DEB positivo e negativo para as seguintes variáveis: presença de cromossomos dicêntricos ($p=0.0169$), fragmentos cromossômicos ($p=0.0276$), falhas de cromátides ($p=0.0406$) e quebras de cromátides ($p=0.0001$), quebras cromossômicas (0.0001), figuras trirradiais ($p=0.0069$) e quadrirradiais ($p=0.0375$) e endorreduplicações ($p=0.0012$). Não se observando para as seguintes variáveis: presença de cromossomos em anel ($p=0.1969$), falhas de cromossomos ($p=0.2249$) e rearranjos cromossômicos ($p=0.0987$).

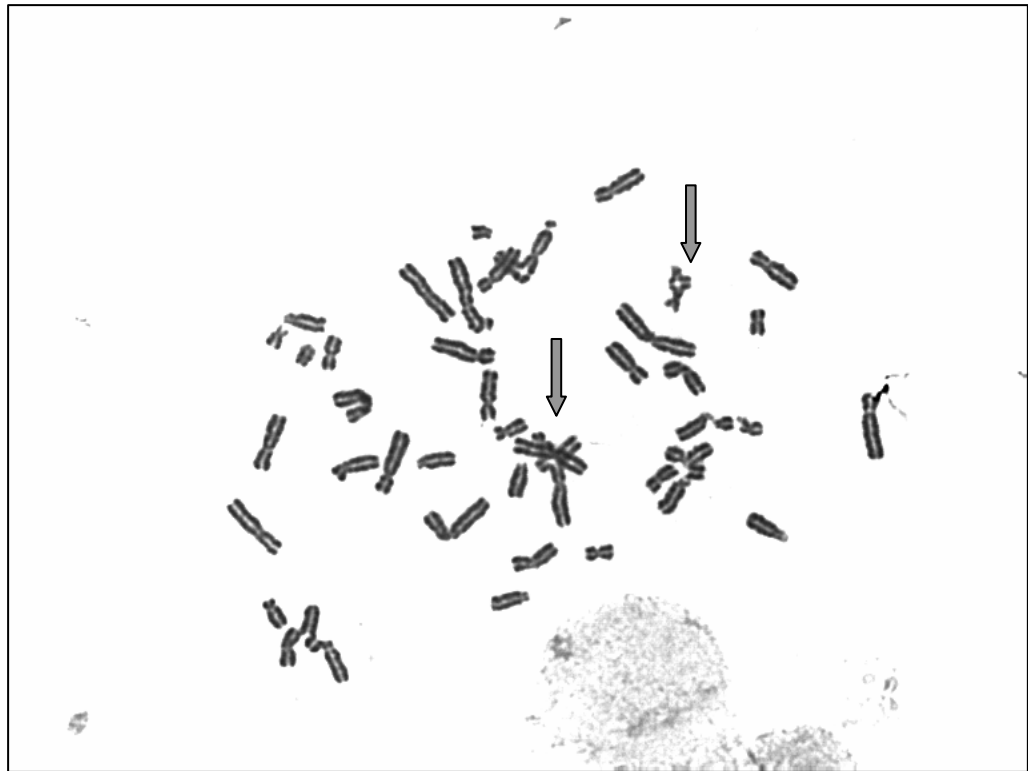
Para as culturas induzidas, todas as variáveis, com exceção da endorreduplicação ($p=1.000$), foram significantes ($p=0.0001$ em todas e apenas $p=0.0002$ para o variável cromossomo em anel). Quando aplicada a

análise multivariada, foram selecionadas alterações da cultura induzida: figuras trirradiais ($p=0.0001$), quadrirradiais ($p=0.0001$), cromossomos dicêntricos ($p=0.0061$), quebra de cromossomos ($p=0.0086$) e rearranjos ($p=0.0347$) (FIGURA 6)

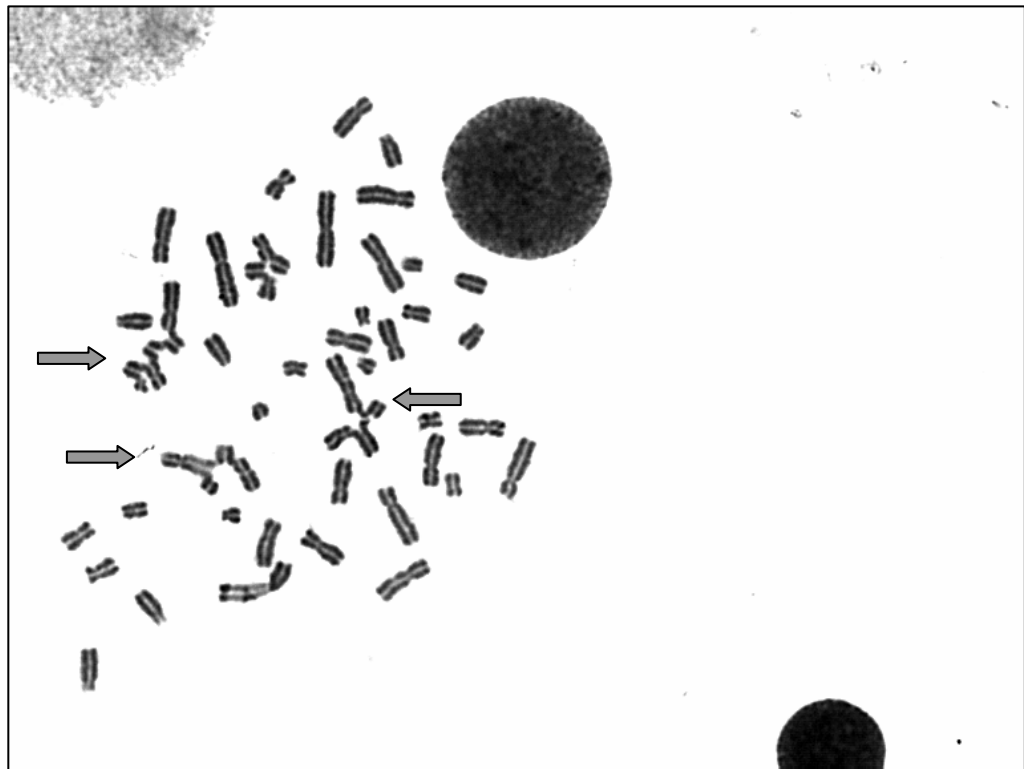


Figura 6. Metáfases com anormalidades cromossômicas vistas na AF

6A. Cariótipo da cultura induzida da amostra AAC57. Em destaque presença de quebra cromossômica. Coloração convencional com Giemsa.



6B. Cariótipo da cultura induzida da amostra AAC57. Em destaque presença de figuras radiais. Coloração convencional com Giemsa.



6C. Cariótipo da cultura induzida da amostra AAC57. Em destaque presença de rearranjos cromossômicos. Coloração convencional com Giemsa.

4.5 VERIFICAÇÃO DA PORCENTAGEM DE CASOS POSITIVOS, NEGATIVOS E DUVIDOSOS NAS POPULAÇÕES DEFINIDAS CLINICAMENTE

Após a obtenção do valor de referência para teste de DEB positivo, verificamos a porcentagem de testes positivos, negativos e duvidosos para AF em cada grupo classificado anteriormente (TABELA 10).

TABELA 10 - Frequência dos casos DEB positivos, negativos e duvidosos nos grupos definidos clinicamente

GRUPOS	DUVIDOSO		NEGATIVO		POSITIVO		TOTAL
	DEB 0.08-0.74		DEB ≤0.08		DEB ≥0.74		
	N	%	N	%	N	%	
fen ¹	2	25.0	6	75.0	0	0.0	8
AAC ²	1	10%	5	50%	4	40%	10
AAA ³	9	29%	22	71%	0	0.0	31
IAF ⁴	2	15.4	10	76.9	1	7.7	13
OUTROS ⁵	1	20.0	4	80.0	0	0.0	5
SC ⁶	6	16.7	27	75.0	3	8.3	36

1: alteração fenotípica; 2: anemia aplástica constitucional; 3: anemia aplástica adquirida; 4: irmãos de Anemia de Fanconi; 5: outros diagnósticos; 6: sem caracterização.

Na população com alteração fenotípica, nenhum paciente apresentou teste de DEB positivo. Dois pacientes (2/8) apresentaram índice de quebras/células da cultura induzida de 0.12 e 0.15, ou seja, valor do teste de DEB considerado duvidoso para o diagnóstico da AF.

Em relação ao grupo com AAC, 40% (4/10) apresentaram teste de DEB positivo, com o índice de quebras/células variando entre 1.12 a 4.13, e um teve o teste duvidoso, com o índice de quebras/células de 0.16.

No grupo classificado com AAA, nenhum paciente apresentou o teste positivo e 29% (9/31), tiveram o teste duvidoso para o diagnóstico de AF, variando o índice/quebras células entre 0.12 a 0.33.

Em relação aos irmãos de AF, 7.7% (1/13) apresentaram o teste de DEB positivo para AF e 15.4% (2/13) apresentaram o teste duvidoso para essa patologia, com o índice de quebras/células entre 0.12 e 0.4.

Na população com outras patologias, o paciente com diagnóstico de Anemia Diseritropoiética, foi o único que apresentou o teste duvidoso, ou seja, índice de quebras/células de 0.33. Os demais 80% (4/5) tiveram o teste negativo para AF.

Por fim, no grupo SC, tivemos teste de DEB positivo em 8.33% (3/36) dos pacientes, com os valores do índice de quebras/células de: 2.32, 2.47 e 7.72. Teste duvidoso em 16.7% (6/36) dos pacientes, nos quais o valor do índice de quebras/células foi entre 0.1 e 0.72.

4.6 VERIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE VARIÁVEIS CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS NA POPULAÇÃO DEB POSITIVA

Na população DEB positiva (n=25) representada por 17 amostras do grupo CP, quatro do grupo AAC, três do grupo SC e uma amostra do grupo iAF, as alterações clínicas e hematológicas mais comumente presentes em cada grupo foram relacionadas nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11 - Frequência das variáveis clínicas na população DEB positiva

VARIÁVEIS CLÍNICAS (N)	CP (%)		AAC/SC/ iAF*(%)	
	PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
ALTERAÇÃO DE CRESCIMENTO (18)	12 (85.7)	2 (14.3)	2 (50.0)	2 (50.0)
ALTERAÇÃO DE PELE (19)	10 (66.7)	5 (33.3)	4 (100.0)	0 (0.0)
CONSANGÜINIDADE (14)	7 (63.6)	4 (36.4)	2 (66.7)	1(33.3)
ALTERAÇÕES DE MMSS (20)	10 (62.5)	6 (37.5)	0 (0.0)	4 (100.0)
ALTERAÇÕES GENITO-URINÁRIAS (20)	7 (43.8)	9 (56.2)	0 (0.0)	4 (100.0)
ALTERAÇÕES GASTRO-INTESTINAIS (19)	3 (20.0)	12 (80.0)	0 (0.0)	4 (100.0)
ALTERAÇÕES AURICULARES (15)	2 (18.2)	9 (81.9)	0 (0.0)	4 (100.0)
MICROFTALMIA (17)	2 (15.4)	11 (84.6)	0 (0.0)	4 (100.0)
ALTERAÇÃO NO APRENDIZADO (18)	2 (14.3)	12 (85.7)	0 (0.0)	4 (100.0)
ALTERAÇÕES ESQUELÉTICAS (AXIAL/MMII) (20)	1 (6.2)	15 (93.8)	0 (0.0)	4 (100.0)
ALTERAÇÕES CARDIOPULMONARES (18)	1 (7.2)	13 (92.8)	0 (0.0)	4 (100.0)

N: nº de pacientes que foram avaliados para cada alteração; *: pacientes não avaliados; MMSS: alterações de membros superiores; MMII: alterações de membros inferiores.

TABELA 12 - Frequência das variáveis hematológicas na população DEB positiva

VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS (N)	CP (%)		AAC/SC/IAF* (%)	
	PRESENTE	AUSENTE	PRESENTE	AUSENTE
PLAQUETOPENIA (20) (plaquetas <100.000/mm ³)	15 (93.8)	1 (6.2)	4 (100.0)	0 (0.0)
ANEMIA (Hb ≤10g/ dL) (20)	10 (62.5)	6 (37.5)	4 (100.0)	0 (0.0)
LEUCOPENIA (20) (leucócitos ≤4000/mm ³)	9 (56.2)	7 (43.8)	4 (100.0)	0 (0.0)
PANCITOPENIA (20)	11 (68.8)	5 (31.2)	4 (100.0)	0 (0.0)
HIPOCELULARIDADE DA MO (16) (biópsia e/ou aspirado)	10 (83.3)	2 (16.7)	4 (100.0)	0 (0.0)

N: nº de pacientes que foram avaliados para cada alteração; *: pacientes não avaliados; Hb: hemoglobina; MO: medula óssea

No grupo de CP, as alterações clínicas mais frequentes (acima de 60%) foram alterações de crescimento, alterações de pele, presença de consangüinidade e alterações de membros superiores. As alterações hematológicas encontradas com maior frequência (acima de 80%) foram a plaquetopenia e hipocelularidade da MO observados por biópsia ou mielograma.

Nos demais pacientes (que não eram do grupo CP) tivemos a avaliação clínica de apenas quatro do grupo AAC, onde a alteração clínica se repetiu, excetuando as alterações de membro superior e a hematológica nas quais não ocorreram quaisquer prevalências.

4.7 DISTRIBUIÇÃO DA FAIXA ETÁRIA NOS TRÊS GRUPOS CLASSIFICADOS COMO DEB POSITIVO, DEB NEGATIVO E DEB DUVIDOSO.

A Tabela 13 mostra a distribuição de faixa etária (média, mediana, idade mínima e máxima) dos portadores de teste DEB positivo, negativo e duvidoso.

TABELA 13 - Distribuição da faixa etária nas populações DEB duvidoso, negativo e positivo

	DUVIDOSO n=21		NEGATIVO n=74		POSITIVO n=25	
	MEDIANA	MÉDIA	MEDIANA	MÉDIA	MEDIANA	MÉDIA
FAIXA etária	13	14.23	11	13.1	8.8	8.82
(Min.-Máx.)	(0.9-41)		(0-49)		(1-20)	

4.8 VERIFICAÇÃO DO PARÂMETRO PORCENTAGEM DE CÉLULAS ANORMAIS NO TOTAL DE CÉLULAS ANALISADAS (%A/T) COMO VALOR DE REFERÊNCIA.

Para a %A/T, foi considerado valor negativo o inferior ou igual a 12% e para teste positivo o valor igual ou superior a 42% (vide Tabela 8).

A Tabela 14 mostra como seria a classificação das amostras, levando-se em consideração a porcentagem de células anormais no total de células analisadas.

Tabela 14 - Classificação das amostras segundo dois parâmetros para o teste de DEB (classificação pelo índice de quebras por células e pela porcentagem de células anormais encontradas).

CLASSIFICAÇÃO PELO ÍNDICE DE QUEBRAS/CÉLULAS ¹	CLASSIFICAÇÃO PELA % A/T ²		
	DEB POSITIVO >=42%	DEB NEGATIVO <=12%	DEB DUVIDOSO 12-42%
DEB POSITIVO (n=25)*	24(52-100)	0	1 (25%)
DEB NEGATIVO (n=74)**	0	70 (0-12%)	4 (15-32%)
DEB DUVIDOSO (n=21)	1 (52%)	12 (4-12%)	8 (16-28%)
TOTAL (n=120)	25	82	13

1: grupos classificados pelo índice de quebras por células totais; 2: classificação pela porcentagem de células anormais no total de células analisadas; * inclusos os CP; ** excluídos os CN.

Ao classificar o grupo DEB positivo pelo parâmetro %A/T, um caso (AAC60) apresentou 25% de células anormais. Já quatro das 74 amostras do grupo DEB negativo (índice de quebras por células totais menor ou igual a 0,08), quando classificadas pelo parâmetro %A/T, foram consideradas DEB duvidoso, por apresentarem uma porcentagem entre 15 e 32%. O grupo DEB duvidoso, quando classificado pela %A/T, apresentou uma amostra positiva (SC121), 12 negativas (4-12%) e oito amostras com o teste de DEB duvidoso, com a porcentagem de células anormais entre 16-28%.

4.9 GRUPO DEB DUVIDOSO CLASSIFICADO PELO ÍNDICE DE QUEBRAS POR CÉLULAS TOTAIS: VERIFICAÇÃO DO ESA E ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SIGNIFICANTES

A Tabela 15 apresenta uma comparação dos achados cromossômicos significantes no grupo DEB duvidoso.

TABELA 15 - Análise do grupo DEB duvidoso pelos parâmetros de quebras e %a/t, por ESA e pelos achados cromossômicos significantes.

AMOSTRA	ÍNDICE DE QUEBRAS/CÉLULAS	%A/T	ESA	ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICA
Fen46	0.15	11	0	Presente
Fen47	0.12	6	0	Presente
AAC56	0.16	11.4	2	Presente
AAA67	0.16	8	1	Presente
AAA68	0.24	28	1	Ausente
AAA69	0.33	17	0	Presente
AAA76	0.12	6	1	Presente
AAA78	0.24	12	1	Presente
AAA79	0.12	8	1	Presente
AAA80	0.16	20	1	Presente
AAA81	0.24	28	1	Presente
OUTROS95	0.33	40	(-1)	Ausente

Notamos a presença de alterações cromossômicas em 10/12 (83.3%) DEB duvidosos. Aplicando o %A/T, 5/12 (41.7%) das amostras mantiveram-se DEB duvidoso e 7/12 (58%) seriam considerados DEB negativo.

4.10 VERIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E DOS DADOS CLÍNICOS QUE SE ASSOCIAM AO TESTE DEB POSITIVO, VERIFICANDO O ESCORE PADRONIZADO PELO RIAF NA POPULAÇÃO ESTUDADA.

Foi possível a aplicação do escore clínico simplificado de Auerbach em 19 dos 25 casos com DEB positivo. Observou-se 7/19 (36.8%) com escore 4+, 6/19 (31.6%) com escore 3. 6/19 (31.6%) com escore 2, com concordância clínica de 100%, conforme Tabela 16.

TABELA 16 - Aplicação do escore simplificado de Auerbach na população DEB +

Grupo- Amostra	Cresc. ponderal	alter. na pele	alter. Gen.rin	Microft.	Plaque topenia	Radio polegar	Alter. Esquel.	Aprend.	ESA	Induzida
AF29	SIM	SIM	NÃO	NÃO	81000	NÃO	NÃO	NÃO	3	2.2
AF30	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	20000	NÃO	NÃO	NÃO	3	12.8
AF31	SIM	SIM	NÃO	N/R	27000	NÃO	NÃO	NÃO	4	1.67
AF33	SIM	SIM	SIM	SIM	26000	SIM	NÃO	SIM	5	1.08
AF35	SIM	SIM	NÃO	N/R	14000	SIM	NÃO	NÃO	4	2.42
AF36	SIM	NÃO	SIM	NÃO	220000	SIM	SIM	NÃO	2	1.68
AF37	N/R	SIM	SIM	NÃO	45000	NÃO	NÃO	N/R	3	5.88
AF38	SIM	NÃO	SIM	NÃO	69000	SIM	NÃO	NÃO	4	2.88
AF39	SIM	SIM	SIM	NÃO	50000	SIM	NÃO	NÃO	5	1.84
AF40	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	67000	NÃO	NÃO	NÃO	2	1.48
AF41	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	43000	NÃO	NÃO	NÃO	2	2.44
AF42	SIM	SIM	SIM	NÃO	22000	SIM	NÃO	SIM	4	8.71
AF43	SIM	SIM	NÃO	NÃO	38000	SIM	NÃO	NÃO	4	2.06
AF44	SIM	SIM	NÃO	NÃO	88000	NÃO	NÃO	NÃO	3	0.74
AF45	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	50000	NÃO	NÃO	NÃO	2	1.25
AAC55	SIM	SIM	NÃO	NÃO	14000	NÃO	NÃO	NÃO	3	2.24
AAC57	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	63000	NÃO	NÃO	NÃO	2	1.12
AAC60	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	29000	NÃO	NÃO	NÃO	2	1.87
AAC63	SIM	SIM	NÃO	NÃO	57000	NÃO	NÃO	NÃO	3	4.3

Dos pacientes com DEB duvidoso, obtivemos informação quanto ao escore em 12 dos 21 pacientes, onde 11 destes apresentaram escore

variando de menos um a um , e apenas um com escore igual a 2 (TABELA 17).

TABELA 17 - Escore do RIAF na população DEB Duvidosos

Grupo- /Amostra	Cresc.p onderal	alter. pele	alter. Gen.rin	Microft.	Plaque topenia	Radio/ polegar	alter. esquel.	Aprend.	ESA	induzida
fen46	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	345000	SIM	SIM	SIM		0.15
fen47	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	360000	NÃO	NÃO	SIM	0	0.12
AAC56	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	19000	NÃO	NÃO	NÃO	2	0.16
AAA67	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	7300	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.16
AAA68	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	65400	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.24
AAA69	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	107000	NÃO	NÃO	NÃO	0	0.33
AAA76	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	3000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.12
AAA78	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	18000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.24
AAA79	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	18000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.12
AAA80	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	33000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.16
AAA81	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	31000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.24
OUTROS95	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	289000	SIM	SIM	NÃO	(-1)	0.33

Dos pacientes com DEB negativo, obtivemos informações quanto ao escore em 33 dos 37 pacientes, destes quatro com escore maior ou igual a 2, implicando na probabilidade do percentual de 75% para o diagnóstico laboratorial de AF (TABELA 18).

TABELA 18:- Escore do RIAF na população DEB (-)

Grupo/ Amostra	Cresc. ponderal	alter. na pele	alter. Gen.rin	Microft.	Plaque- topenia	Radio/ polegar	alter. esquel.	Aprend.	ESA	induzida
fen48	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	300000	SIM	SIM	SIM	1	0
fen49	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	3	0.04
fen50	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	(-1)	0
fen51	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	2	0
fen52	SIM	NÃO	SIM	NÃO	380000	SIM	NÃO	SIM	2	0.04
AAC54	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	110000	NÃO	SIM	NÃO	0	0.06
AAC58	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	69000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAC59	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	308000	NÃO	NÃO	NÃO	0	0.08
AAC61	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	14000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAC62	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	35000	NÃO	NÃO	NÃO	2	0.04
AAA64	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	27000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAA65	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	19000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAA70	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	7000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.07
AAA72	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	72000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.08
AAA73	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	28000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAA74	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	25000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAA77	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	87000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.04
AAA82	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	8000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.04
AAA83	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	15000	NÃO	SIM	NÃO	1	0
AAA84	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	6000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAA85	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	10000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.04
AAA86	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	27000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.08
AAA87	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	20000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.04
AAA88	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	67000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAA89	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	9000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.04
AAA90	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	7000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.04
AAA91	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	75000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
AAA92	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	8000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0.08
AAA94	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	13000	NÃO	NÃO	NÃO	1	0
OUTROS99	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	300000	NÃO	NÃO	NÃO	0	0.04
OUTROS96	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	190000	NÃO	NÃO	NÃO	0	0.04
OUTROS98	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	287000	NÃO	NÃO	NÃO		0
IAF100	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	17300	NÃO	NÃO	NÃO	1	0

A Tabela 19, resume os achados do escore simplificado de Auerbach nas três populações estudadas.

TABELA 19.- Distribuição do valor do escore simplificado de Auerbach em cada grupo

ESCORE SIMPLIFICADO /P*	AF + (n=19)	AF - (n=12)	AF DUVIDOSOS (n=13)
-1 = 0%	0	1	0
0 = 20%	0	4	3
1 = 31%	0	4	8
2 = 75%	6	3	1
3 = 92%	6	1	0
4+ = 98%	7	0	0
TOTAL	19	33	12

A probabilidade entre nossos grupos não pode ser calculada pela alta porcentagem de casos com ausência de alterações cromossômicas. Neste caso, ao se aplicar o modelo de regressão logística, obtivemos coeficientes com valores nulos.

4.11 VERIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS DO CARIÓTIPO COM BANDA G DAS CULTURAS ESPONTÂNEAS EM TODA POPULAÇÃO ESTUDADA.

Todos os cariótipos com bandamento G dos 25 pacientes DEB positivo foram normais.

Foram cariotipados 57 pacientes com DEB negativo. Desses, quatro apresentaram um aumento de heterocromatina constitutiva do cromossomo 9; um apresentou uma inversão pericêntrica do cromossomo 9, um outro apresentou aumento da heterocromatina constitutiva do cromossomo 16 e, em uma amostra de recém nascido, sem dados clínicos, encontramos trissomia livre do cromossomo 21, provável mosaicismos para síndrome de Down.

Dos pacientes com DEB duvidoso, dez foram cariotipados. Desses, nove apresentaram cariótipo normal e um apresentou aumento da heterocromatina constitutiva do cromossomo 9.

TABELA 20 - Cariótipo com bandamento G nas três populações estudadas

GRUPOS ESTUDADOS	DEB +	DEB -	DEB DUVIDOSO	TOTAL
Nº BANDA G/TOTAL DE AMOSTRA	(25/25)	(57/74)	(10/21)	(92/120)
CARIÓTIPO NORMAL	25 (100%)	50 (87.7%)	9 (90%)	84 (91%)
CARIÓTIPO COM 9h+	0	4 (7%)	1 (10%)	5 (5%)
CARIÓTIPO COM INV(9)(p11q12)	0	1 (1.75%)	0	1 (1.1%)
CARIÓTIPO COM 16h+	0	1 (1.75%)	0	1 (1.1%)
CARIÓTIPO COM +21	0	1 (1.75%)	0	1 (1.1%)

9h⁺: heterocromatina constitucional adicional no cromossomo 9;

inv(9)(p11q12): inversão pericêntrica no cromossomo 9;

16h⁺: heterocromatina constitucional adicional no cromossomo 16;

+21: trissomia livre do cromossomo 21.

DISCUSSÃO

O reconhecimento da presença de quebras cromossômicas na AF, tem sido utilizado para diagnóstico laboratorial dessa patologia, desde 1960 por muitos grupos (BERGER et al., 1975; AYMÉ et al., 1976; FUJIWARA et al., 1977; ALTER, 1983; ALIMENA et al., 1983).

Essas quebras cromossômicas, inicialmente observadas apenas em culturas não induzidas ou espontâneas, foram de fato relacionadas com o diagnóstico laboratorial da AF, quando da padronização do teste com o uso de agentes clastogênicos. Particularmente, o uso do DEB, que induz ligações inter e intrafilamentos do DNA, mostrou-se bastante específico, sendo descrito em 1981 por Auerbach. Foi demonstrado que a comparação entre os achados na cultura não induzida e induzida era um bom método para diagnóstico da AF. Mais do que isto, o aumento das quebras cromossômicas encontradas nas células da AF quando submetida à ação de agente indutor de instabilidade cromossômica seria patognomônico dessa doença. Deve ser ressaltado, entretanto, o seu uso discutível nos AF heterozigotos.

A solidificação da aplicação desse agente como específico no diagnóstico citogenético da AF foi realizado pela mesma pesquisadora e com amostras reportadas no RIAF nos anos de 1991 e 1994. Através da

análise citogenética, hematológica e clínica mostrou-se que esse experimento tem um valor preditivo de 99% no diagnóstico da AF. (AUERBACH et al., 1981, 1989, 1991, 1993). Entretanto, este teste apresenta algumas dificuldades na sua implantação, principalmente como rotina em um grande centro e também, algumas ressalvas na sua interpretação e realização.

Primeiramente destacamos a dificuldade de obtenção do produto DEB. Por tratar-se de um agente altamente tóxico e carcinogênico, sua aquisição é muito burocrática e seu transporte extremamente cauteloso, devendo obedecer a normas especiais, como, por exemplo, ser transportado apenas por via marítima. Por se tratar de um produto volátil, sua manipulação deve ser realizada por pessoa devidamente protegida com equipamentos de segurança e o ambiente de manipulação adequado à proteção coletiva. Apesar de não haver nenhum fato descrito na literatura, não se descarta a possibilidade de contaminação do manipulador. Assim, a alta toxicidade do DEB ao manipulador e ao meio, representa, em muitos laboratórios, um fator decisivo para o seu não uso.

A exata concentração do DEB empregada na cultura após as primeiras 24 horas de incubação também representa uma dificuldade na implantação do teste. A diluição do DEB é realizada no momento exato do seu uso, e o restante descartado logo a seguir. O responsável por essa etapa deve além de garantir a esterilidade das culturas, acertar rapidamente

a concentração exata do reagente em cada cultura e certificar-se de que o restante do DEB e todo o material que esteve em contato com o mesmo foram adequadamente descartados na solução de HCl e vedados em um container especial. Quando a concentração do DEB não é adequada, pode ocorrer morte celular ou resultado falso-negativo, respectivamente na presença de alta e baixa concentração do agente.

A normatização da leitura, foi um passo decisivo na realização do teste. Na literatura foi reportado apenas a informação de que os intervalos de cromossomos e de cromátides não devem ser computados e que cromossomos dicêntricos, em anel, presença de figuras radiais e rearranjos deveriam ser considerados como dois eventos; e a presença de fragmentos e fraturas de cromátides e cromossomos como um único. Até o momento, nenhum trabalho demonstrou como é realizada de fato essa contagem. Neste estudo, sugerimos que a contagem seja feita em uma tabela, e que nela os eventos encontrados sejam anotados (TABELA 4). O número de metáfases computadas na cultura induzida foi de no mínimo 10 para os casos positivos e de 25 para os casos negativos. Para a cultura não induzida a análise de 25 metáfases parece ter boa relação com o resultado do teste. As representações numéricas finais das anormalidades cromossômicas observadas podem ser fornecidas em três parâmetros: 1) valor do índice de quebras por células totais analisadas; 2) valor do índice de quebras por células anormais analisadas e 3) porcentagem do número de células anormais em relação ao total geral de células computadas (%A/T). Através

do estudo dos nossos resultados, observamos que o primeiro parâmetro seria o melhor, pois não se observava sobreposição entre o valor máximo de quebras/células na cultura induzida dos controles negativos e o valor mínimo de quebras/células na cultura induzida dos controles positivos. O mesmo não foi verificado na análise do 2º parâmetro. Em relação ao 3º parâmetro, notamos que esse poderia também ser utilizado na classificação dos grupos, utilizando como valor de corte para controle positivo 42% de células anormais (tabela 7). Entretanto, não utilizamos o parâmetro %A/T, apesar de haver concordância na positividade e negatividade do teste usando os dois parâmetros nos controles positivos e negativos. Entretanto, 4/74 amostras consideradas DEB negativas (índice de quebras/células menor que 0.08), apresentavam %A/T entre 15-32%. Parece mais razoável considerar tais amostras como DEB negativas, pois o que se observava nesses casos era a presença de intervalos de cromátides e de cromossomos. Isso fez com que a quantidade de células anormais computadas fosse maior, e por tais anormalidades não receberem pontuação, o índice de quebras/células resultou baixo. O parâmetro %A/T deve ser utilizado com reserva, porque não representa o tipo de anormalidades cromossômicas visualizadas, favorecendo o resultado de presença ou ausência de anormalidades, e sem considerar o peso de cada uma, conforme recomendado pela literatura na leitura do teste.

O valor de referência para o índice de quebras por células totais nas culturas induzidas foi retirado dos resultados dos controles positivo e

negativo. Para o controle negativo o valor de 0,08 correspondeu ao maior valor encontrado na cultura induzida e também a média mais dois desvios-padrão. O valor mínimo para o teste ser considerado positivo foi de 0,74, correspondendo ao menor valor encontrado na cultura induzida do grupo controle positivo, não podendo ser utilizado a média e desvio-padrão em virtude da alta amplitude do DP, levando a resultados de valores negativos.

Os valores, apesar de inferiores ao reportado na literatura, representaram os achados na nossa amostragem e a partir deles classificamos nossos grupos DEB positivo, negativo e duvidosos. A interpretação desse valor de referência, principalmente no grupo DEB duvidoso deve ser feita com cautela. A análise do tipo de anormalidades cromossômicas nesse grupo tem-se mostrado um indício importante de que o teste deve ser repetido. A aplicação do ESA deve ser feita nesses casos, pois demonstrou uma boa correlação com nossos casos DEB positivos. O uso desse escore pressupõe que seja preenchida uma ficha contendo dados clínicos, genéticos e hematológicos do paciente.

Basicamente as dificuldades na execução do teste de DEB, podem ser assim resumidas: aquisição e toxicidade do DEB, dificuldades no preparo do teste, leitura e interpretação, disponibilidade dos dados clínicos e genéticos do paciente para a aplicação do ESA.

Em nosso laboratório, concomitantemente ao envio da amostra ou na emissão do laudo final, encaminhamos ao clínico uma ficha para ser preenchida para posterior análise desse escore. (Figura 7).

Figura 7. Requisição para estudo citogenético com diepoxibutano (DEB). Estudo citogenético da anemia de Fanconi na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo

Nome do paciente:			
Registro HC (ou outro, favor especificar):			
Idade:	Sexo:	Etnia:	Data de nascimento:
Naturalidade:			
Nº de irmãos:			
Grau de parentesco entre os pais (consaguinidade):			
Médico responsável:			
Clínica:	Data da 1ª consulta no HC:	/	/
Hipótese diagnóstica:			
Retardo no crescimento:			
() baixa estatura () Outras – citar:-			
Alterações na pele :			
() sim () não () Não observada Qual:			
Alterações renais e urinárias :			
() sim () não () Não realizado exame de imagem Qual:			
Alterações oculares:			
() microftalmia () Outras – citar:			
Alterações nos membros superiores:			
Polegar e/ou Rádio: () sim () Não () Esquerdo () Direito			
() Outras – citar:			
Anormalias Esqueléticas: (não de rádio e polegar)			
() sim () Não Citar:			
Dificuldades no aprendizado:			
() sim () Não			
Sangue periférico			
Hb / Ht = _____ Plaquetas: _____			
Leucócitos: _____ Neutrófilos: _____ % Linfócitos _____ % Monócitos _____ %			
Aspirado medular:			
() sim () Não			
celularidade global: _____			
Dados relevantes: _____			
Biópsia: Aspirado medular			
() sim () Não			
celularidade global: _____			
Dados relevantes: _____			

A possibilidade do uso de outro agente clastogênico na complementação do DEB, principalmente nos casos duvidosos, também é um outra sugestão, ou até quem sabe na substituição do DEB. Entretanto, o uso de alguns desses agentes não são específicos para o diagnóstico da

AF. Ou seja, eles induzem quebras também não corrigidas em outras síndromes de instabilidade cromossômica. É o caso do uso da mostarda nitrogenada (MN), que é indicada no diagnóstico citogenético do Xeroderma Pigmentoso, a bleomicina, responsável pela hipersensibilidade cromossômica nas células dos portadores da Ataxia Telangectasia. A mitomicina C (MMC), assim como a MN e o DEB são os únicos clastogênicos que agem em linfócitos estimulados com PHA e em cultura de fibroblastos dos portadores da AF (COHEN et al., 1982).

Muitos são os estudos realizados que demonstram a ação dos agentes clastogênicos no diagnóstico da AF. O maior problema relatado pela pesquisadora Auerbach até 1993 tratava-se da validade do teste de DEB, principalmente naqueles pacientes sem malformações congênitas e sem manifestar alterações hematológicas. Com os vários estudos com suporte do RIAF, a partir de 1993, foi demonstradas a sensibilidade, especificidade e a reprodutibilidade do teste de DEB no diagnóstico da AF. O valor preditivo foi de 99%, indicando baixa taxa de falso negativo e falso positivos (AUERBACH, 1993).

O uso da MMC também deve ser considerado no diagnóstico da AF. Entretanto, estudos demonstram que esse agente induz quebras cromossômicas em pacientes não AF, sendo citado que cerca de 25% dos pacientes diagnosticados como não AF apresentaram esse teste positivo. A pouca sensibilidade desse agente parece ser devido ao fato de que a MMC

além da ação “cross-links” no DNA produz também “monoadducts” que fazem com que o reparo do DNA seja dificultado mesmo em indivíduos normais. A bifuncionalidade desse agente parece ser a causa do grande número de falsos-positivos. (AUERBACH, 1993).

Entretanto o uso da MMC é referido com muito sucesso no diagnóstico dos AF heterozigotos, ao contrário do DEB. A explicação para tal fato é controversa, ainda não está totalmente clara a sensibilidade desse agente nos portadores heterozigotos (GEBHART et al., 1985).

Analisando a faixa etária dos pacientes com o teste de DEB positivo, notamos que o paciente mais velho portador de AF tinha 20 anos (SC120) e o mais jovem 1 anos de vida (iAF112). Esses dois pacientes não foram avaliados clinicamente.

O escore simplificado de Auerbach (AUERBACH et al., 1989) é citado por diversos autores em seus trabalhos. O paciente que apresentar um escore de 2, 3 ou mais do que 4 tem respectivamente probabilidade de 75%, 92% e 98% de apresentar teste de DEB positivo. Aplicamos, então, esse escore em nossos grupos. O grupo DEB positivo, apresentou 100% de concordância com esse escore. Para o grupo DEB negativo, alguns casos, apresentaram um escore alto.

Analisando esses dados, achamos que a aplicação desse escore pode ser utilizado como um fator adicional para orientar o clínico na análise de DEB duvidoso.

Em relação aos nossos casos DEB duvidosos, além de aplicar o ESA, estudamos as variáveis (alterações cromossômicas) estatisticamente significante na análise multivariada, na expectativa de alguma solução para esses casos. A presença das alterações cromossômicas nessas amostras só foi possível de ser realizada em 12 casos e a conclusão final para esses ainda é obscura. Provavelmente para àqueles que apresentaram o ESA maior ou igual a 1 concomitante com alguma alteração cromossômica deverá ser repetido.

É importante salientar que todo caso DEB duvidoso deverá ter o exame repetido em data oportuna e que, o uso de outros testes (pesquisa de quebras com a MMC, estudo do ciclo celular e pesquisas de mutações gênicas), devem auxiliar a elucidação do diagnóstico da AF.

CONCLUSÕES

- Na implantação da técnica de DEB em nosso laboratório, foi fundamental a realização de culturas induzidas e não induzidas pelo agente DEB. A comparação estatística das anormalidades cromossômicas entre as duas culturas nos grupos CP E CN, mostrou que apesar da cultura sem indução não apresentar especificidade ao diagnóstico da AF, ela é estatisticamente diferente na população sem AF. A sensibilidade do DEB nos casos controle positivos demonstra o valor preditivo do uso desse agente para o diagnóstico nos casos de suspeita clínica de AF;
- Na comparação estatística, entre os três parâmetros sugeridos para a leitura do teste, em cada cultura, estabeleceu-se que o padrão mais adequado para o valor de referência, é o cálculo do índice de quebras pelo total de células analisadas da cultura com indução;
- Nossos valores de referência foram para o teste de DEB negativo àqueles inferiores ou iguais a 0,08. E para o teste positivo valores superiores a 0,74;
- Testes que apresentarem esse índice intermediário, ou seja, entre 0,08 e 0,74, serão considerados teste de DEB duvidoso para Anemia de Fanconi;

- As alterações cromossômicas comumente relacionadas com o teste de DEB positivo são: presença de cromossomos dicêntricos, de quebras cromossômicas, das figuras tri e quadrirradiais e dos rearranjos cromossômicos;
- Em todas as amostras que apresentaram teste de DEB positivo (grupo CP, AAC, SC e iAF), a frequência das alterações clínicas presentes foram as mesmas, com destaque para as alterações no crescimento, pele e presença de consangüinidade;
- Em todas as amostras que apresentaram teste de DEB positivo (grupo CP, AAC, SC e iAF), a frequência das alterações hematológicas presentes foram as mesmas, com destaque para a plaquetopenia e a hiper celularidade da MO;
- A pesquisa de quebras cromossômicas com o DEB deve ser indicada para todos os pacientes jovens e com anemia aplástica constitucional e também para os irmãos dos portadores da AF;
- A aplicação do ESA deve ser feita em todos os casos positivos e principalmente os duvidosos inclusive nos quais, tem-se a presença das alterações cromossômicas relevantes relacionadas anteriormente;

- A repetição do exame em outra amostra e utilizando um outro agente clastogênico concomitantemente ao DEB, também é recomendado, assim como a realização, se possível, de outras metodologias como a citometria de fluxo e a caracterização molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIMENA, G.; AVVISATI, G.; CUIA, M.R.; GALLO, E.; NOVELLI, G.;
DALLAPICCOLA, B. Retrospective diagnosis of a Fanconi's anemia patient by
dyepoxybutane (DEB) test results in parents. **Haematologica**, v.68, p.97-103,
1983.
- ALTER, B.P. Arm anomalies and bone marrow failure may go hand in hand. **J.
Hand Surg.**, v.17A, p.566-71, 1992.
- ALTER, B.P. ; SCALISE, A.; MCCOMBS, J. ; NAJFELD, V. Clonal chromosomal
abnormalities in Fanconi's anaemia: what do they really mean?. **Brit. J.
Haematol.**, v.85, p.627-30, 1993.
- ALTER, B.P. Fanconi's anaemia and its variability. **Brit. J. Haematol.**, v.85, p.9-
14, 1993.
- ALTER, B.P. Fanconi's Anemia and Malignancies. **Am. J. Hematol.**, v.53, p.99-
110, 1996.
- APOSTOLOU, S.; WHITMORE, A.S.; CRAWFORD, J. Positional cloning of the
Fanconi Anaemia group C gene. **Nat. Genet.**, v.14, p.324, 1996.
- ARLETT, C.F. Human DNA repair defects. **J. Inherited Metab. Dis.**, v.9, p.69-
84, 1986. Supplement 1.
- AUERBACH, A.D.; WOLMAN, S.R. Carcinogen-induced chromosome breakage
in Fanconi's anaemia heterozygous cells. **Nature**, v.271, p.69-71, 1978.

¹ De acordo com:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. **Estrutura e
apresentação de dissertações e teses**. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha. São Paulo, 1996.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS.

-
- AUERBACH, A.D.; ADLER, B.; CHAGANTI, R.S.K. Prenatal and Postnatal Diagnosis and Carrier Detection of Fanconi Anemia by a Cytogenetic Method. **Pediatrics**, v.67, p.128-35, 1981.
- AUERBACH, A.D.; ROGATKO, A.; SCHROEDER-KURTH, T.M. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. **Blood**, v.73, p.391-6, 1989.
- AUERBACH, A.D.; ALLEN, R.G. Leukemia and report of the International Fanconi Anemia Registry. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.51, p.1-12, 1991.
- AUERBACH, A.D. Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. **Leukemia**, v.6, p.1-4, 1992. Supplement 1.
- AUERBACH, A.D. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. **Exp. Hematol.**, v.23, p.731-3, 1993.
- AVERBECK, D.; PAPADOPOULOU, D; MOUSTACCHI, E. Repair of 4,5',8-trimethylpsoralen plus light-induced DNA damage in normal and Fanconi's anemia cell lines. **Cancer Res.**, v.48, p.2015-20, 1988.
- AYMÉ, S.; MATTEI, J.F.; MATTEI, M.G.; AURAN, Y.; GIRAUD, F. Nonrandom distribution of chromosome breaks in cultured lymphocytes of normal subjects. **Hum. Genet.**, v.31, p.161-75, 1976.
- BARTRAM, C.R. DNA repair: pathways and defects. **Eur. J. Pediatr.**, v.135, p.121-8, 1980.
- BEARD, M.E.J.; YOUNG, D.E.; BATEMAN, C.J.T. Fanconi's anaemia. **Q. J. Med.**, v.42, p.403, 1973.
- BERGER, R.; LE CONIAT, M.; GENDRON, M.C. Fanconi Anemia. Chromosome breakage and cell cycle studies. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.69, p.13-6, 1993.

- BERGER, A.; BUSSEL, A.; SCHENMETZLER, C.; Anomalies Chromosomies Et Anemie de Fanconi – Étude de 4 Cas. **N. Rev. Fran. d'Hematol.**, v.15, nº05, p539-550, 1975.
- BUTTURINI, A.; GALE, R.P.; VERLANDER, P.C; ADLER-BRECHER, B.; GILLIO, A.P.; AUERBACH, A.D. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: An International Fanconi Anemia Registry study. **Blood**, v.84, p.1650-5, 1994.
- CASSIMOS, C.; ZANNOS, L. Congenital hypoplastic anemia associated with multiple developmental defects (Fanconi's syndrome). **Am. J. Dis. Child.**, v.84, p.347, 1952.
- CAVENAGH, J.D.; RICHARDSON, D.S.; GIBSON, R.A.; MATHEW, C.G.; NEWLAND, A.C. Fanconi's anaemia presenting as acute myeloid leukemia in adulthood. **Brit. J. Haematol.**, v.94, p.126-8, 1996.
- CLARKE, A.A. Molecular genetics and Fanconi anaemia: new insights into old problems. **Brit. J. Haematol.**, v.103, p.287-96, 1998.
- COHEN, M.M.; FRUCHTMAN, C.E.; SIMPSON, S.J.; MARTIN, A.O. The cytogenetic response of Fanconi's anemia lymphoblastoid cell lines to various clastogens. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v.34, p.230-40, 1982.
- D'ANDREA, D.; GROMPE, M. Molecular Biology of Fanconi Anemia: Implications for Diagnosis and Therapy. **Blood**, v.90, p.1725-36, 1997.
- DAGLI, M.L.Z. Agentes antineoplásicos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. p.455.
- DRACOPOLI, N.C.; HAINES, J.L.; KORF, B.R.; MOIR, D.T.; MORTON, C.C.; SEIDMAN, C.E.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, D.R. **Current protocols in human genetics**. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. Unit. 8.7, 1994. Supplement 2.

- DE VROEDE, M.; FEREMANS, W.; DE MAERTELAERE-LAURENT, E.
Fanconi's anaemia. Simultaneous onset in 2 siblings and unusual cytological findings. **Scand. J. Haematol.**, v.28, p.431, 1982.
- DEGAN, P.; BONASSI, S.; DE CATERINA, M. In vivo accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families. **Carcinogenesis**, v.16, p.735-41, 1995.
- DOSIK, H.; STEIER, W.; LUBINIECKI, A. Inherited Aplastic Anaemia with Increased Endoreduplications: a New Syndrome or Fanconi's Anaemia Variant? **Brit. J. Haematol.**, v.41, p.77-82, 1979.
- DUCKWORTH-RYSIECKI, G.; HULTÉN, M.; MANN, J.; TAYLOR, A.M.R.
Clinical and cytogenetic diversity in Fanconi's anaemia. **J. Medical Genetics**, v.21, p.197-203, 1984.
- DUTRILLAUX, B.; FOSSE, A.M. Use of BrdU in the study of cell cycle in normal and abnormal subjects. **Ann. Genet.**, v.19, p.95, 1976.
- DUTRILLAUX, B.; AURIAS, A.; DUTRILLAUX, A.M.; BURIOT, D.; PRIEUR, M.
The Cell Cycle of Lymphocytes in Fanconi Anemia. **Hum. Genet.**, v.62, p.327-32, 1982.
- ELMORE, E.; SWIFT, M. Growth of cultured cells from patients with Fanconi anemia. **J. Cell. Physiol.**, v.87, p.229-33, 1975.
- EMERIT, I; LEVY, A.; PAGANO, G. Transferable clastogenic activity in plasma from patients with Fanconi anemia. **Hum. Genet.**, v.96, p.14-20, 1995.
- 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.; WINTER, J.; DIGWEED, M.; SAVOIA, A.; PRONK, J.; RAVEL, T.; JANSEN, S.; JOENJE, H.; GLUCKMAN, E.;

- MATHEW, C.G. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. **Blood**, v.96, p.4064-70, 2000.
- FANCONI, G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's Anemia (F.A.). **Sem. Hematol.**, v.4, p.233-40, 1967.
- FUJIWARA, Y.; TATSUMI, M.; SASAKI, M. Cross-link repair in human cells and its possible defect in Fanconi's anemia cells. **J. Molec. Biol.**, v.113, p.635-49, 1977.
- FUNDIA, A.; GORLA, N.; LARRIPA, I. Spontaneous chromosome aberrations in Fanconi's anemia are located at fragile sites and acute myeloid leukemia breakpoints. **Hereditas**, v.120, p.47-50, 1994.
- GARRIGA, S.; CROSBY, W.H. The incidence of leukemia in families of patients with hypoplasia of the marrow. **Blood**, v.14, p.1008-14, 1959.
- GEBHART, E.; KYSELA, D.; MATTHEE, H.; NIKOL, M. Cytogenetic analyses utilizing various clastogens in two sibs with Fanconi anemia, their relatives, and control individuals. **Hum. Genet.**, v.69, p.309-15, 1985.
- GERMAIN, D.; BERNHEIM, A. Chromosome instability syndromes. **Pathol. Biol. (Paris)**, v.30, p.802-16, 1982.
- GERMAN, J. Chromosome breakage syndromes: different genes, different treatments, different cancers. **Basic Life Sci.**, v.15, p.429-39, 1980.
- GIAMPIETRO, P.F.; ADLER-BRECHER, B.; VERLANDER, P.C., PAVLAKIS, S.G.; DAVIS, J.G.; AUERBACH, A.D. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. **Pediatrics**, v.91, p.1116-20, 1993.
- GIAMPIETRO, P.F.; DAVIS, J.G.; AUERBACH, A.D. Fanconi's Anemia. **N. Engl. J. Med.**, v.330, p.720-1, 1994.

- GIAMPIETRO, P.F.; VERLANDER, P.C.; DAVIS, J.G.; AUERBACH, A.D.
Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: An International Fanconi Anemia Registry study. **Am. J. Med. Genet.**, v.68, p.58-61, 1997.
- GIRAUD, F.; AYMÉ, S.; MATTEI, J.F.; MATTEI, M.G. Constitutional chromosomal breakage. **Hum. Genet.**, v.34, p.125-36, 1976.
- GRUENERT, D.C.; CLEAVER, J.E. Repair of psoralen-induced cross-links and monoadducts in normal and repair-deficient human fibroblasts. **Cancer Res.**, v.45, p.5399-404, 1985.
- HANSSON, J.; KEYSE, S.M.; LINDAHL, T. DNA excision repair in cell extracts from human cell lines exhibiting hypersensitivity to DNA-damaging agents. **Cancer Res.**, v.51, p.3384-90, 1991.
- HEINRICH, M.C.; HOATLIN, M.E.; ZIGLER, J. DNA cross-linker-induced arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. **Blood**, v.91, p.275-87, 1998.
- HILL, R.D. Familial cancer on a Scottish island. **Brit. Med. J.**, v.2, p.401-2, 1976.
- HOATLIN, M.E.; CHRISTIANSON, T.A.; KEEBLE, W.W.; HAMMOND, A.T.; ZHI, Y.; HEINRICH, M.C.; TOWER, P.A.; BAGBY, G.C., Jr. The Fanconi Anemia Group C Gene Products Is Located in Both the Nucleus and Cytoplasm of Human Cells. **Blood**, v.91, p.1418-25, 1998.
- HOJO, E.T.; VAN, D.P.; DARROUDI, F. Spontaneous chromosomal aberrations in Fanconi anaemia, ataxia telangectasia fibroblast and Bloom's syndrome lymphoblastoid cell lines as detected by conventional cytogenetic analyses and fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique. **Mutat. Res.**, v.334, 59-69, 1995.

- ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. 2.ed.
Published in collaboration with Cytogenet, Karger, Basel, 1995. 114p.
- JOENJE, H.; OOSTRA, A.B. Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi anaemia. **Hum. Genet.**, v.65, p.99-101, 1983.
- JOENJE, H.; OOSTRA, A.B. Oxygen-induced cytogenetic instability in normal human lymphocytes. **Hum. Genet.**, v.74, p.438-40, 1986.
- JOENJE, H.; OOSTRA, A.B.; WIJKER, M.; DISUMMA, F.M.; VANBERKEL, C.G.; ROOIMANS, M.A.; EBELL, W.; VANWELL, M.; PRONK, J.C.; BUCHWALD, M.; ARWERT, F. Evidence for at least eight Fanconi genes. **Am. J. Hum. Genet.**, v.61, p. 940-4, 1997.
- JONES, R. Fanconi anemia: Simultaneous onset of symptoms in two siblings [Letter]. **J. Pediatr.**, v.88, p.152, 1976.
- JOHNSON, R.A.; Wichern, D.W.; **Applied Multivariate Statistical Analysis**. New Jersey, Prentice Hall, 1992. 580p.
- KAISER, T.N.; LOJEWSKI, A.; DOUGHERTY, C. Flow cytometry characterization of the response of Fanconi's anemia cells to mitomycin C treatment. **Cytometry**, v.2, p.291-7, 1982.
- KIDSON, C. Diseases of DNA repair. **Clin. Haematol.**, v.9, p.141-57, 1980.
- KRUYT, F.A.E.; DIJKMANS, L.M.; VAN DEN BERG, T.K.; JOENJE, H. Fanconi Anemia Genes Act to Suppress a Cross-Linker-Inducible p53-Independent Apoptosis Pathway in Lymphoblastoid Cell Lines. **Blood**, v.87, p.938-48, 1996.
- KRUYT, F.A.E.; DIJKMANS, L.M.; ARMERT, F.; JOENJE, H. Involvement of the Fanconi's Anemia Protein FAC in a Pathway That Signals to the Cyclin B/cdc2 Kinase. **Cancer Res.**, v.57, p.2244-51, 1997.

- KUPFER, G.M.; D'ANDREA, A.D. The effect of the Fanconi anemia polypeptide, FAC, upon p53 induction and G2 checkpoint regulation. **Blood**, v.88, p.1019-25, 1996.
- LATT, S.A.; KAISER, T.N.; LOJEWSKI, A.; DOUGHERTY, C.; JUERGENS, L.; BREFACH, S.; SAHAR, E.; GUSTASHAW, K.; SCHRECK, R.R., POWERS, M.; LALANDE, M. Cytogenetic and flow cytometric studies of cells from patients with Fanconi's anemia. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v.33, p.133-8, 1982.
- LÉVY, J.M.; STOLL, C.; KORN, R. A case of acute leukemia in a girl with Fanconi's anemia. Review of the literature. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, v.14, p.713-20, 1974.
- LI, F.P.; POTTER, N.U. Classical Fanconi anemia in a family with hypoplastic anemia. **J. Pediatr.**, v.92, p.943, 1978.
- LI, X.; LETTEURTE, J.C.; SERGERE, J.C. Telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anemia. In: THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY 39Th ANNUAL MEETING & EXPOSITION, San Diego, CA, 1997.
- LO TEN FOE, J.R.; ROOIMANS, M.A.; BOSNOYAN-COLLINS, L. Expression cloning of cDNA for the major Fanconi anemia gene, FAA. **Nature Genet.**, v.14, p.320-3, 1996.
- LOVISETTO, P.; MAIRANO, S.; BIARESE, V. Fanconi-Zinsser disease. **Minerva Med.**, v.68, p.1685-708, 1977.
- LUBINIECKI, A.S.; BLATTNER, W.A.; DOSIK, H.; SUN, C.; FRAUMENI, J.R. SV40 T-antigen expression in skin fibroblasts from clinically normal individuals and from ten cases of Fanconi's anemia. **Am. J. Hematol.**, v.2, p.33-40, 1977.
- MAGDALENA, N.I.R. **Estudo das variações da seqüência do gene FANCA da Anemia de Fanconi**. Curitiba, 1999. 225p. Tese (Doutorado) – Setor de Ciência Biológica, Universidade Federal do Paraná.

- MEYN, M.S. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. **Science**, v.260, p.1327, 1993.
- MIGLIERINA, R.; LE CONIAT, M.; GENDRON, M.; BERGER, R. Diagnosis of Fanconi's anemia by flow cytometry. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, v.32, p.391-3, 1990.
- MIGLIERINA, R.; LE CONIAT, M.; BERGER, R. A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow cytometry. **Anal. Cell. Pathol.**, v.3, p.111-8, 1991.
- MUSTACCHI, Z.; PERES, S. **Genética baseada em evidências. Síndromes e heranças**. São Paulo, CID Editora, 2000. Cap.6, p.270-3: Estudo do cariótipo humano e principais cromossomopatias.
- NORDENSON, I. Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia. **Hereditas**, v.86, p.147-50, 1977.
- PAGANO, G.; KORKINA, L.G.; DEGAN, P.; DEL PRINCIPE, D.; LINDAU-SHEPARD, B.; ZATTERALE, A.; FRANCHESCHI, C. In vitro hypersensitivity to oxygen of Fanconi Anemia (FA) cells is linked to ex vivo evidence for oxidative stress in FA homozygotes and heterozygotes. **Blood**, v.89, p.1111-2, 1997.
- PARSHAD, R.; SANFORD, K.K.; JONES, G.M. Chromatid damage after G2 phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.80, p.5612-6, 1983.
- PASQUINI, R.; N, J.Z. **Anemia de Fanconi**, 1.ed, 2000. Cap.18, p169-79.
- POOLE, S.R.; SMITH, A.C.M.; HAYS, T.; MACGAVRAN, L.; AUERBACH, A.D. Monozygotic Twin Girls With Congenital Malformations Resembling Fanconi Anemia. **Am. J. Med. Genetics**, v.42, p.780-4, 1992.

- POOT, M.; GROSS, O; EPE, B. Cell cycle defect in connection with oxygen and iron sensitivity in Fanconi anemia lymphoblastoid cells. **Exp. Cell. Res.**, v.222, p. 262-8, 1996.
- POTTER, N.U.; SARMOUSAKIS, C.; LI, F.P. Cancer in relatives of patients with aplastic anemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.9, p.61-5, 1983.
- RIDET, A.; GUILLOUF, C.; DUCHAUD, E.; CUNDARI, E.; FIORE, M.; MOUSTACCHI, E.; ROSSELLI, F. Deregulated Apoptosis Is a Hallmark of the Fanconi Anemia Syndrome. **Cancer Res.**, v.57, p.1722-30, 1997.
- ROGATKO, A.; AUERBACH, A.D. Segregation analysis with uncertain ascertainment. Application to Fanconi anemia. **Am. J. Hum. Genet.**, v.42, p.889-97, 1988.
- ROMERO, M.G.; ORTIZ, H.C. Anemia de Fanconi. Respuesta a dosis de anabolicos y asociation com carcinoma de esofago. **Rev. Invest. Clin.**, v.36, p.353, 1984.
- ROSENDORFF, J.; BERNSTEIN, R. Fanconi's Anemia – chromosome breakage studies in homozygotes and heterozygotes. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.33, p.175-83, 1988.
- ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. 2.ed. Massachusetts, PWS Publishers, 1986. 512p.
- ROSSELLI, F.; RIDET, A.; SOUSSI, T. p53-dependent pathway of ratio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. **Oncogene**, v.10, p.9-17, 1995.
- RUPPITSCH, W.; MEISLITZER, C.; WEIRICH-SCHWAIGER, H. The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia. **Hum. Genet.**, v.99, p.710-9, 1997.
- SASAKI, M.S. Fanconi's anemia defective in a process essential to the repair of DNA cross links? **Nature**, v.257, p.501-3, 1975.

-
- SASAKI, M.S. Chromosome aberration formation and sister chromatid exchange in relation to DNA repair in human cells. **Basic Life Sci.**, v.15, p.285-313, 1980.
- SCHINDLER, D.; KUBBIES, M.; HOEHN, H.; SCHINZEL, A.; RABINOVITCH, P.S. Presymptomatic diagnosis of Fanconi's anaemia [Letter]. **The Lancet**, v.I, p. 937, 1985.
- SCHINDLER, D.; HOEHN, H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. **Am. J. Hum. Genet.**, v.43, p.429-35, 1988.
- SCHROEDER, T.M.; ANSCHÜTZ, F.; KNOPP, A. Spontane chromosomenaberrationen bei familiärer panmyelopathie. **Humangenetik**, v.1, p.194-6, 1964.
- SCHROEDER, T.M.; TILGEN, D.; KRÜGER, J. Formal genetics of Fanconi's anemia. **Hum. Genet.**, v.32, p.257-88, 1976a.
- SCHROEDER, T.M.; DRINGS, P.; BEILNER, P.; BUCHINGER, G. Clinical and cytogenet observations during a six-year period in an adult with Fanconi's anaemia. **Blut.**, v.34, p.119-32, 1976b.
- SCHROEDER, T.M. Genetically determined chromosome instability syndromes. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v.33, p.119-32, 1982.
- SCHULER, D.; KISS, A.; FÁBIÁN, F. Chromosomal peculiarities and "in vitro" examinations in Fanconi's Anaemia. **Humangenetik**, v.7, p.314-22, 1969.
- 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, p.2233-7, 1995.
- SKIKNE, B.S.; LYNCH, S.R.; BEZWODA, W.R. Fanconi's anaemia, with special reference to erythrokinetic features. **South Afr. Med. J.**, v.53, p.43, 1978.

- STIVRINS, T.J.; DAVIS, R.B.; SANGER, W.; FRITZ, J.; PURTILO, D.T.
Transformation of Fanconi's anemia to acute nonlymphocytic leukemia associated with emergence of monosomy 7. **Blood**, v.64, p.173-6, 1984.
- STRATHDEE, C.A.; GAVISH, H.; SHANNON, W.R. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. **Nature**, v.356, p.763-7, 1992.
- SWIFT, M. R. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. **Nature**, v.230, p.370-3, 1971.
- SWIFT, M.R.; COHEN, J.; PINKHAM, R. Maximum-likelihood method for estimating the disease predisposition of heterozygotes. **Am. J. Hum. Genet.**, v.26, p.304-17, 1974.
- SWIFT, M.; CALDWELL, R.J.; CHASE, C. Reassessment of cancer predisposition of Fanconi anemia heterozygotes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.65, p.863-7, 1980.
- THERMAN, E.; SUSMAN, M. Cromosomas humanos: estrutura, comportamiento y efectos. Trad. de Máximo E. Drets. 3.ed. Ribeirão Preto, **Rev. Bras. Genética**, 1996. Cap.9, p.95-106: Aberraciones estructurales de los cromosomas.
- TOMASSETTI, P.; COMETA, G.; DEL VECCHIO, E. BASERGA, M.; FACCIOLI, P.; BOSONI, D.; PAOLUCCI, G.; BARBARA, L. Chromosomal instability in multiple endocrine neoplasia type 1. Cytogenetic evaluation with DEB test. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.79, p.123-6, 1995.
- VARON, R.; PLATZER, M.; CEROSALETTI, K.M. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. **Cell**, v.93, p.467-76, 1998.

- VERLANDER, P.C.; LIN, J.D.; UDONO, U.M.; ZHANG, Q.; GIBSON, R.A.; MATHEW, C.G.; AUERBACH, A.D. Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. **Am. J. Hum. Genet.**, v.54, p.594-601, 1994.
- VOSS, R.; KOHN, G.; SHANAM, M. Prenatal diagnosis of Fanconi anemia. **Clin. Genet.**, v.20, p.185-90, 1981.
- WEKSBERG, R.; BUCHWALD, M.; SARGENT, P. Specific cellular defects in patients with Fanconi anemia. **J. Cell. Physiol.**, v.101, p.311-23, 1979.
- YAMASHITA, T.; WU, N.; KUPFER, G.; CORLESS, C.; JOENJE, H.; GROMPE, M.; D'ANDREA, A.D. Clinical Variability of Fanconi Anemia (Type C) Results From Expression of an Amino Terminal Truncated Fanconi Anemia Complementation Group C Polypeptide With Partial Activity. **Blood**, v.87, p.4424-32, 1996.
- YOUNG, N.S.; ALTER, B.P. **Aplastic anemia acquired and inherited**. 1.ed. W. B. Saunders Company, 1994. Cap.14, p.275-309: Clinical features of Fanconi's anemia. Cap.15, p.310-24: Pathophysiology of Fanconi's anemia.
- ZAKRZEWSKIS, S.; SPERLING, K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. **Hum. Genet.**, v.56, p.81-4, 1980.
- ZHEN, W.; EVANS, M.K.; HAGGERTY, C.M. Deficient gene specific repair of cisplatin-induced lesions in Xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia cell lines. **Carcinogenesis**, v.14, p.919-24, 1993.