

Avaliação da frequência de anormalidades cromossômicas em pacientes com suspeita de Anemia de Fanconi em culturas de linfócitos espontâneas e induzidas com diepoxibutano

Evaluation of chromosomal abnormalities frequency in patients suspected with Fanconi Anemia in spontaneous and induced with diepoxybutane lymphocyte cultures

Fabiana Guichard de Abreu¹, Alana Schraiber Colato¹, Mariana Severiano Dias², Valesca Veiga Cardoso³

¹Mestre em Biociências e Reabilitação, Centro Universitário Metodista, IPA

²Biomédica, Hospital Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre

³Professora Doutora em Genética e Biologia Molecular, Centro Universitário Metodista, IPA

Resumo

Introdução: anemia de Fanconi (AF) é uma desordem autossômica recessiva rara, associada com fragilidade cromossômica, falência de medula óssea, câncer e anormalidades congênitas. É caracterizada pela incapacidade de reparar danos no DNA induzidos por agentes como o diepoxibutano (DEB). **Objetivo:** este estudo objetivou avaliar frequências de anormalidades cromossômicas espontâneas e induzidas por DEB e a prevalência da doença em pacientes com suspeita de AF do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Metodologia:** durante o período analisado, 50 pacientes foram incluídos no estudo por apresentarem suspeita da doença. Foi realizada uma revisão de seus prontuários, bem como o teste para diagnóstico de AF. O teste consistiu em analisar o cariótipo de instabilidade cromossômica, sendo realizadas duas culturas de linfócitos: uma cultura espontânea e uma cultura induzida com DEB de concentração final 0,1 µg/mL. **Resultados:** um total de 11 pacientes tiveram o diagnóstico confirmado devido ao elevado número de alterações cromossômicas, obtendo-se prevalência de 22%. Encontramos diferença significativamente maior na frequência de anormalidades cromossômicas quando comparamos os pacientes positivos com os negativos nas culturas espontâneas e induzidas com DEB ($p < 0,001$). A alteração clínica mais observada nos pacientes com AF foi a anemia aplásica. **Conclusão:** foi fundamental a realização de cultura induzida e não induzida, mostrando que apesar da cultura sem indução não apresentar especificidade ao diagnóstico da AF, ela é estatisticamente diferente quando comparamos pacientes positivos e negativos. A sensibilidade do DEB nas culturas dos pacientes com AF demonstra o valor preditivo de seu uso para o diagnóstico, demonstrando a importância da padronização deste teste para o diagnóstico.

Palavras-chave: Instabilidade cromossômica. Cariótipo. Anemia aplásica.

Abstract

Background: fanconi anemia (FA) is a rare autosomal recessive disorder associated with chromosomal fragility, bone marrow failure, cancer and congenital abnormalities. It is characterized by the inability to repair DNA damage induced by agents such as diepoxybutane (DEB). **Objective:** this study aimed to evaluate the frequency of spontaneous and induced by DEB chromosomal abnormalities and prevalence of the disease in patients with suspected FA in Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Methodology:** during the study period, 50 patients were included in the study because they were suspected of disease. We conducted a review of their medical records, as well as testing for diagnosis of AF. The test consisted in the karyotype analysis of chromosomal instability, with two lymphocyte cultures: spontaneous and induced culture with DEB final concentration of 0.1 mg/mL. **Results:** a total of 11 patients had the diagnosis confirmed due to a high number of chromosomal changes, obtaining a prevalence of 22%. We found significantly higher difference in the frequency of chromosomal abnormalities when compared spontaneous and induced with DEB cultures in positive and negative patients ($p < 0.001$). The most frequently observed clinical manifestation in FA patients was aplastic anemia. **Conclusion:** it was essential to perform the induced and not induced culture, demonstrating that despite culture without induction does not provide specificity for the diagnosis of FA, it is statistically different when comparing positive and negative patients. The sensitivity of DEB in cultures of patients with AF demonstrated the predictive value of their use, demonstrating the importance of standardization of this test for diagnosis.

Keywords: Chromosomal Instability. Karyotype. Anemia, Aplastic.

INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma desordem autossômica recessiva rara (KENNEDY e D'ANDREA, 2005), genética e fenotipicamente heterogênea, mais frequentemente associada com fragilidade cromossômica, falência de medula óssea com início geralmente na infância, câncer e anormalidades congênitas. Estas incluem: anomalias no desenvolvimento (envolvem principalmente a cabeça e a face), anomalias gastrointestinais, malformações esqueléticas (particularmente no eixo radial), retardo no crescimento, hiperpigmentação da pele (manchas café au lait) e defeitos renais, oculares, genitais e cardíacos (DOKAL, 2008). Também, a fertilidade é diminuída, e em pacientes do sexo feminino ocorre um aparecimento tardio da menstruação e ainda menopausa precoce (FANCONI ANEMIA RESEARCH FUND, INC., 2008).

Esta doença já foi classificada em quinze subtipos (STOEPKER et al., 2011), acomete igualmente homens e mulheres e é encontrada em todos os grupos étnicos (FANCONI ANEMIA RESEARCH FUND, INC., 2008). Sua frequência é de aproximadamente 1/360.000 pessoas (PASQUINI et al., 2003) e sua prevalência é cerca de 1 a cada 5 milhões de nascimentos. Já a frequência de heterozigotos é estimada de 1 em 300 - para todos os alelos da doença em conjunto - na Europa e nos Estados Unidos (SEAL et al., 2003).

As alterações no sistema hematológico são as características clínicas mais importantes e estas são responsáveis pela maior causa de mortalidade destes indivíduos. Tornam-se evidentes pouco tempo após o nascimento, e a primeira alteração encontrada é a macrocitose, seguida de trombocitopenia até a pancitopenia, que ocorre em média aos 7 anos de idade (FERDERMAN et al., 2005). Além disto, pacientes com AF podem apresentar anemia aplásica, síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda (OWEN; FROHN-MAYER; EILER, 2003).

Uma parcela significativa de aproximadamente 30% dos pacientes com AF não possui anormalidades somáticas aparentes. Neste caso, a AF só é detectada com o surgimento dos sintomas hematológicos (DOKAL, 2008).

Adicionalmente, a AF é caracterizada pela incapacidade de reparar danos no DNA induzidos por agentes cross-links como a mitomicina C (MMC) ou diepoxibutano (DEB) (SHIMAMURA, 2006). A análise com DEB é o teste de escolha para o diagnóstico, pois outros agentes têm maiores taxas de falso-positivos e falso-negativos (AUERBACH, 2003). Quando expostas a estes agentes, as células dos pacientes com AF manifestam quebras cromossômicas e fusões com formas radiais características, consistentes com a subjacente instabilidade genômica (SHIMAMURA, 2006).

Para realizar este teste utiliza-se uma amostra de sangue periférico do paciente (AUERBACH, 2003). A análise é feita através da contagem do número de cro-

mossomos e observação específica de cada um, para que possa ser visualizado qualquer tipo de falha, quebra ou rearranjo que tenha sido provocado pelo agente químico (AUERBACH et al., 1989).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as frequências de anormalidades cromossômicas espontâneas e induzidas por diepoxibutano (DEB) em pacientes com suspeita de AF do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), bem como avaliar a prevalência de pacientes positivos para a doença na população estudada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos no estudo 50 pacientes com suspeita de AF encaminhados ao Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética Médica (SGM), localizado no HCPA. Os pacientes tiveram seus dados clínicos e laboratoriais obtidos de seus prontuários perante a aprovação do projeto junto aos comitês de ética em pesquisa das instituições envolvidas no estudo.

A obtenção do material para o estudo do cariótipo foi realizada através da punção venosa de sangue periférico (5 mL) anticoagulado com heparina.

Para a cultura de linfócitos foram utilizados os componentes RPMI 1640, Soro Bovino Fetal (20%) e Fito-hemaglutinina para estimular a divisão dos linfócitos.

Foram realizadas duas culturas de linfócitos, sendo uma delas a cultura não induzida, ou seja, sem o uso de DEB, demonstrando as anormalidades cromossômicas espontâneas, e a outra a cultura induzida, que adicionamos o agente genotóxico DEB com concentração final de 0,1µg/mL (PEARSON et al., 2001).

Após o preparo das culturas de linfócitos, estas permaneceram na estufa a 37°C durante 24h. Posteriormente, foi acrescentado o DEB somente na cultura induzida. As culturas retornaram para a estufa para serem incubadas a 37°C por 48h, completando um tempo total de cultivo de 72h.

Foi acrescentado colchicina em cada cultura e estas permaneceram na estufa por mais 50 minutos. Então, as amostras foram tratadas com KCL (cloreto de potássio – solução hipotônica) e fixadas com solução fixadora (solução de Carnoy).

Para a análise do cariótipo foram preparadas lâminas de cada cultura coradas de acordo com a técnica de bandeamento G, que permite a visualização de bandas nos cromossomos (regiões claras e escuras) pela ação da tripsina que degrada as proteínas. A coloração das lâminas foi feita com o Azul de Metileno (Giemsa) para posterior visualização em microscópio óptico.

Em relação à leitura do teste, neste estudo o parâmetro utilizado foi o cálculo do índice de quebras por células totais: somatória das pontuações das anormalidades visualizadas nas metáfases, dividido pelo número das metáfases analisadas (Tabela 1) (AUERBACH, 1993).

Tabela 1. Valores de referência padronizados por Auerbach (1993) para o teste com diepoxibutano para diagnóstico de Anemia de Fanconi.

Parâmetro	Diagnóstico	Escore Mínimo de alterações cromossômicas	Escore Máximo de alterações cromossômicas
Quebras por células	Positivo	1,30	23,90
	Negativo	0,00	0,36

Para cada tipo de anormalidade cromossômica é atribuído um valor para que seja realizado o cálculo (Tabela 2).

Tabela 2. Valores atribuídos para cada tipo de anormalidade cromossômica para o cálculo da frequência das mesmas para o diagnóstico de Anemia de Fanconi.

Variantes Cromossômicas	Pontuações
Cromossomo em anel	2
Cromossomo dicêntrico	2
Fragmentos	1
Falhas de cromátides	0
Quebras de cromátides	1
Falha de cromossomo	0
Quebra de cromossomo	1
Figura triradial	2
Figura quadriradial	2
Rearranjo	2

A análise estatística para avaliar as médias das frequências de anormalidades cromossômicas entre os pacientes positivos e negativos para AF foi realizada através do teste não paramétrico Teste U de Mann-Whitney, enquanto que os dados hematológicos foram comparados através do Teste t de Student, considerando-se significativo um valor de $p < 0,05$. Os dados estão apresentados em média \pm erro padrão. Para as análises foi utilizado o programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 18.0.

RESULTADOS

Durante o período analisado, 50 pacientes foram incluídos no estudo por terem suspeita de Anemia de Fanconi. Entretanto, 7 pacientes tiveram seus exames cancelados devido a falta de qualidade da amostra ou da cultura para a análise, necessitando assim de uma nova colheita para a realização do exame de cariótipo para instabilidade cromossômica.

Nesta população de pacientes diagnosticados como positivos ou negativos para a doença, a idade variou de 1 dia de vida a 35 anos (média de 11,6 anos). Em relação ao gênero, a população estudada apresentou uma distribuição de 24 pacientes do sexo masculino e 19 do sexo feminino.

Onze pacientes tiveram o diagnóstico de AF confirmado, por apresentarem um elevado número de quebras cromossômicas. Sendo assim, a prevalência de AF em pacientes com suspeita da doença, atendidos no HCPA foi de 22%. A população positiva para AF apresentou idade variando entre um dia de vida a 31 anos (média de 11 anos), sendo 7 pacientes do sexo masculino e 4 pacientes do sexo feminino, tendo assim uma relação homens:mulheres de 1,75:1.

A frequência de anormalidades cromossômicas induzidas por DEB, bem como a frequência de quebras cromossômicas espontâneas em indivíduos positivos, foi significativamente maior do que a frequência nos indivíduos negativos (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação das frequências de anormalidades cromossômicas por célula nas culturas espontânea e induzida com diepoxibutano entre os indivíduos positivos e negativos para Anemia de Fanconi.

Diagnóstico para Anemia de Fanconi (n)	Frequências Espontâneas	Frequências com DEB	p
Positivos (11)	0,46±0,09	0,80±0,06	<0,001*
Negativos (32)	0,01±0,004	0,07±0,002	<0,001*

*Considerado significativo $p < 0,05$, Teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados em média erro padrão. DEB: diepoxibutano.

As alterações clínicas mais observadas nos pacientes com AF foram anemia aplásica e malformações esqueléticas (Tabela 4). Alguns pacientes negativos para AF possuíam retardo mental (3), enquanto esta característica não foi observada nos pacientes positivos deste estudo.

Tabela 4. Alterações clínicas frequentemente observadas em pacientes com suspeita de AF.

Características Clínicas	AF (n=11)	Não AF (n=32)
Anemia Aplásica	45,4% (5)	15,6% (5)
Baixa estatura	18,2% (2)	12,5% (4)
Hiperpigmentação	18,2% (2)	6,2% (2)
Malformações no esqueleto	36,4%(4)	21,9% (7)
Malformação Renal	18,2% (2)	3,1% (1)
Retardo Mental	0	9,4% (3)
Consanguinidade	18,2% (2)	6,2% (2)

AF: Anemia de Fanconi

Apesar dos pacientes encaminhados com suspeita da doença apresentarem na maioria das vezes alterações hematológicas, quando comparamos os dois grupos de pacientes em relação aos parâmetros hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e plaquetas (Tabela 5), apenas no último parâmetro citado encontramos uma diferença significativa ($p=0,029$).

Tabela 5. Comparação de parâmetros hematológicos entre os pacientes positivos e negativos para Anemia de Fanconi.

Parâmetros	Pacientes positivos	Pacientes Negativos	p
Hemoglobina (g/dL)	9,30 ± 0,60	11,04 ± 0,51	0,113
Hematócrito (%)	27,97 ± 1,68	33,31± 1,53	0,100
Leucócitos Totais (μL)	5927,00 ± 1289,40	6691,00 ± 635,05	0,614
Plaquetas (μL)	84667,00 ± 25609	174609,00 ± 22243,29	0,029*

*Considerado significativo $p < 0,05$, Teste t de Student para amostras independentes. Dados apresentados em média±erro padrão.

Com relação às transfusões sanguíneas dos pacientes positivos, 54,5% (6) receberam concentrado de hemácias e plaquetas, enquanto no grupo dos negativos em apenas 18,8% (6) houve esta necessidade. No medulograma ou na biópsia de medula óssea, 27,3% (3) dos pacientes positivos e 21,8% (7) dos negativos apresentaram hipocelularidade.

Além disso, no grupo de pacientes positivos, um deles desenvolveu leucemia mielóide aguda e dois pacientes desenvolveram síndrome mielodisplásica obtendo-se a porcentagem de 9,1% e 18,2%, respectivamente.

DISCUSSÃO

Obtivemos em nosso estudo 11 pacientes diagnosticados com o teste de instabilidade cromossômica, resultando em uma prevalência de 22% (11/50) de casos positivos para AF. Os resultados apresentados assemelham-se ao estudo realizado por Tootian et al. (2006), quando dos 318 pacientes suspeitos, 61 tiveram confirmados o diagnóstico de AF (19,2%).

Em estudo de Sagaseta de Ilurdoz et al. (2003) foi observada uma proporção de 3:1 (homens:mulheres), enquanto Donato (2007) demonstrou uma proporção aproximada de 1,3:1, corroborando com o nosso estudo, que caracterizou-se por uma proporção um pouco mais elevada de homens em relação as mulheres (1,75:1).

Em 1964 foi descrita a presença de quebras cromossômicas espontâneas na cultura de linfócitos de pacientes com AF. Entretanto, em 1976 foi demonstrado que pacientes sem AF podem apresentar aumento na frequência de quebras espontâneas cromossômicas sem correspondência fenotípica, denominada como “fragilidade cromossômica constitucional”, levando a evidências de que este método não pode ser utilizado isoladamente para o diagnóstico de AF (CAPUTO, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002 – dados não publicados).

Já em 1981 foi desenvolvido o teste citogenético utilizando DEB com o intuito de aumentar o nível destas anormalidades cromossômicas, sendo este achado patognomônico dessa doença. 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). Sendo assim, é crucial para a realização do teste que o material seja colhido e processado adequadamente, contribuindo para uma boa análise.

Em nossos resultados para a frequência de anormalidades cromossômicas observamos um escore mínimo menor que o estabelecido anteriormente por Auerbach e colaboradores para definir o resultado do teste. Este resultado está de acordo com os encontrados por Caputo (2002), em que também foi observado um escore mínimo menor de alterações no cariótipo. A frequência de anormalidades cromossômicas nas culturas espontâneas encontradas neste estudo estão de acordo

com os resultados encontrados por Pearson et al. (2001), no qual encontraram uma média±desvio padrão de $0,02\pm 0,02$ para os seus controles negativos.

Para o diagnóstico de pacientes que apresentam mosaicismos, a porcentagem de células com anormalidades pode ser mais útil que o número de quebras por células, já que estes pacientes com mosaicismos somáticos hematopoiético possuem células normais e células afetadas. Assim os pacientes podem apresentar poucas células com quebras, podendo cair o valor para uma faixa normal. Deve ser salientado que existem outras doenças raras como a Síndrome de Quebras de Nijmegen, na qual as quebras cromossômicas são positivas com DEB ou MMC, porém o paciente não possui AF (OWEN; FROHN-MAYER; EILER, 2003). Por isso, a correlação com as características clínicas é muito importante e não deve ser descartada.

A incidência de alterações hematológicas em AF é em torno de 90%, em que no nascimento as contagens no sangue apresentam características usualmente normais, entre os 5 e 10 anos de idade são observadas as primeiras alterações, na qual a macrocitose é geralmente a primeira alteração a ser detectada seguida pela trombocitopenia e anemia, até chegar à típica pancitopenia observada nesta doença, tendo uma média inicial aos 7 anos (AUERBACH, 1993).

Em um estudo realizado em 2003, a incidência cumulativa para o desenvolvimento de leucemia em AF ficou em torno de 10%, sendo similar a incidência que encontramos nos pacientes positivos em nosso estudo (9,1%) (ALTER, 2003).

CONCLUSÃO

No presente estudo 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 de pacientes positivos e negativos mostrou que apesar da cultura sem indução não apresentar especificidade ao diagnóstico da AF, ela é estatisticamente diferente quando comparamos os dois grupos. A sensibilidade do DEB nas culturas dos pacientes com AF demonstra o valor preditivo do uso desse agente nos casos de suspeita clínica da doença, bem como é essencial a padronização do teste para o diagnóstico. Quanto aos pacientes que apresentam mosaicismos, o que pode levar a um resultado falso-negativo no teste, é importante que seja avaliado o histórico clínico e o progresso na área molecular, para ajudar na pesquisa de genes candidatos responsáveis pela doença.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Citogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS/Brasil.

REFERÊNCIAS

ALTER, B.P. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer*, Philadelphia, v. 97, n. 2, p. 425-40, 2003.

- AUERBACH, A.D. Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet.*, New York, Chapter 8, Unit 8-7, Jul. 2003.
- AUERBACH, A.D.; ROGATKO, A.; SCHROEDER-KURTH, T.M. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood*, New York, v. 73, n. 2, p. 391-6, 1989.
- AUERBACH, A.D. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp. Hematol.*, Copenhagen, v. 23, n. 6, p. 731-3, 1993.
- BERGER, R.; LE CONIAT, M.; GENDRON, M.C. Fanconi Anemia. Chromosome breakage and cell cycle studies. *Cancer Genet. Cytogenet.*, New York, n. 1, v. 69, p. 13-6, 1993.
- DOKAL, I. Fanconi anemia is a highly penetrant cancer susceptibility syndrome. *Haematologica*, Pavia, v. 93, n. 4, p. 486-89, 2008.
- DONATO, A.O. Anemia de Fanconi. In: *Salud & Sociedad*, 2007. Disponível em: <<http://www.salud.bioetica.org/fanconi.htm>>. Acesso em: 15 nov 2009.
- FANCONI ANEMIA RESEARCH FUND, INC.. **What is Fanconi Anemia?** Disponível em: <http://www.fanconi.org/index.php/learn_more>. Acesso em: 04 set 2012.
- FEDERMAN, N.; SAKAMOTO, K.M. Topics in pediatric leukemia-Fanconi's anemia: new insights. *MedGenMed.*, New York, v. 7, n. 23, 2005.
- GEBHART, E.; KYSELA, D.; MATTHEE, H. Cytogenetic analyses utilizing various clastogens in two sibs with Fanconi anemia, their relatives, and control individuals. *Hum. Genet.*, Berlin, v. 69, n. 4, p. 309-15, 1985.
- KENNEDY, R.D. e D'ANDREA, A. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes & Dev.*, New York, v. 19, n. 24, p. 2925-40, 2005.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, New York, v. 20, n. 1, p. 613-17, 1960.
- PASQUINI, R.; Z.NETO, J.; MEDEIROS, C.R. Carcinoma de células escamosas em língua pós transplante de medula óssea por Anemia de Fanconi. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 239-46, 2003.
- PEARSON, T.; JANSEN, S.; HAVENGA, C. Fanconi anemia: a statistical evaluation of cytogenetic results obtained from South African families. *Cancer Genet. Cytogenet.*, New York, v. 126, n. 1, p. 52-5, 2001.
- SAGASETA DE ILURDOZ, M.; MOLINA, J.; LEZÁUN, I.; Anemia de Fanconi. Consideraciones actuales Updating Fanconi's anaemia. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, Navarra, v. 26, n. 1, p.63-78, 2003.
- SEAL, S.; BARFOOT, R.; JAYATIKAKE, H. Evaluation of Fanconi anemia genes in familial breast cancer predisposition. *Cancer Research*, v. 63, n. 24, p. 8596-99, 2003.
- SHIMAMURA, A. Inherited Bone Marrow Failure Syndromes: Molecular Features. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, Washington, p. 63-71, 2006.
- OWEN, J.; FROHNMAYER, L.; EILER, M. E. **Fanconi Anemia**: standards for clinical care. Philadelphia: Pennsylvania State University, 2003.184 p.
- STOEPKER, C.; HAIN, K.; SCHUSTER, B. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nat. Genet.*, New York, v. 43, n. 2, p. 138-41, 2011.
- TOOTIAN, S.; MAHJoubi, F.; RAHNAMA, M. Cytogenetic investigation in Iranian patients suspected with Fanconi anemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, New York, v. 28, n. 12, p. 834-6, 2006.

Submetido em 26.08.2013;

Aceito em 25.10.2013.