

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**  
**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR**  
**CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**LEONE MALTZ BORGES DA SILVA**

**ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS RADIOINDUZIDAS**  
**NA IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS HETEROZIGOTOS**  
**PARA ANEMIA DE FANCONI**

**RECIFE**

**2017**

**LEONE MALTZ BORGES DA SILVA**

**ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS RADIOINDUZIDAS  
NA IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS HETEROZIGOTOS  
PARA ANEMIA DE FANCONI**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

**Linha de Pesquisa:** Biodosimetria.

**Orientador:** Prof. Dr. Ademir Amaral

**Coorientadora:** Profa. Dra. Marcela Maria  
Pereira de Lemos Pinto

**RECIFE**

**2017**

S586a Silva, Leone Maltz Borges da.  
Alterações cromossômicas radioinduzidas na identificação de indivíduos heterozigotos para anemia de Fanconi / Leone Maltz Borges da Silva. - 2017.  
77 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral.  
Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2017.  
Inclui Referências e Apêndices.

1. Energia Nuclear. 2. Fragilidade cromossômica. 3. Anemia de Fanconi. 4. Radiação ionizante. 5. Heterozigosidade. I. Amaral, Ademir de Jesus. (Orientador). II. Pinto, Marcela Maria Pereira de Lemos. (Coorientadora). III. Título.

UFPE

612.01448 CDD (22. ed.)

BCTG/2017-411

# Alterações Cromossômicas Radioinduzidas na Identificação de Indivíduos Heterozigotos para Anemia de Fanconi

Leone Maltz Borges da Silva

**APROVADA EM: 20.09.2017**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Profa. Dra. Simey de Souza Leão Pereira Magnata**  
– CAV/UFPE

---

**Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro** –  
Odontologia/UFPE

---

**Profa. Dra. Terezinha de Jesus Marques Salles** –  
CEONHPE/UPE

**Visto e permitida a impressão**

---

**Coordenador(a) do PROTEN/DEN/UFPE**

**Dedico aos meus pais, Joelma e Josian; à minha avó Erunides Assis; aos meus cães, Marley e Jasmin; à minha namorada, Ane; aos meus sobrinhos, Daniel e Matheus e ao meu irmão Humberto.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus o fôlego de vida; a força de todas as manhãs, obediência e, sobretudo, paciência.

Agradeço à minha avó Erunides Assis todos os ensinamentos de compaixão, sem dúvidas, para mim, é o melhor exemplo de mulher no planeta. Uma pessoa importantíssima em minha vida. Agradeço o carinho, toda ternura que me deu. Mulher de valor, maravilhosa, meu amor, meu grande amor.

Aos meus pais, Joelma e Josian, a criação com muito amor, cuidado na hora certa para dormir, disciplina, correção e, sobretudo, preocupação para que eu tivesse uma vida melhor. Obrigado, mãe, a senhora nunca mediu esforços para me dar o melhor em meio às dificuldades. Obrigado, pai, o senhor sempre entendeu meus problemas acadêmicos, estresses, dando-me conselho para que eu não perdesse o controle, pedindo calma. Agradeço a belíssima educação!

Ao meu irmão Humberto Gessinger, inúmeras vezes contribuiu financeiramente para que eu pudesse continuar estudando, como: equipamentos para montar meu quarto de estudos, lanches, etc. Foram momentos difíceis no início, mas importante para que eu desse mais valor à conquista de hoje

A minha namorada linda e maravilhosa, Claudiane Soares, os conselhos, auxílio na organização financeira, de trabalho, da casa, de tudo. Ela continua integralmente presente em minha vida, do final da graduação à conclusão do mestrado. Sem dúvidas, tem grande contribuição neste trabalho.

Agradeço ao professor orientador, Ademir de Jesus Amaral, a oportunidade e confiança em meu trabalho.

Agraço à professora e coorientadora, Marcela Pinto, a confiança em meu trabalho, discussões em prol de melhorá-lo, sempre pronta para me ajudar; dicas de como fazer construir belíssimos gráficos. Agradeço todas as ideias.

A professora e amiga que me orientou no meu primeiro projeto de iniciação científica, Edvane Borges. Agradeço a Deus, aqui mesmo, pois ele colocou pessoas especiais em minha vida, como a professora Edvane Borges, sempre preocupada com o meu bem-estar, em me levar ao HEMOPE, para coletar as amostras de pacientes, e IMIP, para irradiar as amostras. Ou seja, a contribuição no trabalho foi direta. Obrigado, professora!

A professora Simey, pois me incentivou, ajudou e acompanhou todo o trajeto do meu trabalho, do início ao fim.

A Dona Lia, ao Josenildo e Edjan Lopes, sempre muito receptivos, a postos quando todos precisam.

Os momentos de distração, conversas científicas aos meus amigos do lambda, Amanda Iumatti, Lídia Leite, Denise Fidelis, Liderlânio e Ayalla.

Obviamente, aos meus preciosos amores, Marley, que sempre estão me esperando para fazer festa, momentos felizes, fiel e companheiro. Jasmin, minha flor, meu amor, também sempre me esperando chegar da faculdade. E ao meu sobrinho Daniel, que é precioso aos meus olhos também, sempre me chamando para brincar nos finais de semana. Os três nunca me deixaram só, corações puríssimos. Nunca recebi tanto amor como recebo deles. Nem sabem, mas me passaram forças sobrenaturais para que eu continuasse lutando.

De modo geral, quero agradecer a todos que participaram desta conquista, diretamente ou indiretamente. Todos são de total importância nesta vitória.

**“Deus me enviou ao mundo com uma missão. Só Ele pode me deter, os homens nunca.”**

**(Bob Marley)**

## RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença resultante de fragilidade cromossômica, associada a falhas no mecanismo de reparo celular, com padrão de herança autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X. Um dos grandes desafios é o seu diagnóstico, uma vez que esta doença rara possui extensa variabilidade fenotípica. Os testes laboratoriais para o fechamento de diagnóstico de AF utilizam agentes clastogênicos, a exemplo do DEB – Diepoxibutano e MMC – Mitomicina C. Entretanto, estes testes não identificam indivíduos heterozigotos para AF. Uma metodologia recentemente proposta, que utiliza a radiação gama em substituição ao DEB ou a MMC (Depósito de patente sob Nº BR10 2013 0256684), poderá ampliar significativamente as possibilidades para diagnóstico laboratorial desta síndrome. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a viabilidade do teste de fragilidade cromossômica, com a utilização das radiações ionizantes como agente clastogênico, a fim de identificar indivíduos heterozigotos para AF. Para tanto, foram estudados 3 grupos de indivíduos: indivíduos normais (N), pacientes AF positivos e pais desses pacientes, que são heterozigotos para AF (HAF). De cada voluntário, foram coletadas amostras de sangue periférico e separadas em 2 alíquotas, sendo uma irradiada e a outra mantida como controle (não irradiada). Em seguida, foi utilizada a metodologia de quantificação de aberrações cromossômicas instáveis em células linfocitárias, por microscopia óptica de campo claro, a partir de amostras de sangue periférico irradiadas. A análise estatística dos resultados indicou que é possível diferenciar, ao nível de significância de 5%, o grupo N do grupo HAF, após a irradiação das amostras. Comparando-se as análises dos grupos AF e HAF, constatou-se que as frequências de dicêntricos, fragmentos, quebras e falhas cromossômicas apresentaram resultados semelhantes. Todavia, apenas os pacientes AF apresentaram figuras radiais, aspecto este que permitiu diferenciar esses dois grupos (AF e HAF). Os resultados alcançados nesta pesquisa indicam a viabilidade de utilização das radiações ionizantes, como agente clastogênico, em testes laboratoriais para caracterização de indivíduos HAF. O teste de sensibilidade às radiações ionizantes poderia ser empregado em programas preventivos envolvendo grupos de risco (famílias com histórico genealógico e descendentes de casamentos consanguíneos), uma vez que a identificação desses indivíduos (AF, e HAF) contribuiria para um melhor acompanhamento e prevenção de doenças relacionadas a genes mutantes inerentes de pacientes AF, bem como no aconselhamento genético.

**Palavras-chaves:** Fragilidade cromossômica. Anemia de Fanconi. Radiação Ionizante. Heterozigosidade.

## ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a disease related to chromosomal fragility, associated with defects in the cellular repair mechanism, having an autosomal recessive inheritance pattern or attached to the X-chromosome. This rare disease has extensive phenotypic variability, demanding laboratory tests for an accurate diagnosis. These tests generally use clastogenic agents, namely DEB - Diepoxybutane or MMC - Mitomycin C. However, the current exams don't identify heterozygous individuals for FA. A laboratory test that employs gamma radiation in place of DEB or MMC (Patent Deposit No. BR10 2013 0256684), recently proposed, can improve the possibilities for diagnosis of this syndrome. In this context, the objective of this research was to evaluate the feasibility of the chromosomal fragility test, using the ionizing radiation as clastogenic agent to identify heterozygous individuals for FA. For this, three different groups of subjects were studied: normal individuals (N), FA patients and the parents of these patients, who are heterozygous for FA (HFA). From each volunteer, a sample of peripheral blood were collected and separated into 2 aliquots: one was kept as control (non-irradiated) and the other one was irradiated and analyzed based on the patented methodology for scoring unstable chromosomal aberrations in lymphocyte, from irradiated peripheral blood samples. The statistical analyses of the results indicated that is possible to differentiate the normal group from the formed by HFA, at a significance level of 5%, after irradiation of the samples. Moreover, although the HFA and FA groups had similar frequencies of dicentrics, fragments, breaks and chromosomal failures, only the samples from FA patients presented radial figures, allowing to distinguish these two groups. The results point out the methodology presented and discussed in this research as an important tool to identify heterozygous individuals for Fanconi anemia.

**Keywords:** Chromosome fragility. Fanconi Anemia. Ionizing radiation. Heterozygosity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 - Alterações físicas comumente encontradas em pacientes AF .....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 2 - Via do mecanismo AF/BRCA. ....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3 - Mecanismo de Recombinação Homóloga .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4 - Alterações cromossômicas induzidas por DEB em células metafásicas de pacientes com AF .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 5 - Efeitos biológicos direto e indireto da radiação ionizante .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6 - Alterações cromossômicas radioinduzidas encontradas em indivíduos sadios e pacientes com AF .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 7 - Fluxograma da ação metodológica.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 8 - Comparação entre as medianas das frequências de alterações cromossômicas espontâneas presentes nos grupos AF e IN .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9 - Comparação entre as medianas das frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas presentes nos grupos AF e IN .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 10 - Alterações cromossômicas radioinduzida encontradas em sangue periférico de indivíduos normais .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 11 - Alterações cromossômicas típicas de Anemia de Fanconi .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11B - Figura 11 ampliada com as estruturas típicas de Anemia de Fanconi pós- irradiação das amostras.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 12 - Comparação entre as medianas das frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas presentes nos grupos AF, HAF e IN .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 13 - Alterações cromossômicas radioinduzidas mais comumente encontradas em sangue periférico de heterozigotos para AF .....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 14 – Mediana das frequências de alterações cromossômicas espontâneas do grupo AF; e valores encontrados nas amostras dos pacientes SP1 e SP2.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 15- Mediana das frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas do grupo AF; e valores encontrados nas amostras dos pacientes SP1 e SP2 .....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 16 – Proposta de fluxograma metodológico como alternativa no diagnóstico AF: Análise e quantificação de aberrações cromossômicas radioinduzidas.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais síndromes hereditárias com falha na medula ossea .....	24
Tabela 2 - Vantagens e limitações entre as técnicas utilizando DEB e RI.....	31
Tabela 3 – Frequência de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, obtidas após a análise citogenética em amostras não irradiadas do SP de indivíduos normais .....	40
Tabela 4 – Frequências de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, após análise citogenética em amostras irradiadas do SP de indivíduos normais.....	41
Tabela 5 - Frequências de aberrações cromossômicas, a partir de 200 metáfases, após a análise citogenética em amostras não irradiadas do SP de pacientes AF .....	42
Tabela 6 - Frequências de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, após a análise citogenética em amostras irradiadas do SP de pacientes AF .....	44
Tabela 7 - Frequências de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, após a análise citogenética em amostras não irradiadas do SP de indivíduos heterozigotos para AF .....	49
Tabela 8 - Frequências de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, após a análise citogenética em amostras irradiadas do SP de indivíduos heterozigotos para AF ...	50
Tabela 9 - Intervalo de confiança após irradiação considerando 95% de confiança .....	54
Tabela 10 - Características clínicas dos pacientes com suspeita de AF.....	55
Tabela 11 – Frequência de aberrações cromossômicas espontâneas apresentadas em 200 metáfases de amostras de SP de pacientes com suspeita de AF .....	55
Tabela 12 - Avaliação citogenética em amostras irradiadas pertencentes a pacientes com suspeita de AF.....	57
Tabela 13 – Frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas em amostras de SP dos pais de pacientes com suspeita de AF .....	58
Tabela 14 - Comparação entre metodologias utilizadas para diagnóstico de dois pacientes com suspeita de AF .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AA – Anemia Aplásica**

**AC – Alteração Cromossômica**

**AF – Anemia de Fanconi**

**AP – Anemia Aplásica**

**DEB – Diepoxibutano**

**DNA – Ácido Desoxirribonucleico**

**DSB – *Double-Strand Break***

**ESA – Escore Simplificado de Auerbach**

**EPC – Equipamento de Proteção Coletiva**

**EPI – Equipamento de Proteção Individual**

**Gy - Gray**

**HAF – Heterozigoto de Anemia de Fanconi**

**IFAR – *International Fanconi Anemia Registry***

**LC – Ligação Cruzada**

**LMA – Leucemia Mieloide Aguda**

**MMC – Mitomicina C**

**MO – Medula Óssea**

**N – Indivíduo Normal**

**PPS – Políticas Públicas de Saúde**

**RI – Radiação Ionizante**

**SAF – Suspeita de Anemia de Fanconi**

**SH – Suspeita de Heterozigoto para Anemia de Fanconi**

**SP – Sangue Periférico**

**SSB – *Single-Strand Break***

**SUS – Sistema Único de Saúde**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Características da Anemia de Fanconi</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Alterações físicas</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Alterações hematológicas</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Alterações genéticas e moleculares</b> .....	<b>19</b>
2.4.1	Recombinação homóloga .....	21
<b>2.5</b>	<b>Crterios para diagnóstico da Anemia de Fanconi</b> .....	<b>23</b>
2.5.1	Diagnóstico clínico e hematológico .....	23
<b>2.6</b>	<b>Diagnóstico citogenético</b> .....	<b>25</b>
2.6.1	Agentes alquilantes no diagnóstico citogenético: <i>DEB e MMC</i> .....	26
2.6.2	Método de diagnóstico citogenético alternativo: sensibilidade às <i>radiações ionizantes</i> .....	28
2.6.2.1	<i>Mecanismo de ação das radiações ionizantes</i> .....	28
<b>2.7</b>	<b>Heterozigotos para Anemia de Fanconi</b> .....	<b>31</b>
2.7.1	Aconselhamento genético.....	32
<b>2.8</b>	<b>Políticas Públicas de Saúde</b> .....	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Aspectos Éticos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Indivíduos Estudados</b> .....	<b>35</b>
3.2.1	Crterios de inclusão .....	35
<b>3.3</b>	<b>Metodologia de Análise Citogenética</b> .....	<b>36</b>
3.4.1	Coleta de sangue periférico .....	37
3.4.2	Irradiação in vitro .....	37

3.4.3	Cultivo de linfócitos do sangue periférico.....	37
3.4.4	Preparação dos linfócitos para análise citogenética .....	37
3.4.5	Confecção das lâminas e análise citogenética .....	37
3.4.6	Critérios de análise das alterações cromossômicas .....	38
<b>3.5</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Resultados da avaliação citogenética para fragilidade cromossômica em linfócitos do sangue periférico.....</b>	<b>40</b>
4.1.1	Indivíduos normais .....	40
4.1.2	Pacientes com Anemia de Fanconi .....	42
4.1.3	Heterozigotos para Anemia de Fanconi.....	49
<b>4.2</b>	<b>A aplicabilidade da metodologia de fragilidade cromossômica radioinduzida para HAF (Nº BR10 2013 0256684). .....</b>	<b>53</b>
4.2.1	Estudo de caso – Teste de fragilidade radioinduzida .....	55
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
	<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: MENORES DE 18 ANOS.....</b>	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: MAIORES DE 18 ANOS.....</b>	<b>72</b>
	<b>APÊNDICE C – FOLHA DE CONTAGEM.....</b>	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética associada à fragilidade cromossômica, autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X, cujos portadores apresentam quadro clínico heterogêneo. Os indivíduos afetados apresentam aplasia medular e, em consequência disto, predisposição à Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Síndrome Mielodisplásica (MOLDOVAN; D'ANDREA, 2009; VAZ et al., 2010).

Nos indivíduos com AF, as células apresentam hipersensibilidade aos agentes clastogênicos<sup>1</sup>, a exemplo do DEB – Diepoxibutano e MMC – Mitomicina C, devido à instabilidade genômica característica desta doença. Essa instabilidade é utilizada no diagnóstico laboratorial para identificação de pacientes com AF, sendo os linfócitos as principais células-alvo, por sua fácil obtenção e cultivo *in vitro*, bem como pela capacidade dessas células armazenarem danos causados por agentes clastogênicos (AUERBACH, 2015; BOSCH; BOGLIOLO; SURRALLÉS, 2015; LIMA, 2013; PAGANO; D'ISCHIA; PALLARDÓ, 2015).

Em termos epidemiológicos, a incidência média global de homozigotos é de 1:100.000 habitantes, entretanto a de heterozigotos é 1:300 habitantes com distribuição aleatória entre as raças (D'ANDREA; GROMPE, 2003; ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011). Por ser uma doença rara, pacientes e familiares sofrem com a falta de conhecimento por parte da comunidade médica, além das dificuldades resultantes da ausência de laboratórios públicos capacitados para realização de exames de diagnóstico. Ademais, não existe teste laboratorial que possibilite o diagnóstico de heterozigotos para AF, isto porque o espectro de alterações cromossômicas se sobrepõe ao de outras síndromes com característica de fragilidade cromossômica ou de indivíduos normais.

Diante disso, é relevante a avaliação da eficácia do teste de fragilidade cromossômica radioinduzida como método de diagnóstico complementar dos indivíduos heterozigotos para AF, possibilitando o uso dessa metodologia no aconselhamento genético, em particular em situações de uniões consanguíneas, bem como o alerta à predisposição de cânceres para estes indivíduos.

Pesquisas realizadas no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (Lambda), no Departamento de Energia Nuclear (DEN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), propuseram com sucesso o uso das radiações ionizantes em substituição dos agentes clastogênicos comumente empregados no diagnóstico laboratorial da Anemia de

---

<sup>1</sup> Agente físico ou químico capaz de induzir quebras cromossômicas.

Fanconi (DEB e MMC). Essa metodologia tem apresentado vantagens em relação à metodologia de referência utilizada no Brasil (teste DEB), tanto por minimizar os riscos associados aos profissionais de saúde e ao meio ambiente, quanto pela redução dos custos em relação à metodologia de referência.

Neste contexto, o presente trabalho tem como **objetivo geral**:

- Avaliar a eficácia do teste de sensibilidade às radiações ionizantes na identificação de indivíduos heterozigotos para AF.

**Objetivos específicos:**

1. Identificar e quantificar as frequências de alterações citogenéticas radioinduzidas em heterozigotos para AF (HAF);
2. Comparar o espectro de alterações cromossômicas de HAF com resultados típicos de indivíduos normais e de pacientes com Anemia de Fanconi.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características da Anemia de Fanconi

A Anemia de Fanconi (AF), ou Síndrome da Pancitopenia de Fanconi, foi descrita por Guido Fanconi, em 1927, como resultado da observação de 3 irmãos entre 5 a 7 anos que apresentaram sinais clínicos semelhantes, tais como: hiperpigmentação, anemia aplásica (AA)<sup>2</sup>, baixa estatura e anormalidades físicas. Inicialmente, a AF foi classificada como uma síndrome rara, heterogênea e autossômica recessiva, devido a maior incidência em famílias com laços consanguíneos. Contudo, a constatação posterior de casos semelhantes em famílias que não tinham características de consanguinidade, revelou um subtipo de AF, agora ligado ao cromossomo X (FARGO et al., 2014; OOSTRA et al., 2012; PAGANO; D'ISCHIA; PALLARDÓ, 2015).

Trata-se de uma doença hereditária associada à fragilidade cromossômica, causada por uma desordem genética com falha no mecanismo de reparo, o que confere hipersensibilidade a agentes clastogênicos. Por consequência disto, os indivíduos com AF podem apresentar malformações congênitas, predisposição a patologias oncohematológicas e tumores sólidos. O caráter raro dessa síndrome é representado pela incidência média global de 1:100.000 para homozigotos.

A AF apresenta uma extensa variabilidade fenotípica, podendo apresentar graus severos a brandos em pacientes distintos. Os pacientes que apresentam quadro clínico brando são classificados como AF mosaico (com incidência de 30% entre os pacientes com AF) por portarem células afetadas e não afetadas em um mesmo tecido. Isto ocorre por reversão espontânea de um dos alelos mutantes em linfócitos hematopoiéticos (AUERBACH, 2015; FARGO et al., 2014; OOSTRA et al., 2012).

### 2.2 Alterações físicas

Cerca de 70% dos pacientes com AF apresentam anormalidades físicas severas, as quais prejudicam a qualidade de vida dos pacientes acometidos. De acordo com o Registro Internacional de Anemia de Fanconi (*Internacional Fanconi Anemia Registry – IFAR*), as

---

<sup>2</sup> Anemia aplásica: Caracteriza-se pela falência da medula óssea com baixa produção das três linhagens de células hematopoiéticas.

anormalidades mais comumente encontradas são: pigmentação da pele (mancha café-com-leite); crescimento (baixa estatura, retardo no crescimento intra-uterino); alterações nos membros superiores e inferiores (ausência do polegar, sindactilia<sup>3</sup>, polidactilia<sup>4</sup>, ausência ou hipoplasia do rádio); cabeça (microcefalia, hidrocefalia, face triangular, pescoço curto); oculares (microftalmia, astigmatismo, estrabismo, catarata, hipo e hipertelorismo); auriculares (vias auriculares ausentes ou anormais, surdez, displasia e atresia); renais (forma de ferradura, ectopia, atresia, hipoplasia); nas gônadas masculinas (criptorquidia, atrofia testicular, azostemia, fimose, hipospádia); nas gônadas femininas (hipoplasia ou aplasia genital e do útero, lábios fundidos, ovários ausentes); endócrinas (hipotireoidismo, insuficiência do hormônio do crescimento, intolerância à glicose e diabetes) e gastrointestinais (má rotação e obstrução intestinal, atresia biliar, atresia do duodeno, jejuno e esôfago) (AUERBACH, 2009; KUPFER, 2013; SHIMAMURA; ALTER, 2010).

A **Figura 1** apresenta algumas destas alterações físicas em pacientes AF.

**Figura 1 - Alterações físicas comumente encontradas em pacientes AF**



A) Ausência do polegar direito. B) Hiperpigmentação na região frontal da cabeça. C) Paciente apresentando baixa estatura.

Fontes: A) DOGAN et al. (2014); B) OTTONI et al. (2005); C) ALTER et al. (2005)

### 2.3 Alterações hematológicas

A falência progressiva da medula óssea (MO), com conseqüente pancitopenia<sup>5</sup>, apresenta-se por volta da primeira década de vida destes indivíduos. É por isso que indivíduos

<sup>3</sup> Malformação congênita resultante da união de dois ou mais dedos.

<sup>4</sup> Alteração congênita caracterizada pela inserção de um dedo a mais.

<sup>5</sup> Diminuição de todas as linhagens das células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas)

recém-nascidos, com hemograma completo dentro dos valores normais, podem posteriormente ter o diagnóstico de AF (TRIAMSTRA et al., 2015).

No início do processo de falha progressiva da MO, há uma diminuição na produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, aumentando o risco do desenvolvimento de doenças oncohematológicas, bem como outras patologias associadas à imunodeficiência. No entanto, estas alterações hematológicas apresentam-se de maneira variável, a depender do grau de comprometimento da MO, definido da seguinte maneira:

- **Grau I** – medula óssea normocelular: plaquetas  $> 100.000/\mu\text{L}$ ; neutrófilos  $> 1000/\mu\text{L}$ ; hemoglobina  $> 10 \text{ g/dL}$ .
- **Grau II** – hipoplasia medular: pelo menos um dos critérios - plaquetas entre 100.000 e 20.000/ $\mu\text{L}$ , neutrófilos entre 1.000 e 500/ $\mu\text{L}$ , hemoglobina  $< 10 \text{ g/dL}$ ; sem transfusão ou  $< 20$  transfusões.
- **Grau III** – aplasia medular: pelo menos um dos critérios - plaquetas  $< 20.000/\mu\text{L}$ , neutrófilos  $< 500/\mu\text{L}$ ;  $> 20$  transfusões eritrócitos e plaquetas. (BUTTURINI et al., 1994).

Em relação aos parâmetros ora citados, a comunidade médica especializada em AF, concorda que há a necessidade emergencial de tratamento através de transplante de MO em pacientes que apresentam grau III de comprometimento, devido a diminuição quantitativa e qualitativa dos elementos celulares do tecido sanguíneo de maneira significativa (ALTER, 2014).

Por outro lado, em pacientes com mosaicismo somático, a falência da MO pode estar ausente ou com grau de comprometimento mais brando devido à reversão somática dos linfócitos, que podem corrigir parcialmente o quadro de AA (OOSTRA et al., 2012).

## 2.4 Alterações genéticas e moleculares

As alterações físicas, fisiológicas e genéticas de indivíduos com Anemia de Fanconi, bem como a predisposição ao câncer e hipersensibilidade aos agentes clastogênicos, reforçam a heterogeneidade da doença, cujos diversos aspectos fenotípicos estão associados a variabilidade genotípica encontrada.

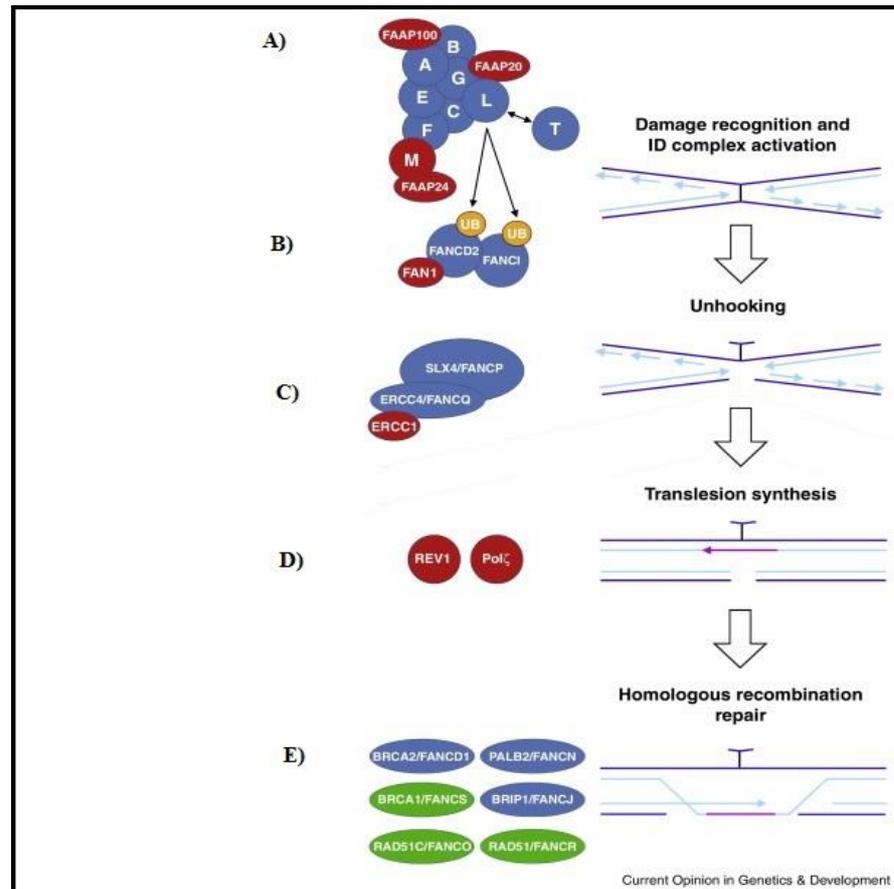
Atualmente, diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de demonstrar as funções e a importância dos genes AF no mecanismo de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA). Até o momento, foram descritos 21 grupos de complementação associados à AF: FANCA, FANCB (associado ao cromossomo X), FANCC, FANCD1 (BRCA2), FANCD2

(BRCA1), FANCE, FANCF, FANCG (XRCC9), FANCI (KIAA1794), FANCI (BACH1/BRIP1), FANCL (PHF9), FANCM (FAAP250), FANCN (PALB2), FANCO (RAD51C), FANCP (SLX4), FANCQ (ERCC4/XPF), FANCR, FANCS (BRCA1), FANCT, FANCU e FANCV (BOGLIOLO; SURRALLÉS, 2015; FEBEN et al., 2017; SAWYER et al., 2015).

Estas proteínas funcionam em conjunto e são responsáveis pela estabilidade do genoma das células destes indivíduos, bem como pelo controle da resposta aos danos causados no DNA. Oito delas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM) fazem parte do mecanismo AF/BRCA, formando um complexo nuclear que vai ativar outro complexo, chamado complexo ID (FANCD2-FANCI), considerado o principal no mecanismo de reparo celular (DUXIN; WALTER, 2015; NALEPA; CLAPP, 2014).

A via AF/BRCA, representada na **Figura 2**, é ativada a partir da formação do complexo nuclear, havendo monoubiquitinação do FANCD2-FANCI na fase S do ciclo celular, em resposta aos danos causados ao DNA por ligações cruzadas (LC), quebras da dupla fita de DNA (Double-Strand Breaks - DSBs) ou até por erros de replicações. O complexo ID é direcionado para o local danificado, onde irá interagir com as proteínas BRCA1, BRCA2, RAD51, FANCI e FANCN, que estão associadas ao controle do reparo do DNA, através do mecanismo de recombinação homóloga, abordado mais adiante (BOGLIOLO; SURRALLÉS, 2015; DU; ERDEN; PANG, 2014; KUPFER, 2013).

**Figura 2 - Via do mecanismo AF/BRCA.**



Via do mecanismo AF/BRCA: **A)** Reconhecimento do dano através do complexo nuclear. **B)** Ativação e monoubiquitinação do complexo ID. (FANCI e FANCD2). **C)** Atividade do FANCP e FANCO removendo os danos causados a fita de DNA. **D)** Sistema de translesão ativado. **E)** Reparação do DNA por recombinação homóloga associada às proteínas BRCA1 (FANCS), BRCA2 (FANCD1), RAD51 (FANCR), BRIP1 (FANCI) e PALB2 (FANCN).

Fonte: modificado de BOGLIOLO; SURRELLÉS (2015)

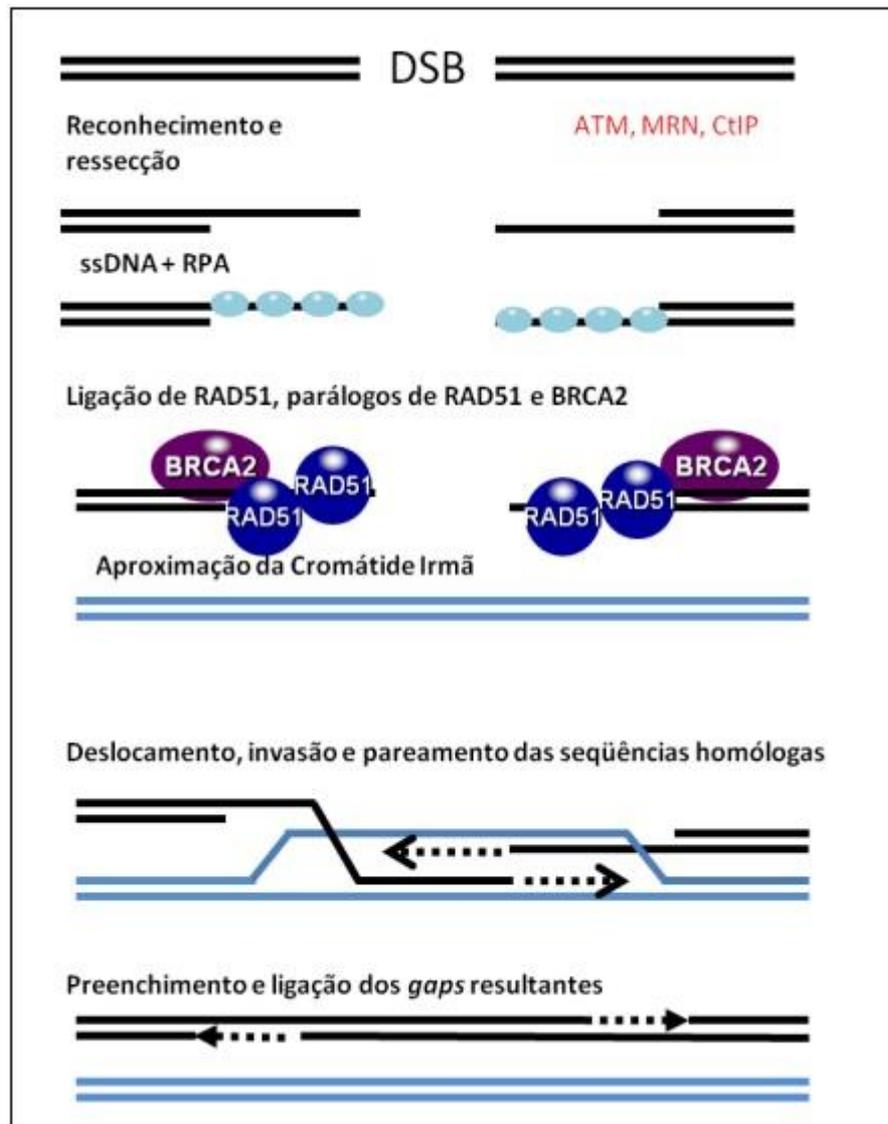
Se houver uma mutação em alguma destas proteínas, o complexo ID não será monoubiquitinado, resultando em falhas no mecanismo de reparo da célula, conferindo assim, hipersensibilidade aos agentes genotóxicos e predisposição às neoplasias malignas (D'ANDREA; GROMPE, 2003; KENNEDY; D'ANDREA, 2006).

#### 2.4.1 Recombinação homóloga

O mecanismo de reparo do DNA por recombinação homóloga, esquematizado na **Figura 3**. Este é um processo complexo iniciado em resposta aos danos causados às moléculas de DNA, através das ligações das proteínas MRE11, RAD51 e NBS1 aos seus filamentos, o que faz com que uma fita não se separe da outra. Este mecanismo ocorre exclusivamente nas fases S e G2 do ciclo celular, devido à presença de um molde homólogo para auxiliar na reparação do dano (GAUBEUR; MOURA; CHAMMAS, 2015). A instabilidade genômica das

células AF, ocorre através de mutações associadas às proteínas que estão intimamente relacionadas com a ativação do mecanismo de reparo por recombinação homóloga, que se manifesta posteriormente nas fases S e G2 do ciclo celular na tentativa de reparar danos ou erros de replicação do DNA (AKKARI et al., 2000; PAGANO; D'ISCHIA; PALLARDÓ, 2015; ROTHFUSS; GROMPE, 2004).

**Figura 3 - Mecanismo de Recombinação Homóloga**



Fonte: OLIVEIRA (2010)

Após a formação do complexo MRN e ligação aos filamentos de DNA, é formado outro complexo enzimático com a nuclease CtIP (Carboxy-terminal binding protein Interacting Protein), chamado complexo MRN-CtIP, responsável por catalisar as ressecções das extremidades destas lesões simultaneamente com a exonuclease I. Tendo ocorrido o processo anterior, as proteínas de Replicação A e RAD51 vão executar a estabilização e união na

extremidade 3' da fita criada. Em seguida, as informações da fita não danificada são copiadas pela DNA polimerase; as fitas reparadas são unificadas por uma DNA ligase I; e os fragmentos relacionados com os danos são dissociados (GAUBEUR; MOURA; CHAMMAS, 2015; OLIVEIRA, 2010).

## **2.5 Critérios para diagnóstico da Anemia de Fanconi**

Frente à complexidade de características desta síndrome (física, hematológica e genética), atualmente, os critérios utilizados para diagnóstico clínico e hematológico não são suficientes para fechar o diagnóstico da doença. Isso exige a realização de avaliações complementares por análise citogenética, através da quantificação de alterações cromossômicas (ACs) induzidas por DEB e MMC, ou por intermédio da biologia molecular, a exemplo da utilização da técnica Western Blot (AUERBACH, 2009; PILONETTO et al., 2009).

Dentre os testes complementares, a avaliação das alterações cromossômicas por DEB ou MMC são os mais utilizados atualmente devido ao tempo de execução, praticidade e baixo custo. Também pela alta especificidade e sensibilidade apresentada em comparação aos demais exames genéticos. Para tanto, a triagem dos pacientes que são submetidos às metodologias ora descritas, é definida pelo médico com base em critérios clínicos e hematológicos do paciente.

### **2.5.1 Diagnóstico clínico e hematológico**

Historicamente, os critérios empregados no diagnóstico clínico da AF levavam em consideração a avaliação clínica do paciente e de laços consanguíneos entre os pais. Contudo, havia um subgrupo de AF que não se enquadrava neste aspecto (AUERBACH, 2009). Diante disso, Auerbach e cols. (1989) estabeleceram na época um método para diagnóstico clínico da AF com base em características clínicas e hematológicas. O método simplificado de classificação dos achados clínicos utilizava oito parâmetros mais frequentemente observados nesses pacientes, sendo sete parâmetros de alterações congênitas e uma alteração hematológica (AUERBACH, 2009; BUTTURINI et al., 1994).

Para tanto, foram utilizadas as seguintes características: retardo no crescimento, dificuldades no aprendizado, hiperpigmentação, alterações morfológicas renais, microftalmia, alterações físicas nos membros superiores, outras alterações esqueléticas e plaquetopenia. Para cada alteração citada é atribuído 1 ponto, e quando o indivíduo apresenta retardo mental é

subtraído 1 ponto. Estas pontuações eram utilizadas para obtenção de um escore que associava a pontuação final com a probabilidade do paciente ter ou não AF. O método ficou conhecido como Escore Simplificado de Auerbach (ESA), que foi estabelecido através da avaliação clínica de 310 pacientes registrados no IFAR (IFAR, 1982, apud AUERBACH, 2009; AUERBACH; ROGATKO; SCHROEDER-KURTH, 1989).

Todavia, a variabilidade fenotípica desta síndrome conferiu ao método certa inespecificidade, devido ao fato de que 30% dos pacientes afetados não apresentam alterações congênicas ou as apresentarem de forma branda. Além disso, a clínica estabelecida pelo ESA é comum a outras síndromes de fragilidade cromossômica ou que tenham como característica a falência hereditária da medula óssea, como é o caso da Síndrome de Bloom, Síndrome de Roberts, Síndrome de quebra de Nijmegen, Síndrome de Werner, Síndrome de Cockayne, Anemia de Blackfan-Diamond e Disqueratose Congênita. A **Tabela 1** apresenta as síndromes com falha na medula óssea e que podem ser confundidas com AF (OOSTRA et al., 2012; SHIMAMURA; ALTER, 2010).

**Tabela 1 - Principais síndromes hereditárias com falha na medula ossea**

Síndromes	Característica Hematológica	Leucemia
<b>Disqueratose congênita</b>	Anemia Aplásica	LMA
<b>Anemia de Diamond-Blackfan</b>	Anemia	
<b>Síndrome de Shwachman-Diamond</b>	Neutropenia	
<b>Anemia de Fanconi</b>	Anemia Aplásica	

LMA: Leucemia Mielóide Aguda  
Fonte: Modificado de ALTER (2014)

No caso da AF, os critérios para diagnóstico hematológico estão associados à falha progressiva da MO, observável na primeira década de vida. Estes indivíduos geralmente cursam com um aumento do volume corpuscular médio – VCM (macrocitose), anisopoiquilocitose<sup>6</sup> moderada, plaquetopenia (com recorrentes sangramentos e hematomas), leucopenia, anemia normocítica e normocrômica (concentração de hemoglobina entre 6 – 8 g/dL e hemoglobina fetal elevada) e, dependendo do grau de severidade, pode apresentar pancitopenia com linfocitose relativa (ASLAN; AMEZIANE; DE WINTER, 2015; SHIMAMURA; ALTER, 2010).

<sup>6</sup> Esfregaço sanguíneo que apresentam hemácias com tamanhos heterogêneos e alterações morfológicas.

Estas complicações hematológicas encontradas nos pacientes com AF predispõem à leucemia mieloide aguda e síndrome mielodisplásica, sendo esta 5000 vezes maior e aquela em 600 vezes em comparação à população normal. Tal predisposição tende a aumentar em função do tempo de vida do indivíduo e também, em média, a incidência dessas doenças oncohematológicas ocorre aos 16 anos nestes pacientes, enquanto que para indivíduos normais a idade média é de 68 anos (SHIMAMURA; ALTER, 2010).

Ademais, tais manifestações clínicas e hematológicas em síndromes distintas da AF comprometem a precisão do diagnóstico precoce. Surgindo então a necessidade de um teste diagnóstico complementar através da avaliação de alterações cromossômicas induzidas por DEB em linfócitos do sangue periférico (SP) destes indivíduos. Esta metodologia é atualmente a padrão ouro recomendada pelo IFAR (PORTO et al., 2011).

## **2.6 Diagnóstico citogenético**

Em 1964, Schoeder e cols. constataram que os indivíduos com AF tinham uma maior frequência de ACs espontâneas quando comparados com indivíduos clinicamente normais. Além disso, os indivíduos com AF apresentaram rearranjos cromossômicos que indicam fragilidade cromossômica associada a uma falha no mecanismo de replicação da célula (FARGO et al., 2014). Já em 1989, Auerbach e cols. estabeleceram um método de diagnóstico citogenético a partir da observação do aumento de ACs em cultura de linfócitos quando em contato com agentes clastogênicos, conferindo à técnica maior sensibilidade e especificidade (AUERBACH, 2015; NALEPA; CLAPP, 2014).

Como já citado, devido à complexidade genética da AF, a opção pela investigação molecular desta doença utiliza diversos métodos genéticos complementares, incluindo técnicas como western blot para detectar FANCD2, bem como pesquisas de grupos de complementação. Uma vez que esses testes implicam em elevados custos operacionais, a abordagem molecular não faz parte da rotina de diagnósticos laboratoriais (PILONETTO et al., 2009).

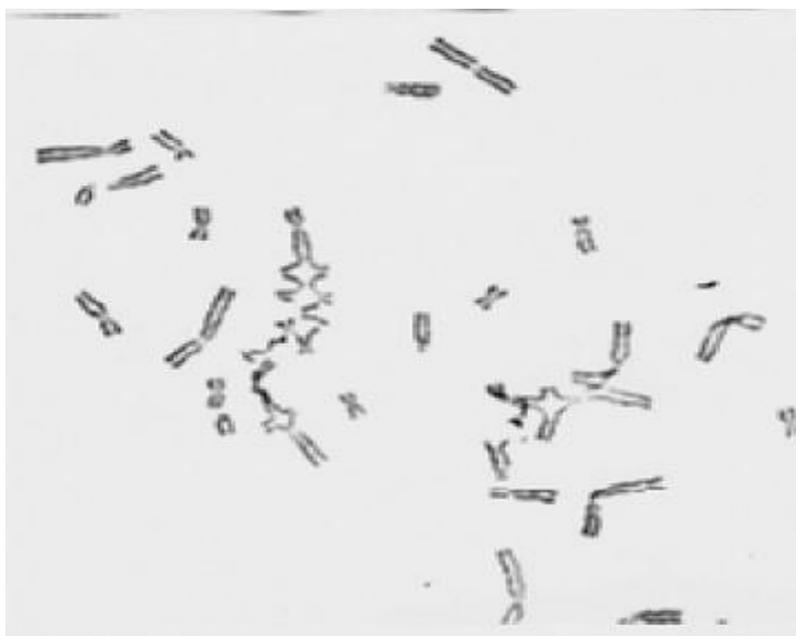
Assim, os principais testes empregados para diagnóstico da AF são os métodos citogenéticos utilizando o DEB (padrão ouro), a MMC e, mais recentemente, as RIs, como método alternativo de menor custo, que possui menores riscos aos profissionais de saúde e ao meio ambiente (LIMA, 2013). Para tanto, são geralmente utilizadas culturas de linfócitos do SP devido a sua fácil obtenção e por se manterem no estado quiescente (G0) do ciclo

celular. Isso possibilita o armazenamento de lesões causadas ao DNA, que podem ser observadas em metáfase por microscopia óptica após as células serem estimuladas por um agente mitótico (AUERBACH, 2009; YUSUF; FRUMAN, 2003).

### 2.6.1 Agentes alquilantes no diagnóstico citogenético: *DEB* e *MMC*

O DEB é um alquilante<sup>7</sup> clastogênico que possui capacidade de danificar o DNA por indução de ligações cruzadas (LC), em virtude de sua afinidade química às moléculas do DNA. Em pacientes com AF, este agente potencializa a formação de ACs (**Figura 4**) instáveis através das LCs, que evidenciam as falhas presentes nos mecanismos de reparo celular. Este agente químico garante alta sensibilidade e especificidade à técnica. Por outro lado, sua manipulação deve ser feita com cuidado em razão de sua toxicidade e volatilidade, utilizando-se equipamentos de proteção individual (EPI) e coletiva (EPC) adequados (CASTELLA et al., 2011; PAGANO, 2000).

**Figura 4 - Alterações cromossômicas induzidas por DEB em células metafásicas de pacientes com AF**



Fonte: modificado de Auerbach (2009)

<sup>7</sup> Complexo químico capaz de formar ligações cruzadas com os filamentos de DNA, através da adição de um grupo alquila ( $C_nH_{2n+1}$ ), alterando a sua conformação.

Embora o teste de quebras cromossômicas induzida por DEB certifique alta sensibilidade e especificidade, a técnica pode apresentar resultados positivos para outras síndromes que tenham como característica fragilidade cromossômica, a exemplo da Síndrome de Quebra Nijmegen, Síndrome de Roberts e Síndrome de Quebra Warsaw. Já em indivíduos AF com mosaicismo, que possuem linhagens de células normais e linhagens de células mutantes para AF, é observada uma menor sensibilidade ao DEB e a MMC e, conseqüentemente, podem ser apresentados resultados duvidosos ou falsos negativos (ASLAN; AMEZIANE; DE WINTER, 2015; MIZUTANI; TAKAGI, 2013; OOSTRA et al., 2012).

Além disso, a técnica proposta por Auerbach e cols. (1989) não segue um protocolo padrão, podendo haver variabilidade nos parâmetros avaliados entre os laboratórios, a saber: quantidade de células analisadas, concentração do agente químico, tempo de cultivo e adição do Colcemid, critérios de análise das ACs. Esta falta de uniformidade na técnica eleva as chances de falsos positivos e negativos (COHEN et al., 1982; PORTO et al., 2011).

Os parâmetros de leituras propostos por Auerbach que têm aplicação internacional na análise citogenética são:

- Cálculo do índice de quebras por células totais – considera a somatória das pontuações das anormalidades nas metáfases, dividido pelo número de metáfases analisadas;
- Cálculo do índice de quebras por células anormais – considera a somatória das pontuações das anormalidades nas metáfases, dividido pelo número de metáfases com anormalidades;
- Cálculo da porcentagem do número de células com aberrações – considera a porcentagem do número de metáfases com anormalidades, dividido pelo número de metáfases analisadas.

Outra substância indutora de LCs do DNA utilizada para o teste de quebras cromossômicas em pacientes com AF é a MMC. A literatura relata que este agente possui limitações frente ao DEB, por apresentar menor especificidade. Isso ocorre devido ao seu mecanismo de ação que induz a formação de adutos de DNA em maior número que LCs, além de depender de uma ativação metabólica para sua ação alquilante (AUERBACH; ROGATKO; SCHROEDER-KURTH, 1989; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013; KOOK et al., 1998).

Contudo, Fargo e cols. (2014) descreveram que os parâmetros de análise utilizados no teste de quebras cromossômicas foram mais elevados utilizando MMC quando comparado

com DEB em concentrações semelhantes, inclusive a frequência de rearranjos cromossômicos também foi mais elevada. Eles também descrevem terem sido capazes de diferenciar os indivíduos AF com mosaicismo dos pacientes AF não mosaicos, corroborando com os estudos realizados por Oostra e cols. (2012), os quais demonstraram a eficácia da MMC na identificação dos pacientes AF com mosaicismo.

### **2.6.2 Método de diagnóstico citogenético alternativo: sensibilidade às radiações ionizantes**

Em 1971 e 1973, os autores Higurashi e Conen apresentaram as primeiras evidências de sensibilidade das células AF às RIs, utilizando raios-gama em amostras de SP de crianças com 6 a 12 anos de idade. Pouco depois, em 1979, Bigelow e cols. corroboraram esses resultados através de estudos semelhantes, através de modificações nas doses e fonte de radiação utilizadas. Saraswathy e Natarajan (2000), estudaram a frequência de ACs induzidas por raios-x em síndromes de fragilidade cromossômica (incluindo a AF), constando que estas apresentavam maior frequência de ACs em comparação com os indivíduos normais. É importante destacar, contudo, que outros estudos apresentaram dados discrepantes, que não diferenciaram esses grupos através da utilização das RIs (A. MOHSENI-MEYBODI; H. MOZDARANI; P. VOSOUGH, 2007; BARQUINERO et al., 2001; TAYLOR, 1985).

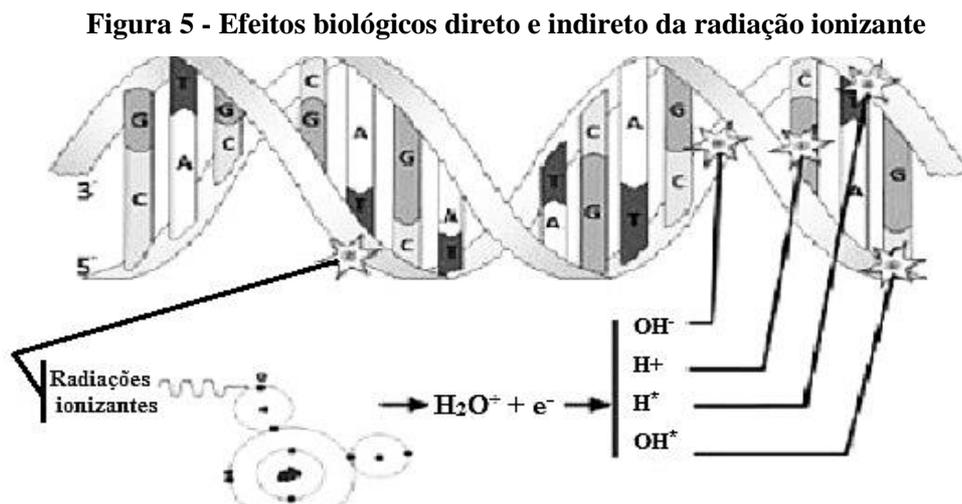
Tais controvérsias existem em consequência da influência que alguns parâmetros metodológicos possuem nas frequências de ACs radioinduzidas, com destaque para a fonte de radiação, dose, taxa de dose, bem como a energia da radiação ionizante utilizada. Nesse sentido, ocorrendo alguma alteração em um desses parâmetros, consequentemente, as frequências de alterações cromossômicas também podem mudar (LEMOS-PINTO, M. M. P et al., 2015).

#### **2.6.2.1 Mecanismo de ação das radiações ionizantes**

Em 1927, Joseph Muller mostrou as primeiras evidências de danos cromossômicos causados pela RI, através da irradiação da *Drosophila melanogaster*, conhecida como “mosca de fruta”. Mais tarde, Barbara McClintock, em 1931 e, Sax, em 1938, realizaram estudos similares em espécies vegetais, avaliando alterações cromossômicas radioinduzidas. Muller e McClintock observaram que os descendentes das espécies irradiadas nos estudos adquiriram fenótipos distintos das linhagens parentais. Sax por sua vez, observou a variabilidade quantitativa de ACs em função da dose absorvida pela planta *Tradescantia*. Com a evolução da citogenética, foi possível quantificar a dose de RI absorvida pelos tecidos,

através da quantificação de cromossomos dicêntricos em metáfases de linfócitos do SP humano (LLOYD; DOLPHIN, 1977; PRESTON, 2005).

As RIs são capazes de causar danos em diversas estruturas da célula, sendo a molécula de DNA a mais estudada, em vista de sua importância na estabilidade genômica. Dentre os danos mais significativos no DNA estão as quebras de um único filamento desta molécula (Single-Strand Breaks – SSBs) e as quebras duplas (Double Strand Break – DSBs), que por sua vez, apresentam um maior potencial genotóxico. Estes danos podem ser causados através dos efeitos biológicos diretos das RIs, que acontecem quando as radiações interagem diretamente com os filamentos do DNA; e por efeitos biológicos indiretos, quando interagem indiretamente através da ionização das moléculas de água presentes nas células (radiólise da água), induzindo a produção de radicais livres que são nocivos ao DNA, ilustrados na **Figura 5** (BONATO; ELNECAVE, 2011; GAUBEUR; MOURA; CHAMMAS, 2015).



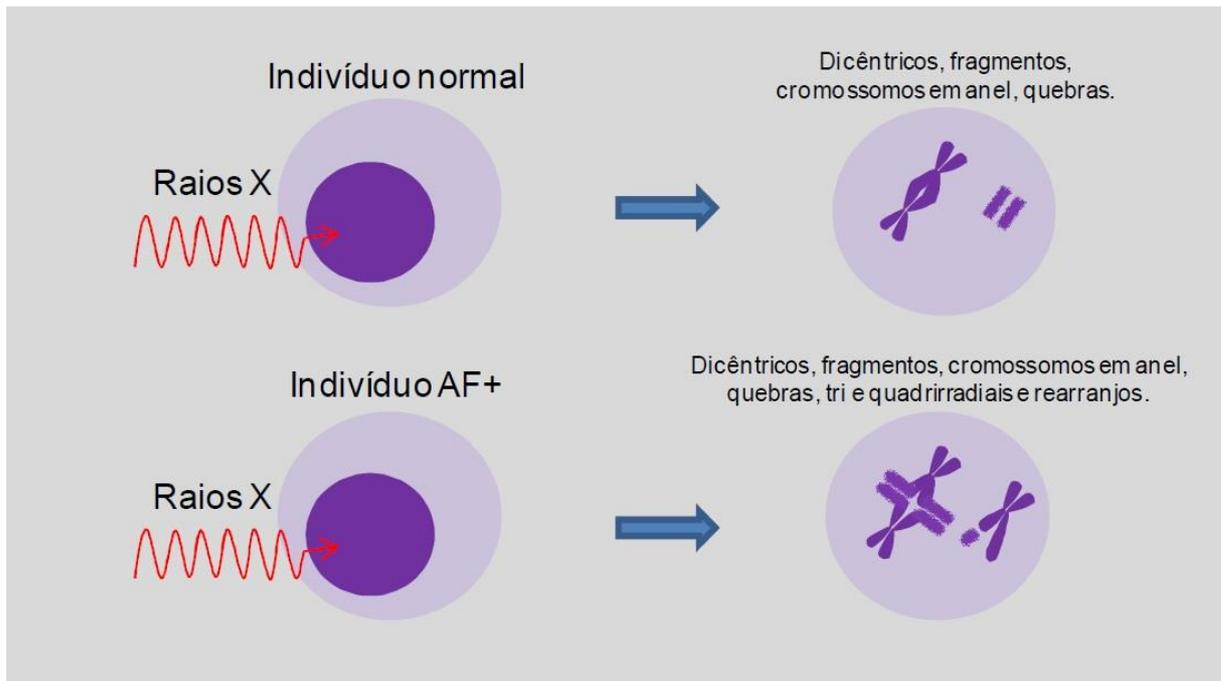
Fonte: adaptado de BONATO; ELNECAVE (2011).

Em indivíduos saudáveis, os mecanismos das RIs podem induzir a formação de aberrações cromossômicas instáveis, como dicêntricos, fragmentos, cromossomos em anéis e quebras cromossômicas, observadas comumente em linfócitos metafásicos irradiados (fase do ciclo celular em que o DNA atinge sua compactação máxima) por microscopia ótica de campo claro. Dentre estas alterações, os dicêntricos são utilizados em dosimetria citogenética, como biomarcador de exposição para avaliar a dose de radiação absorvida (AMARAL; FERNANDES; CAVALCANTI, 2008).

Em contrapartida, em indivíduos com falhas no mecanismo de reparo do DNA, como é o caso dos pacientes AF, as RIs podem induzir, adicionalmente, a formação de rearranjos cromossômicos e de estruturas trirradiais e quadrirradiais. Além disso, o dano radioinduzido

promove um maior tempo de duração da fase G2 da mitose, consequentemente havendo redução qualitativa de células em divisão. As diferenças entre alterações cromossômicas encontradas nos respectivos grupos estão representadas na **Figura 6** (BOSCH; BOGLIOLO; SURRALLÉS, 2015; SARASWATHY; NATARAJAN, 2000).

**Figura 6 - Alterações cromossômicas radioinduzidas encontradas em indivíduos saudáveis e pacientes com AF**



Fonte: Modificado de LIMA (2013).

Tal fenômeno foi observado e descrito no trabalho de Lima e cols. (2013), os quais aplicaram as radiações ionizantes em substituição ao DEB como agente clastogênico no teste laboratorial, objetivando o diagnóstico complementar da AF. Nessa pesquisa, foi verificado que as interações das RIs com linfócitos do SP induziram a formação de aberrações cromossômicas típicas de pacientes AF. Através da análise comparativa desses resultados com aqueles obtidos para indivíduos normais, em ensaios biodosimétricos<sup>8</sup> e em testes de sensibilidade ao DEB, foi possível avaliar o potencial dessa metodologia na identificação de pacientes com AF.

Esses autores descreveram as principais diferenças entre os tipos e frequências de alterações cromossômicas encontradas nos pacientes AF. Enquanto que nos indivíduos saudáveis verifica-se uma maior frequência de dicêntricos, nos pacientes com AF há uma alta taxa de

<sup>8</sup> Técnicas utilizadas para avaliar, através de indicadores biológicos, a dose absorvida de radiação ionizante.

fragmentos acêntricos, quebras cromossômicas e de figuras radiais (não observadas nas metáfases dos indivíduos normais).

Ademais, a nova metodologia proposta que utiliza as RIs em substituição ao DEB, apresentou vantagens significativas frente à metodologia de referência (DEB) ilustradas na **Tabela 2**.

**Tabela 2 - Vantagens e limitações entre as técnicas utilizando DEB e RI**

<b>Agente</b>	<b>Tempo de realização do teste</b>	<b>Custo</b>	<b>Risco ao manipulador</b>	<b>Risco ao ambiente</b>
<b>DEB</b>	ALTO	ALTO	ALTO	ALTO
<b>RI</b>	ALTO	BAIXO	BAIXO	BAIXO

Fonte: adaptado de LIMA (2013)

Diante das comparações apresentadas na tabela acima, o método utilizando RI no diagnóstico de AF apresenta grande potencial como teste diagnóstico complementar para AF e alternativo ao DEB, considerando que de maneira geral é mais acessível à população e aos laboratórios (LIMA, 2013).

## **2.7 Heterozigotos para Anemia de Fanconi**

Apesar da Anemia de Fanconi ter um caráter raro, com incidência média de 1:100.000 habitantes, a ocorrência de heterozigotos para AF é significativamente maior, sendo de 1:300 habitantes (BOGLIOLO; SURRELLÉS, 2015; ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011). Os heterozigotos para Anemia de Fanconi (HAF) são clinicamente semelhantes a indivíduos normais, não possuindo os achados clínicos característicos dessa síndrome, porém eles apresentam uma predisposição elevada ao desenvolvimento de cânceres e neoplasias. Ao nível molecular, a elevada predisposição está associada às mutações monoalélicas (heterozigóticas) em genes AF específicos, tais como: FANCD1 (BRCA2), FANCS (BRCA1), FANCI (BRIP1), FANCF, FANCG (PALB2), que estão relacionados aos cânceres de mama e ovário; e o FANCO (RAD51 C), que além da propensão às neoplasias malignas citadas anteriormente também está associada a tumores de cabeça e pescoço (BOGLIOLO; SURRELLÉS, 2015; MEINDL et al., 2010).

Atualmente, um dos maiores desafios é a identificação dos HAF, pois até o momento,

não é possível diagnosticar estes indivíduos pelas técnicas laboratoriais clássicas. Os primeiros estudos nesse sentido datam de 1983, em que Cervenka e cols. aplicaram o teste de quebras cromossômicas com DEB e MMC em amostras de SP de HAF. Nesse estudo, as células destes indivíduos não apresentaram diferença significativa quanto à sensibilidade a estes agentes, em comparação ao grupo controle, o que impossibilitou a sua identificação. Recentes pesquisas realizadas por Fargo e cols. (2014), utilizando as mesmas técnicas citogenéticas apresentadas no estudo de Cervenka, revelaram que apesar de haver diferenças entre os índices de ACs dos HAF frente aos indivíduos controle, os resultados obtidos para estes portadores foram semelhantes às medidas encontradas nas frequências de ACs de pacientes AF com mosaïcismo somático e de outros pacientes com síndromes hereditárias, que tem como característica principal a falência da medula óssea. Mais uma vez não tendo sido possível distinguir os HAF dos demais grupos analisados (FARGO et al., 2014; ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011).

Embora alguns estudos tenham demonstrado que os linfócitos do SP de HAF apresentam taxas de ACs induzidas por radiação gama levemente superior às células de indivíduos controle, estes resultados não foram suficientes para diferenciá-los (A. MOHSENI-MEYBODI; H. MOZDARANI; P. VOSOUGH, 2007; BARQUINERO et al., 2001). Em termos de danos no DNA, Djuzenova e cols. (2001) constaram, através de ensaio cometa<sup>9</sup>, que os linfócitos dos indivíduos HAF apresentaram maior sensibilidade às radiações ionizantes em relação às células de indivíduos saudáveis.

### **2.7.1 Aconselhamento genético**

Este preceito consiste em um serviço especializado que presta informações aos indivíduos e familiares a respeito da probabilidade de herança genética e implicações biológicas futuras de determinadas doenças, com o objetivo de elucidar riscos genéticos e na tomada de decisões médicas e pessoais apropriadas (KHINCHA; SAVAGE, 2015).

Como a AF é predominantemente uma síndrome autossômica recessiva, o aconselhamento genético é de total importância em famílias com histórico familiar dessa doença, sobretudo na ocorrência de casamento consanguíneo. Casamentos envolvendo indivíduos heterozigotos para AF têm um risco associado de 25% em gerar um filho com a síndrome, para cada descendente gerado. Nesse cenário, há a necessidade da realização de um diagnóstico pré-natal, e também de analisar irmãos afetados pré-sintomáticos. Esses

---

<sup>9</sup> Eletroforese utilizada para quantificar quebras na fita do DNA.

procedimentos são de importância médica e social e contemplam a PORTARIA Nº 199, DE 30 DE JANEIRO DE 2014, que instituiu a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2016; KHINCHA; SAVAGE, 2015; METS et al., 2015).

## **2.8 Políticas Públicas de Saúde**

O SUS tem um papel fundamental em prestar informações e serviços com relação às diversas doenças que acometem os brasileiros. Para tanto, o Ministério da Saúde publicou a PORTARIA Nº 199, DE 30 DE JANEIRO DE 2014, que instituiu a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do SUS, para atendimentos das principais doenças que acometem a população numa proporção de 65:100.000. No entanto, a AF não está incluída claramente dentro de suas diretrizes e protocolos.

De acordo com o SUS, a AF é classificada como uma Anemia Aplásica (AA) congênita, devido às disfunções hematológicas associadas à falência da medula óssea (BRASIL, 2016). Entretanto, a AA é semelhante à AF apenas nos aspectos hematológicos, e seu tratamento é realizado tão somente por meio de transplante de medula óssea e imunossupressores (BRASIL, 2016). Neste caso, para os pacientes AF, o tratamento recomendado inclui, além dos já citados anteriormente, a administração de andrógenos, a aplicação subcutânea do fator estimulante de colônia granulocítica (antes do agravo das disfunções hematológicas), e a correção das malformações esqueléticas congênicas através de cirurgias (ALTER; KUPFER, 2013).

Vale salientar que, mesmo entre os profissionais de saúde, há escassez de conhecimento científico sobre as particularidades dessa doença hereditária rara, de grande complexidade terapêutica. Como resultado, são recorrentes atrasos no diagnóstico ou dificuldade de identificação dessa doença. Uma mudança nesse cenário poderia garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes e a seus familiares (COMUNICAÇÃO, 2016; METS et al., 2015).

O diagnóstico precoce da AF garantiria o tratamento adequado em tempo hábil, além de monitorar os efeitos colaterais associados às doses dos fármacos utilizados, visto que estes indivíduos apresentam hipersensibilidade aos agentes utilizados em quimioterapia e radioterapia. Além disso, poderia garantir uma preparação adequada para o transplante de MO e orientações necessárias para mitigar as chances de desenvolver cânceres, pois há todo um cuidado com tais pacientes, como a não exposição excessiva ao sol, bebidas alcoólicas e tabagismo. Todos os cuidados, desde as doses e concentrações utilizadas nos tratamentos até o

hábito de vida deve ser levando em consideração, uma vez que o sistema de reparo desses indivíduos é deficiente (COMUNICAÇÃO, 2016).

No Brasil há somente o Hospital das Clínicas de Curitiba, da Universidade Federal do Paraná, como centro público especializado no diagnóstico da AF. Conseqüentemente, tem havido uma sobrecarga de atividades associadas às amostras recebidas para confirmação de diagnóstico, em alguns casos sendo confirmados tardiamente. Este é mais um fator que compromete o início precoce do tratamento da doença.

Com relação aos heterozigotos para AF, os desafios na identificação desses indivíduos são ainda maiores. O desenvolvimento e a inclusão de testes para diagnóstico laboratorial de heterozigotos para AF seria algo inovador. Essa iniciativa possibilitaria a criação de um serviço especializado em prestar informações importantes aos familiares a respeito da probabilidade da herança genética e implicações da síndrome, objetivando esclarecer os riscos futuros associados aos filhos e também ao próprio HAF, aconselhando-os sobre os fatores sociais que contribuiriam para o desenvolvimento de cânceres.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Aspectos Éticos

Esta pesquisa é do tipo experimental analítica e foi executada no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA), localizado no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco - DEN/UFPE. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde CCS/UFPE (Parecer número: 196.555).

Os participantes inclusos nesta pesquisa foram informados acerca dos objetivos deste estudo e cada um assinou um termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE – (APÊNDICE A), através do qual declararam terem sido informados sobre a proposta do estudo e seu aceite em participar como voluntários da pesquisa.

### 3.2 Indivíduos Estudados

Os indivíduos analisados nesta pesquisa foram identificados como: **AF**, pacientes do HEMOPE<sup>10</sup> com suspeita de Anemia de Fanconi e posteriormente diagnosticado como AF; **HAF**, os pais destes pacientes, e, **N** os indivíduos normais. Foram analisadas amostras irradiadas de sangue periférico e não irradiadas de 24 voluntários. Dentre eles, 6 indivíduos clinicamente normais, 9 pacientes diagnosticados com AF e 5 mães dos filhos com AF. Além disso, foram analisadas amostras de 2 pacientes com suspeita de AF, mas que foram posteriormente diagnosticados como AF negativos e as mães destes 2 pacientes.

#### 3.2.1 Critérios de inclusão

O grupo AF foi constituído por pacientes que deram entrada no HEMOPE, com características compatíveis com essa doença, como: Alterações hematológicas associadas à aplasia medular (na maioria dos casos), alterações físicas nos membros superiores e/ou histórico familiar de AF e diagnosticados como AF após a complementação do teste de fragilidade

---

<sup>10</sup> FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE PERNAMBUCO

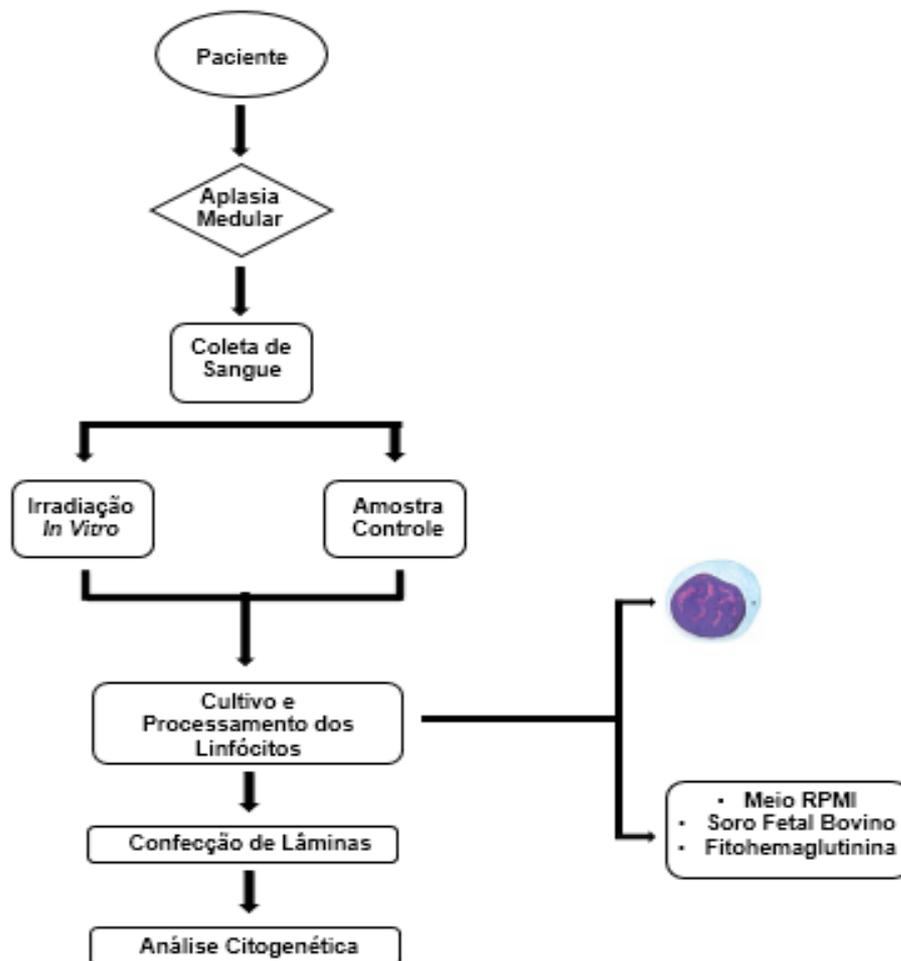
cromossômica radioinduzida. Já para o grupo HAF, bastavam ser mães biológicas de filhos diagnosticados com AF. Para o grupo N, foram classificados os indivíduos com quadro clínico normal, sem alterações físicas, hematológicas e genéticas.

### 3.3 Metodologia de Análise Citogenética

Foi empregada a metodologia de análise e quantificação de aberrações cromossômicas instáveis em células linfocitárias, por microscopia óptica de campo claro, a partir de amostras irradiadas de sangue periférico e não irradiadas, utilizando metodologia do depósito de patente N° BR10 2013 0256684.

A irradiação, cultura de linfócitos e análise citogenética seguiram as etapas do fluxograma apresentado na **Figura 7**.

**Figura 7 - Fluxograma da ação metodológica**



Fonte: o autor.

### **3.4.1 Coleta de sangue periférico**

Para cada indivíduo, foram coletados 9 mL de SP em tubo a vácuo (vacuette) contendo heparina sódica como anticoagulante. Estas amostras foram aliquotadas em seringas de 3 mL, as quais seguiram para irradiação *in vitro*, e outra serviu como controle (amostra não irradiada).

### **3.4.2 Irradiação in vitro**

As seringas contendo amostras de SP foram acondicionadas em um fantoma ( $\rho=1 \text{ g/cm}^3$ ) e irradiadas com 2 Gy em um Acelerador Linear (Siemens, Primus), utilizando raios X com energia de 6 MeV (2 Gy/min).

### **3.4.3 Cultivo de linfócitos do sangue periférico**

As amostras irradiadas e não irradiadas foram transportadas até o LAMBDA e submetidas a banho-maria a 37°C por 2 horas. Em seguida, transferidas para garrafas de cultura contendo meio RPMI1640, soro bovino fetal e fitohemaglutinina, e acondicionadas em incubadora por 48 horas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> (3 horas antes do término da cultura, adicionou-se Colcemid, o qual tem a função de parar o ciclo celular).

### **3.4.4 Preparação dos linfócitos para análise citogenética**

Ao término da incubação, as amostras foram transferidas para tubos cônicos, onde foram centrifugadas para a retirada do sobrenadante e ressuspensão das células em Cloreto de Potássio (KCl a 0,57%), em banho-maria por 7 minutos. Posteriormente ao choque hipotônico, as amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante retirado e, desta vez, as células foram ressuspensas em fixador. O processo de lavagem foi realizado até a obtenção de pellet celular limpo.

### **3.4.5 Confeção das lâminas e análise citogenética**

A suspensão celular foi gotejada em lâminas pré-aquecidas a vapor, secadas sobre placa metálica em banho-maria a 70°C, coradas com GIEMSA e analisadas **200 metáfases completas para cada amostra.**

#### **3.4.6 Critérios de análise das alterações cromossômicas**

As alterações cromossômicas em termos estruturais foram classificadas seguindo os critérios descritos no manual da Agência Internacional de Energia Atômica (2011).

- a) Os dicêntricos, bioindicadores de exposição às radiações ionizantes, cujos cromossomos possuem dois centrômeros, são formados a partir da junção das extremidades de dois cromossomos distintos. Estas alterações foram quantificadas apenas quando acompanhadas de seu fragmento acêntrico.
- b) Os fragmentos em excesso são estruturas que não possuem centrômeros, formados a partir de deleções cromossômicas terminais ou intersticiais. Estes fragmentos foram quantificados apenas quando não oriundos da formação de dicêntricos ou de outra estrutura que resulte em fragmentos na sua formação.
- c) Falhas cromatídicas e cromossômicas são alterações minuciosas em apenas uma cromátide, no primeiro caso, e nas duas cromátides, no segundo caso. Para considerarmos uma falha cromatídica, devemos observar a extensão da interrupção no braço do cromossomo, que deve ser menor que a largura de sua cromátide. Ao observar esta alteração, a coloração no local da lesão apresenta-se como um risco bem fino.
- d) Quebras cromatídicas e cromossômicas são estruturas mais perceptíveis em comparação às falhas, pois na quebra é possível observar que as cromátides estão partidas e não fazem mais parte do cromossomo, sendo a ruptura maior que a largura dos braços do cromossomo alterado.
- e) Os cromossomos trirradiais, quadrirradiais e rearranjos são estruturas mais complexas, não havendo padrão definido para sua formação.

As alterações descritas no item C e D foram unificadas em apenas um parâmetro, classificado como “quebras e falhas cromatídicas e cromossômicas. Já as alterações do item E foram classificadas como Figuras cromossômicas.

Nesse contexto, o critério estabelecido para pontuação das alterações cromossômicas é feito através de uma razão entre a quantidade de determinada alteração pela quantidade de células analisadas, como representada na equação abaixo:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de alteração cromossômica}}{\text{Quantidade de células analisadas}} = \text{Frequência de alteração cromossômica}$$

### **3.5 Análise estatística**

Para tratamento dos dados obtidos no presente trabalho, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual é indicado para avaliar diferenças entre duas pequenas amostras ( $n < 30$ ), de diferentes tamanhos e/ou com variâncias desiguais (FAY; PROSCHAN, 2010; HART, 2001). Foi considerado um nível de significância de 5%.

Para a construção dos intervalos de confiança (IC) das frequências das aberrações cromossômicas, foi utilizada a distribuição de t-Student, adotando-se um nível de confiança de 95%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados da avaliação citogenética para fragilidade cromossômica em linfócitos do sangue periférico

#### 4.1.1 Indivíduos normais

Na Tabela 3 são apresentados os valores das frequências de aberrações cromossômicas obtidas após as análises citogenéticas em amostras de SP, para indivíduos normais na condição controle (não irradiadas). Os valores encontrados estão de acordo com o background estabelecido pela IAEA (2011).

**Tabela 3 – Frequência de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, obtidas após a análise citogenética em amostras não irradiadas do SP de indivíduos normais**

Indivíduo	0 Gy			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
N1	0	0	0	0
N2	0	0	0	0
N3	0	0	0,025	0
N4	0	0	0,005	0
N5	0	0	0	0
N6	0	0	0	0

N – Indivíduo Normal, **DIC** – Dicêntrico, **FRAG** – Fragmento

Nos testes laboratoriais para diagnóstico AF, seja utilizando DEB ou MMC, são analisadas amostras controle, não submetidas ao agente químico, e aquelas com a presença do agente químico. Este procedimento é importante para evidenciar as possíveis alterações qualitativas e quantitativas das alterações cromossômicas. Assim, foi necessário realizar a irradiação das amostras de SP dos indivíduos normais para poder realizar a comparação com os demais grupos estudados. Esses resultados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4 – Frequências de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, após análise citogenética em amostras irradiadas do SP de indivíduos normais**

Indivíduo	2 Gy			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
N1	0,145	0,120	0,020	0
N2	0,150	0,085	0,010	0
N3	0,165	0,085	0,020	0
N4	0,170	0,070	0,025	0
N5	0,175	0,070	0,015	0
N6	0,180	0,085	0,025	0

N – Indivíduo Normal, **DIC** – Dicêntrico, **FRAG** – Fragmento

É possível observar um aumento significativo nas frequências das alterações cromossômicas. Os valores médios das frequências para dicêntricos, fragmentos e falhas e quebras foram, respectivamente, de:  $0,164 \pm 0,014$ ;  $0,086 \pm 0,018$  e;  $0,019 \pm 0,005$ . Estas médias diferem daquelas obtidas por Lemos-Pinto e cols. (2015), porém, isto pode ser explicado pelo fato de que no presente trabalho, o Colcemid foi adicionado 3 horas antes do término do cultivo, enquanto que esses autores, em sua metodologia de cultivo celular, adicionaram o no início do cultivo. Estas pequenas alterações na metodologia permitem uma maior obtenção de células em 1º metáfase e, conseqüentemente, mais aberrações cromossômicas.

Essas alterações cromossômicas instáveis podem ser produzidas após a interação da radiação ionizante com a molécula de DNA, simultaneamente a erros nos mecanismos de reparo, como: reparo por excisão de bases, que é mais atuante em lesões simples; recombinação homóloga e junção de extremidades não homólogas, mecanismos atuantes em lesões mais complexas, que é o caso das quebras da dupla-fita do DNA (GAUBEUR; MOURA; CHAMMAS, 2015).

Segundo Gaubeur e cols. (2015), apesar de as radiações ionizantes induzirem quebras simples na molécula do DNA (SSBs), a principal lesão radioinduzida é a quebra da dupla hélice desta molécula (DBSs). Isto porque o mecanismo de reparo por excisão de base é suficiente para remover completamente as lesões causadas em uma única fita. Por outro lado, isto não acontece com os mecanismos de reparo por recombinação homóloga e junções extremidades não homólogas, que são as duas vias principais atuantes em DSBs. Estes dois mecanismos,

devido à natureza citotóxica da quebra dupla, permitem reparos inadequados, acarretando em alterações cromossômicas.

#### 4.1.2 Pacientes com Anemia de Fanconi

Na Tabela 5 são apresentados os resultados das aberrações cromossômicas observadas em amostras de SP não irradiadas de pacientes AF. Observa-se que, mesmo na condição controle, estes indivíduos apresentaram alterações cromossômicas espontâneas em quantidade elevada quando comparadas às apresentadas nas amostras do grupo N.

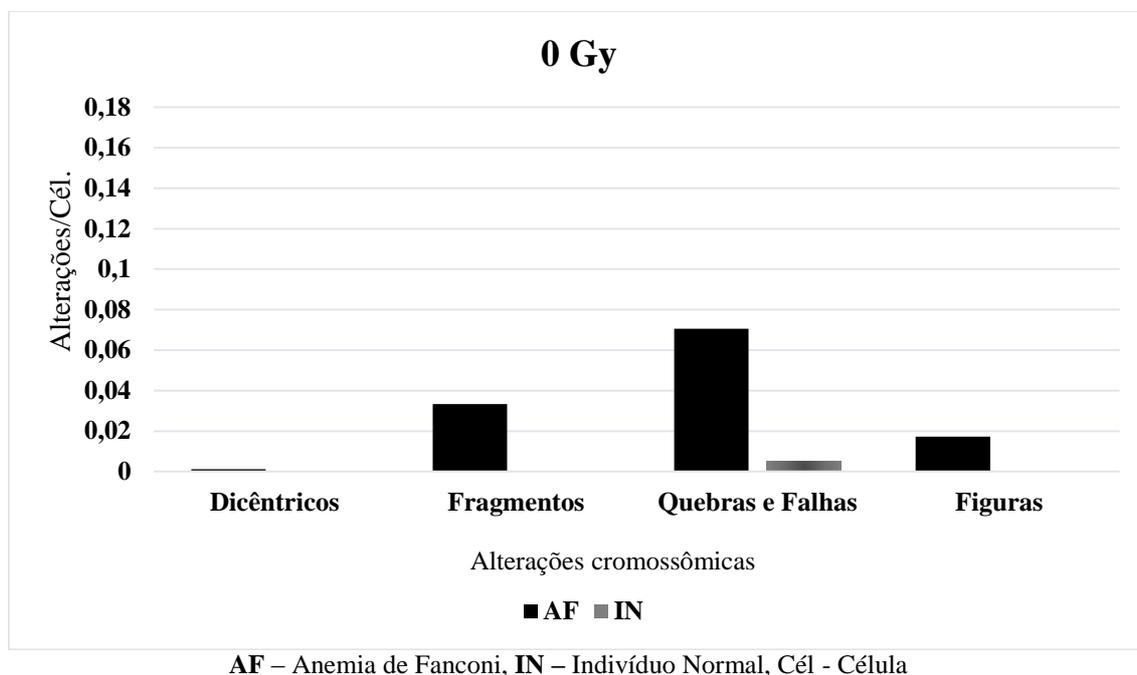
**Tabela 5 - Frequências de aberrações cromossômicas, a partir de 200 metáfases, após a análise citogenética em amostras não irradiadas do SP de pacientes AF**

Indivíduo	Amostras não irradiadas			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
AF1	0	0,025	0,005	0,020
AF2	0	0,030	0,100	0,015
AF3	0,005	0,020	0,140	0,025
AF4	0	0,005	0,050	0,005
AF5	0	0,010	0,040	0,010
AF6	0,005	0,075	0,075	0,020
AF7	0	0,035	0,125	0,020
AF8	0	0,045	0,030	0,015
AF9	0	0,055	0,070	0,025

AF – Anemia de Fanconi, DIC – Dicêntrico, FRAG – Fragmento

Esses resultados corroboram com a característica de instabilidade genômica dessa síndrome, aspecto destacado pelos primeiros trabalhos relacionados à fragilidade cromossômica, realizados por Schroeder Tm e Anshütz F (1964) e Auerbach e cols. (1989). Além dessa da frequência espontânea de ACs, esses estudos evidenciaram também a presença de estruturas radiais, as quais não são detectadas em indivíduos normais, conforme exemplificado graficamente na Figura 8. Estas alterações ocorrem devido à instabilidade genômica associada a falhas no mecanismo de reparo das células AF, bem como à deficiência na remoção de radicais livres (AUERBACH, 2015; FARGO et al., 2014).

**Figura 8 - Comparação entre as medianas das frequências de alterações cromossômicas espontâneas presentes nos grupos AF e IN**



Na Tabela 6, são apresentados os resultados das alterações cromossômicas para as amostras irradiadas do grupo AF. É possível observar uma diminuição significativa na frequência média de dicêntricos ( $0,098 \pm 0,023$ ) comparadas às do grupo N ( $0,164 \pm 0,014$ ). Por outro lado, para fragmentos, quebras e falhas, observou-se um aumento expressivo quando comparado ao grupo N, sendo os valores médios das frequências dessas aberrações de  $0,141 \pm 0,038$  e  $0,122 \pm 0,048$ , respectivamente.

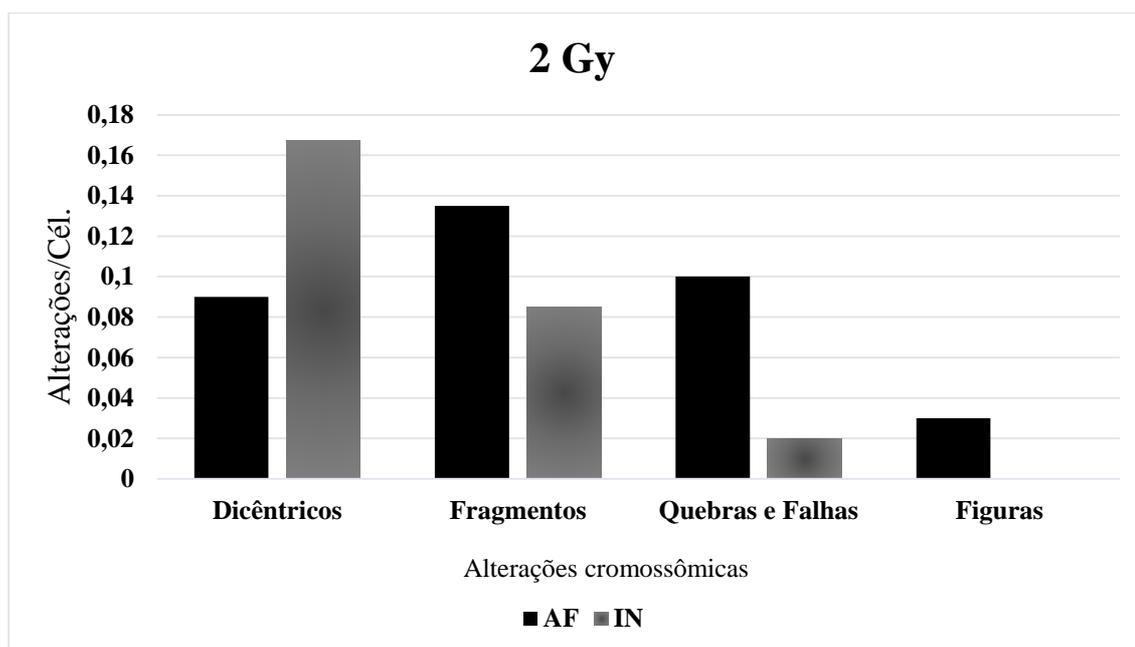
**Tabela 6 - Frequências de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, após a análise citogenética em amostras irradiadas do SP de pacientes AF**

Indivíduo	2 Gy			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
AF1	0,083	0,150	0,150	0,066
AF2*	0,060	0,120	0,200	0,050
AF3	0,085	0,125	0,100	0,055
AF4	0,090	0,135	0,095	0,030
AF5	0,090	0,065	0,070	0,020
AF6	0,100	0,175	0,050	0,020
AF7*	0,115	0,130	0,140	0,040
AF8	0,130	0,210	0,100	0,020
AF9	0,135	0,165	0,130	0,030

\* - DEB+, AF – Anemia de Fanconi, DIC – Dicêntrico, FRAG – Fragmento

As diferenças encontradas para as frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas dos grupos IN e AF podem ser melhor visualizadas na Figura 9.

**Figura 9 - Comparação entre as medianas das frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas presentes nos grupos AF e IN**



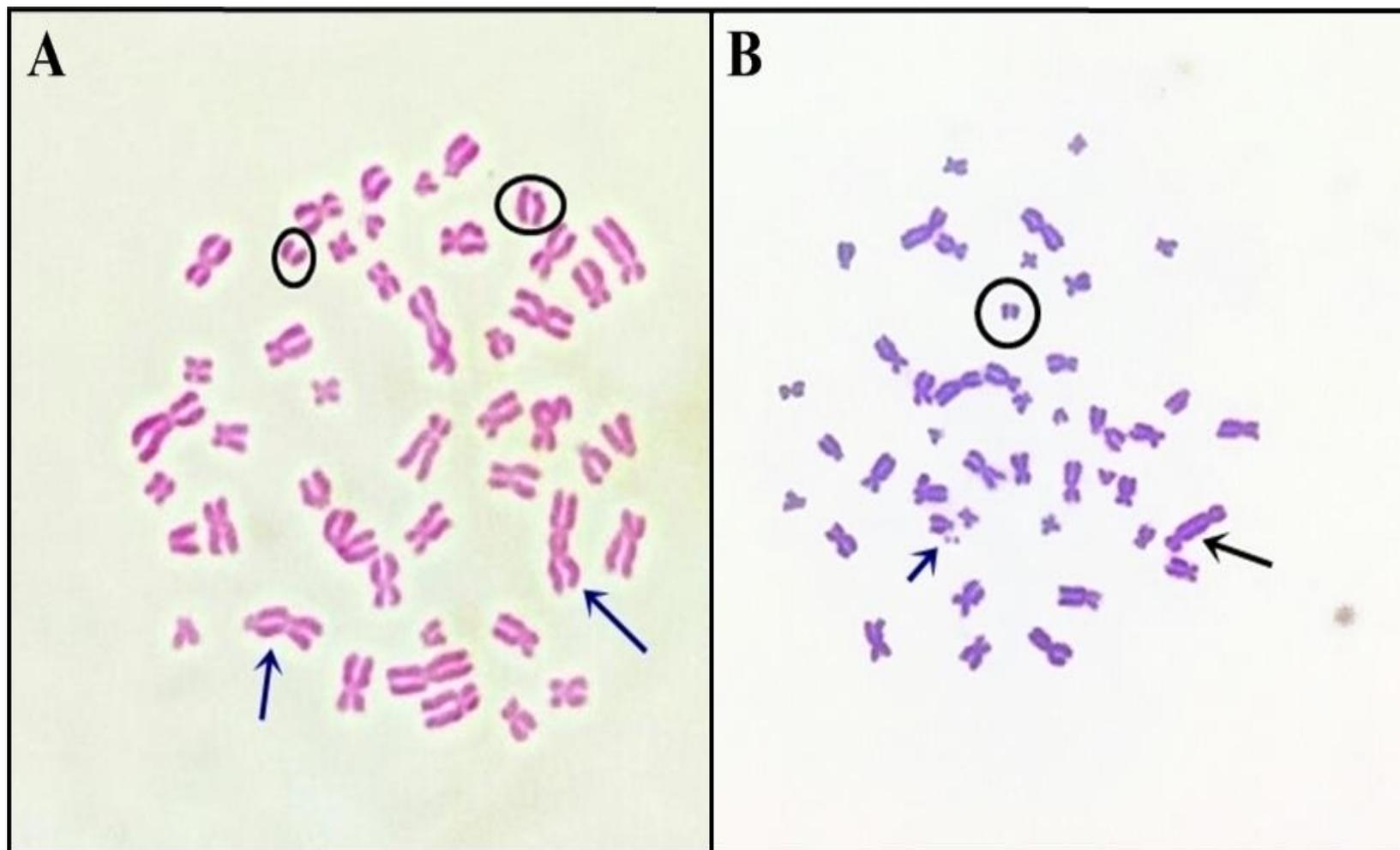
AF – Anemia de Fanconi, IN – Indivíduo Normal, Cél - Célula

Na Anemia de Fanconi, que é caracterizada como uma síndrome de instabilidade cromossômica, uma das proteínas centrais na via de reparação AF/BRCA está envolvida em três vias clássicas de mecanismo de reparo. Dentre elas, destaca-se a via do mecanismo por recombinação homóloga, responsável por reparar danos na dupla fita do DNA.

Desta forma, através de falhas no mecanismo de recombinação homóloga, ocorre a diminuição da frequência de dicêntricos e aumento da frequência das demais alterações cromossômicas, bem como a formação de estruturas mais complexas, como é o caso dos cromossomos radiais (trirradiais, quadrirradiais e rearranjos), que estão ilustrados na **Figura 11** e ampliadas na **Figura 11B**. Tais cromossomos apenas foram observados nos indivíduos AF. Estas alterações classificadas como FIGURAS (frequência média de  $0.042 \pm 0,022$ ), surgem em consequência da hipersensibilidade à RI (agente clastogênico) inerente à instabilidade genômica.

Como os indivíduos normais não possuem esse tipo de falha no mecanismo de reparo, as células conseguem no geral reparar de maneira eficaz as lesões radioinduzidas, inclusive quando há quebras da dupla hélice do DNA. Mesmo a formação de cromossomos dicêntricos, que ocorrem por eventuais erros no reparo das DSBs, durante a recombinação homóloga e as junções de extremidades não homólogas, têm comparativamente inferior complexidade e importância biológica (GAUBEUR; MOURA; CHAMMAS, 2015). Exemplos das alterações cromossômicas radioinduzidas comumente verificadas em IN estão ilustradas na **Figura 10**.

Figura 10 - Alterações cromossômicas radioinduzida encontradas em sangue periférico de indivíduos normais



A) Metáfase apresentando **dois dicêntricos (seta azul)** e seus respectivos **fragmentos (círculo preto)**; B) Metáfase apresentando um **dicêntrico (seta preta)**, seu respectivo **fragmento (círculo preto)** e um **fragmento em excesso (seta azul)**.

Figura 11 - Alterações cromossômicas típicas de Anemia de Fanconi

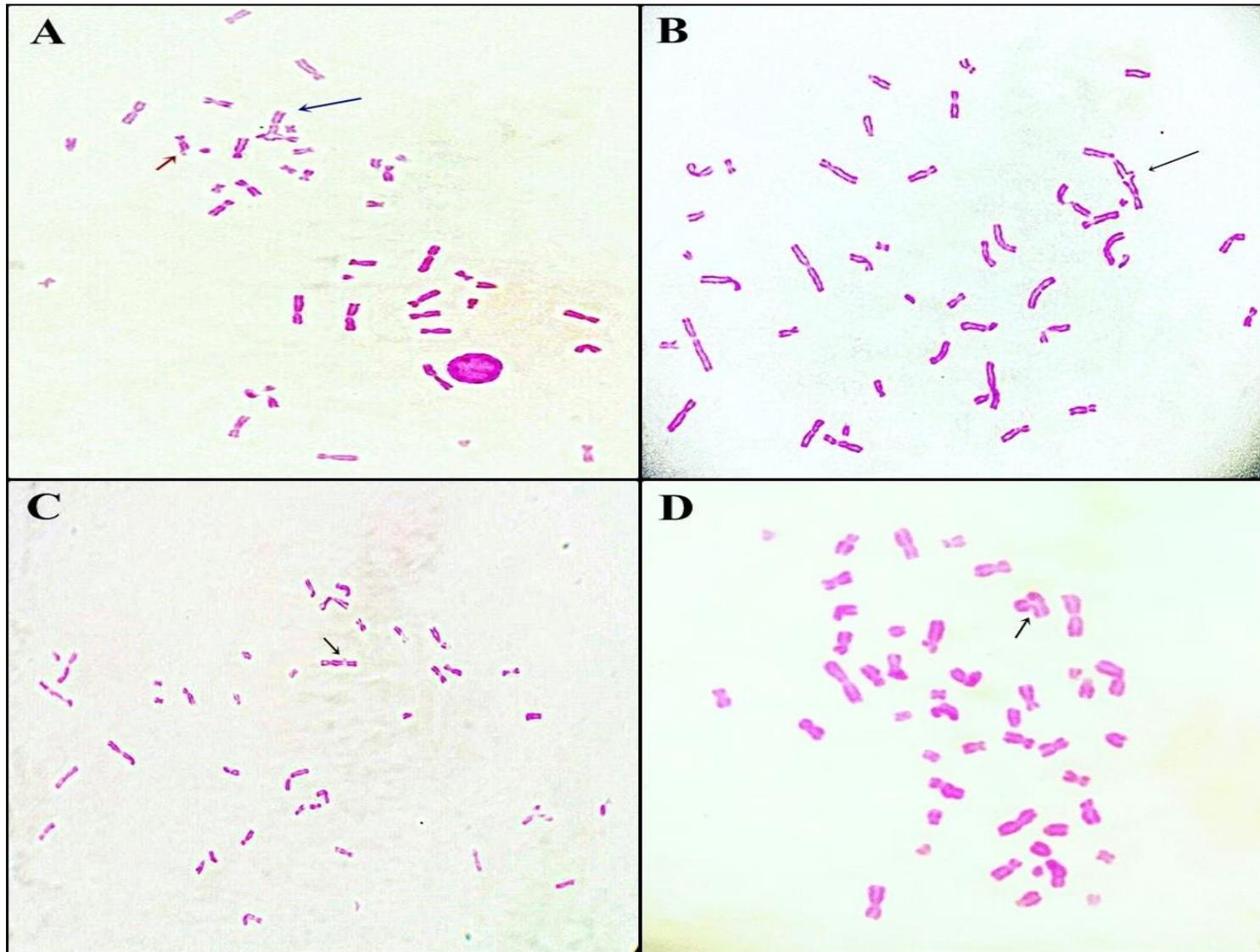
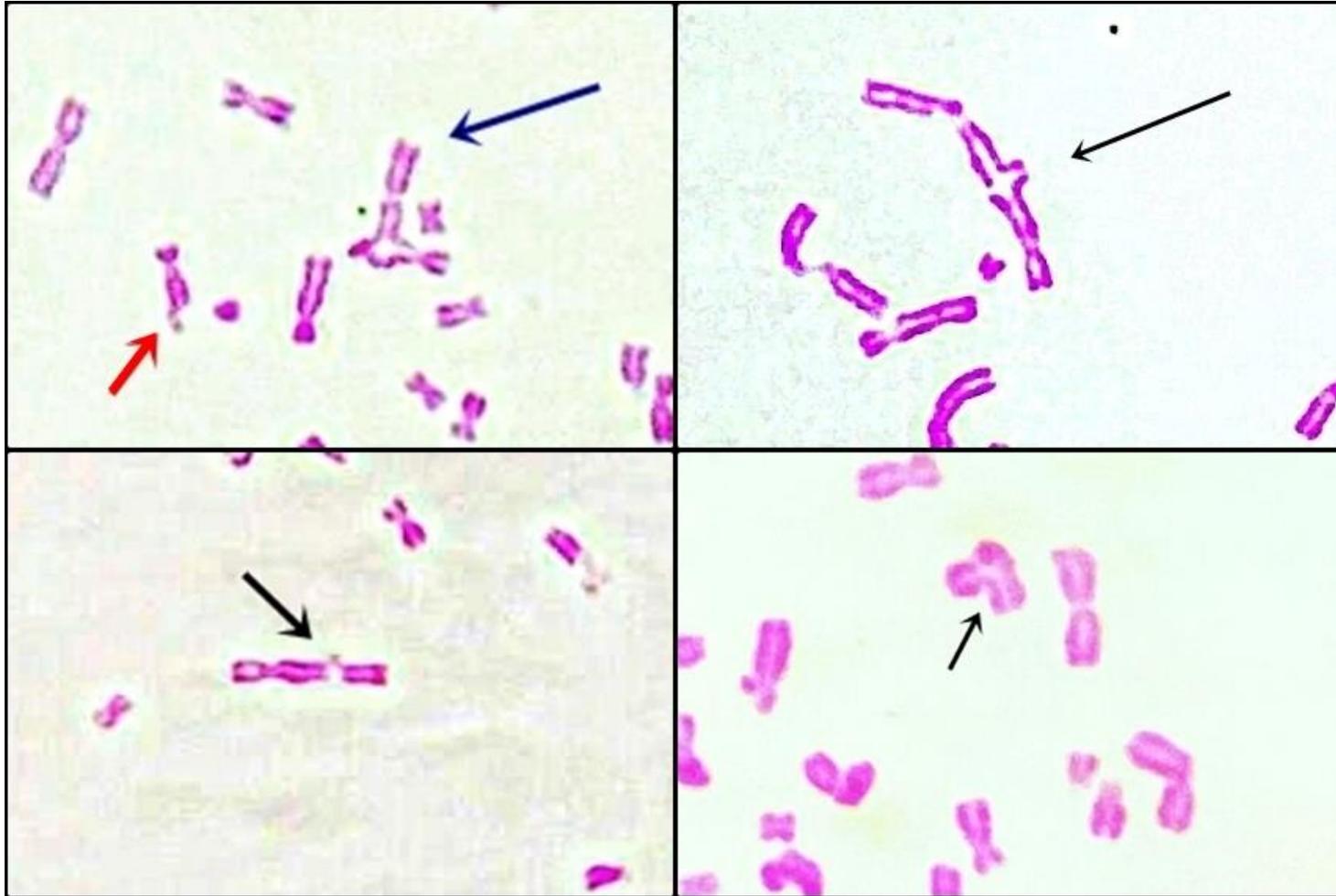


Figura 11B – Figura 11 ampliada com as estruturas típicas de Anemia de Fanconi pós-irradiação das amostras



A) Metáfase apresentando **uma quebra cromossômica (seta preta)** e **um quadrirradial (seta azul)**; B) Metáfase apresentando um **quadrirradial (na seta)**; C) Metáfase apresentando um **rearranjo cromossômico (apontado na seta)** e D) Metáfase apresentando uma **figura trirradial (na seta)**.

Saraswathy e Natarajan (2000), para irradiar amostras do SP de pacientes com AF, também utilizaram Raios-X e dose de 2 Gy, mas aparelho e a taxa de dose diferentes: Máquina ENRAF, operando a 200 kV, 6 mA a uma taxa de dose de 2 Gy/min. Esses autores observaram um aumento nas frequências de todas as aberrações cromossômicas instáveis observadas, a saber: dicêntricos, fragmentos, quebras e falhas, rearranjos e cromossomos em anel. Este fenômeno não foi observado no presente estudo, visto que a frequência média de dicêntricos do grupo AF foi significativamente menor quando comparada com a frequência encontrada no grupo N. Por outro lado, trabalhos como o de A. Mohseni-Meybodi e cols. (2007) e Francesc e cols. (2001) concluíram que não seria possível identificar pacientes AF através da irradiação das amostras de sangue periférico.

As divergências ligadas aos estudos de fragilidade cromossômica radioinduzida foram explicadas por Lemos-Pinto e cols. (2015), que evidenciaram que as diferenças nas frequências de aberrações cromossômicas radioinduzidas estão relacionadas ao tipo de radiação ionizante e aos parâmetros utilizados na irradiação *in vitro*.

#### 4.1.3 Heterozigotos para Anemia de Fanconi

Nas Tabelas 7 e 8, são apresentadas as frequências das aberrações cromossômicas obtidas após análise citogenética de amostras não irradiadas e irradiadas, respectivamente, do SP em HAF.

**Tabela 7 - Frequências de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, após a análise citogenética em amostras não irradiadas do SP de indivíduos heterozigotos para AF**

Indivíduo	Amostras não irradiadas			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
HAF1	0	0,005	0,010	0
HAF2	0	0,005	0,005	0
HAF3	0	0	0,010	0
HAF4	0	0,005	0,010	0
HAF5	0	0,010	0,010	0

HAF – Heterozigoto para Anemia de Fanconi, DIC – Dicêntrico, FRAG – Fragmento

**Tabela 8 - Frequências de aberrações cromossômicas, em 200 metáfases, após a análise citogenética em amostras irradiadas do SP de indivíduos heterozigotos para AF**

Indivíduo	2 Gy			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
HAF1	0,120	0,100	0,130	0
HAF2	0,120	0,140	0,065	0
HAF3	0,125	0,170	0,120	0
HAF4	0,125	0,090	0,085	0
HAF5	0,130	0,105	0,050	0

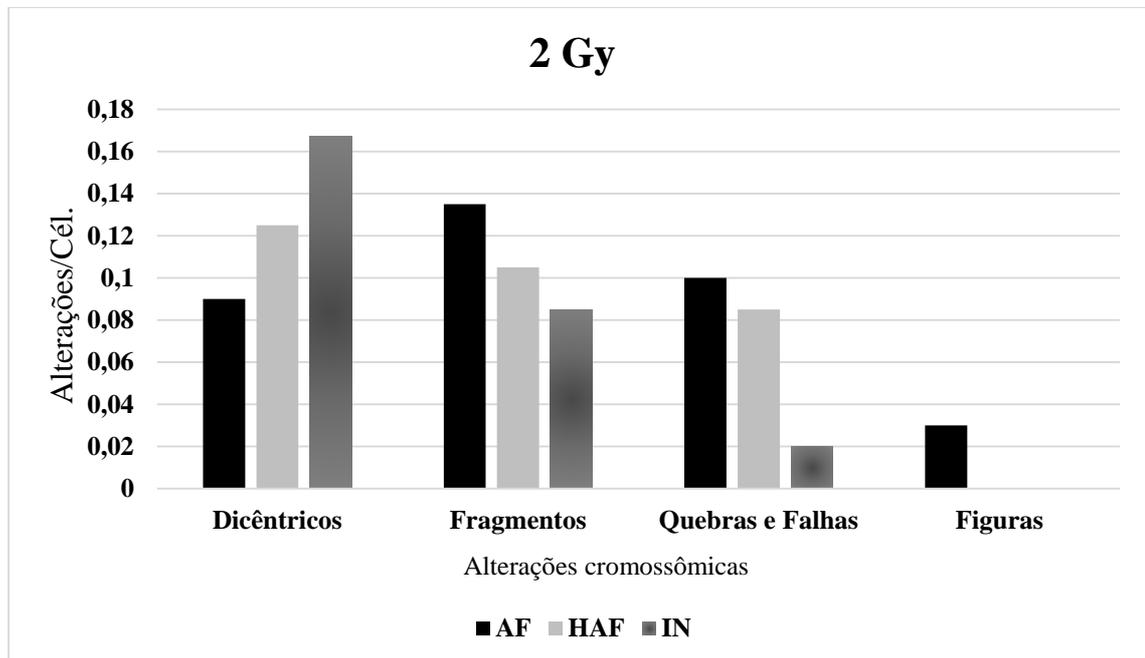
HAF – Heterozigoto para Anemia de Fanconi, DIC – Dicêntrico, FRAG – Fragmento

Após a irradiação, o grupo HAF, em comparação ao N, apresentou uma diminuição na frequência de dicêntricos e um aumento das frequências de fragmentos, quebras e falhas, mas ambos não apresentam Figuras cromossômicas. Deste modo, as amostras irradiadas dos indivíduos HAF passaram a apresentar alterações citogenéticas semelhantes às dos indivíduos AF, em termos de tipo e frequência, exceto quanto ao parâmetro das figuras radiais (Tabela 8). As frequências médias das alterações cromossômicas radioinduzidas encontradas, para o grupo HAF, foram de  $0,124 \pm 0,004$ ;  $0,121 \pm 0,033$  e  $0,090 \pm 0,034$  para dicêntricos, fragmentos, quebras e falhas, respectivamente.

Esses resultados indicam que o grupo HAF encontra-se em um nível intermediário de fragilidade cromossômica entre N e AF (apresentados na Figura 12), conforme também observaram Djuzenova e cols. (2001), que utilizaram ensaio cometa para identificar o grau de fragmentação do DNA após irradiação *in vitro*.

Segundo Bogliolo e Surrallés (2015), os indivíduos HAF possuem mutações monoalélicas nos genes BRCA1 e BRCA2. Estas proteínas anti-oncogenes, além de estarem associadas à predisposição do câncer de mama, também são peças-chave no mecanismo de reparo do DNA, o que justificaria as frequências elevadas de alterações cromossômicas radioinduzidas nas amostras destes indivíduos.

**Figura 12 - Comparação entre as medianas das frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas presentes nos grupos AF, HAF e IN**

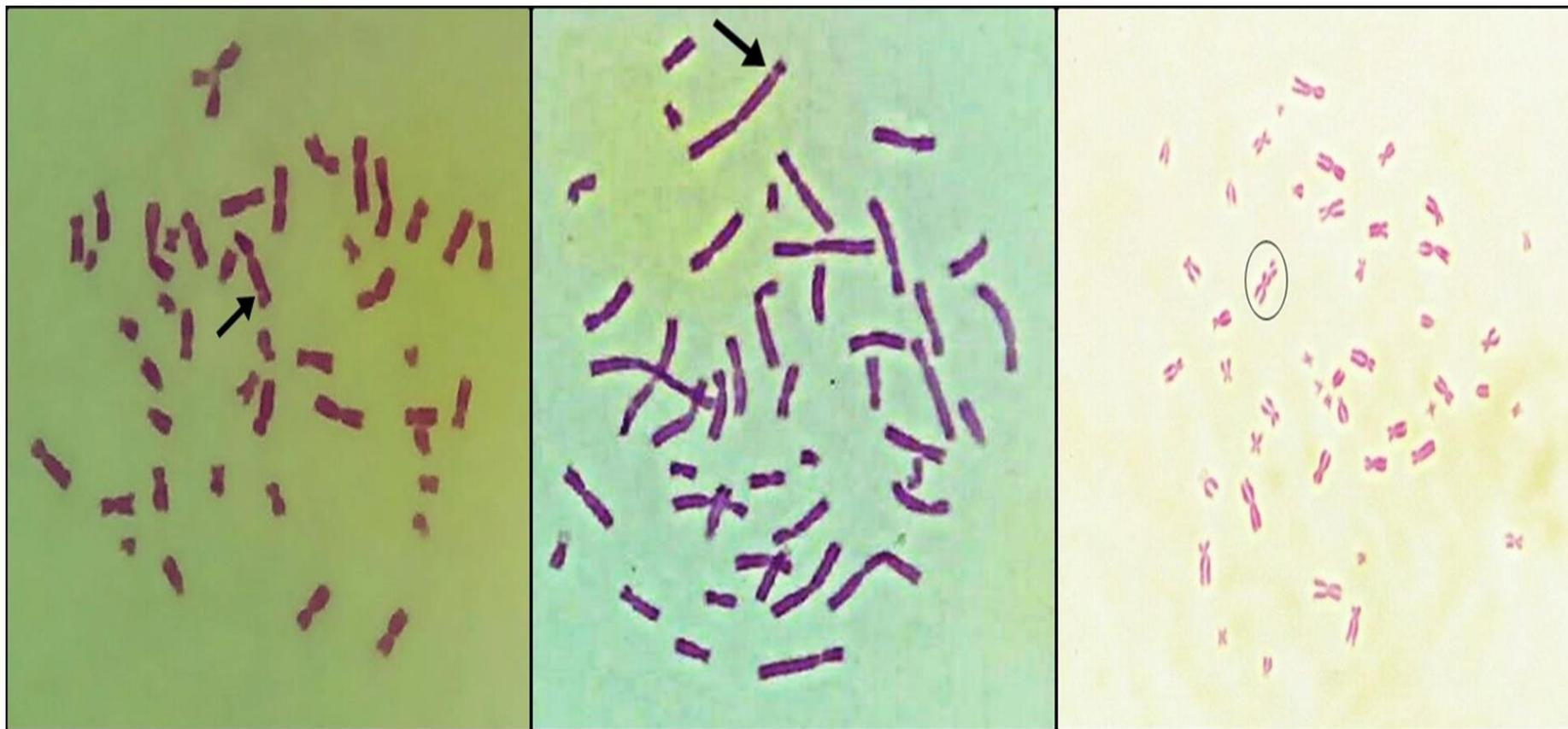


AF – Anemia de Fanconi, HAF – Heterozigoto para Anemia de Fanconi, IN – Indivíduo Normal, Cél - Célula

Como já discutido nos resultados do grupo AF, Mohseni-Meybodi e cols. (2007) e Francesc e cols. (2001) não observaram diferenças significativas para as taxas de alterações cromossômicas entre os grupos HAF, N e AF, tanto utilizando RI, quanto MMC. Isto também ocorreu nos estudos de Fargo e cols. (2014), os quais descreveram não haver possibilidade de identificar indivíduos HAF quando se utiliza DEB e MMC no teste de fragilidade cromossômica.

As alterações cromossômicas mais comumente encontradas em metáfases no sangue periférico de indivíduos HAF, além dos dicêntricos e fragmentos, estão ilustradas na Figura 13.

Figura 13 - Alterações cromossômicas radioinduzidas mais comuns encontradas em sangue periférico de heterozigotos para AF



A) Metáfase apresentando **uma falha cromatídica (apontada na seta)**; B) Metáfase apresentando **uma falha cromossômica (na seta)**; C) Metáfase apresentando um **uma quebra cromatídica (apontada na seta)**.

#### **4.2 A aplicabilidade da metodologia de fragilidade cromossômica radioinduzida para HAF (N° BR10 2013 0256684).**

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que as frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas são uniformes em diversas populações do mundo. Foi assim que Lima e cols. (2013) utilizaram esse e outros conhecimentos da dosimetria citogenética para identificar pacientes AF, através do comportamento das células irradiadas, e verificaram a presença de estruturas cromossômicas semelhantes àquelas induzidas por DEB.

É importante ressaltar que a metodologia de fragilidade cromossômica radioinduzida, até o momento, não retornou resultados falsos positivos e, além disso, nos casos em que esta técnica apontou resultados inconclusivos quanto à Fanconi, a mesma situação ocorreu quando foi realizado, para os mesmos indivíduos, o teste DEB.

A dosimetria citogenética foi ponto de partida para o estabelecimento da metodologia do presente estudo, permitindo fazer uma inferência sobre como as amostras do grupo N iriam se comportar em termos de frequências e tipos de aberrações cromossômicas de acordo com a dose de radiação absorvida (AMARAL, A. et al., 2008). Também que existem diferenças significativas (Tabela 9) em todos os parâmetros analisados entre as amostras irradiadas dos N e dos pacientes AF (Lima e cols., 2013). Essas diferenças foram comprovadas pelo teste de Mann-Whitney, o qual indicou que existe diferença estatística significativa, ao nível de significância de 5%, para: dicêntricos (p-valor = 0,0015), fragmentos (p-valor = 0,0157), falhas e quebras (p-valor = 0,0015) e figuras (p-valor = 0,0001).

Na Tabela 9 são apresentados os intervalos de confiança (IC) das frequências das aberrações cromossômicas para AF, HAF e N obtidos nesta pesquisa. Após o estabelecimento dos ICs, foi possível observar diferenças significativas entre os grupos, sugerindo uma possível distinção através da comparação de parâmetros pós-irradiação.

**Tabela 9 - Intervalo de confiança após irradiação considerando 95% de confiança**

Grupo	IC (95%) PARA 2 Gy			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
AF	08,04 - 11,72	11,8 - 17,17	07,04 - 13,62	2,22 - 5,55
HAF	11,88 - 12,91	05,76 - 15,43	05,89 - 15,10	0
N	14,40 - 18,30	06,00 - 11,20	01,10 - 02,70	0

AF – Anemia de Fanconi, DIC – Dicêntricos, FRAG – Fragmentos, HAF – Heterozigoto para AF, IN – Indivíduo normal

Já entre os grupos N e HAF, foram observadas diferenças nos ICs para dicêntricos, fragmentos, falhas e quebras, havendo uma discreta sobreposição para os fragmentos. Tanto para N, quanto para HAF não foram observadas estruturas cromossômicas radiais. O teste de Mann-Whitney indicou que os grupos IN e HAF diferiram para dicêntricos (p-valor = 0,0062), fragmentos (p-valor = 0,0285) e, falhas e quebras (p-valor = 0,0062).

Quando comparados, foi possível observar que os ICs de HAF e AF se sobrepõem para dicêntricos, fragmentos, falhas e quebras, indicando não ser possível distinguir esses grupos caso sejam considerados apenas esses 3 parâmetros. No entanto, o grupo HAF não apresentou nenhuma estrutura radial, quer seja trirradial e quadrirradial, quer seja rearranjo, assim permitindo separar os grupos a partir destas alterações cromossômicas. O teste de Mann-Whitney confirmou que não ocorreu, entre estes grupos, diferença estatística significativa para dicêntricos (p-valor = 0,083), fragmentos (p-valor = 0,1096) e falhas e quebras (p-valor = 0,6892).

A mesma eficácia na identificação dos heterozigotos não tem sido alcançada quando se utiliza DEB ou MMC. Fargos e cols. (2014) descreveram que ao utilizarem as substâncias comumente empregadas nos testes de quebras cromossômicas, há sobreposição no índice de fragilidade cromossômica dos heterozigotos, pacientes AF com mosaïcismo somático, indivíduos normais e pacientes com outras síndromes de sobreposição à Fanconi.

Isto porque os agentes alquilantes –DEB e MMC– agem por indução de ligações cruzadas intercadeias, que além de serem lesões altamente específicas, o seu mecanismo de reparo é pouco conhecido (STINGELE et al., 2014). Por outro lado, como já foi discutido anteriormente, as radiações ionizantes agem através da formação de SSBs e DSDs, sendo esta última, reparada por recombinação homóloga ou não homóloga. Estes mecanismos têm como

principais proteínas atuantes a BRCA1 e BRCA2, proteínas estas que participam da via principal no mecanismo de reparo das células AF e portadores heterozigotos (BOGLIOLO; SURRALLÉS, 2015; GAUBEUR; MOURA; CHAMMAS, 2015)

#### 4.2.1 Estudo de caso – Teste de fragilidade radioinduzida

Como parte da rotina do Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada, foram analisadas, concomitantemente, amostras de indivíduos HAF e pacientes com AF. Dentre eles, dois pacientes com suspeita clínica de AF mereceram destaque, devido a discrepâncias entre os caracteres fenotípicos (Tabela 10) e os resultados obtidos no teste de fragilidade às RIs (Tabela 12).

**Tabela 10 - Características clínicas dos pacientes com suspeita de AF**

Indivíduo	Idade	Estatura	Alterações físicas e hematológicas	Pais consanguíneos
SP1	6	Normal	AA Severa	Não
SP2	5	Baixa	AA; Mãos displásicas; Hiperpigmentação da pele;	Sim

AA – Anemia Aplásica, SAF – Suspeita de Anemia de Fanconi

**Tabela 11 – Frequência de aberrações cromossômicas espontâneas apresentadas em 200 metáfases de amostras de SP de pacientes com suspeita de AF**

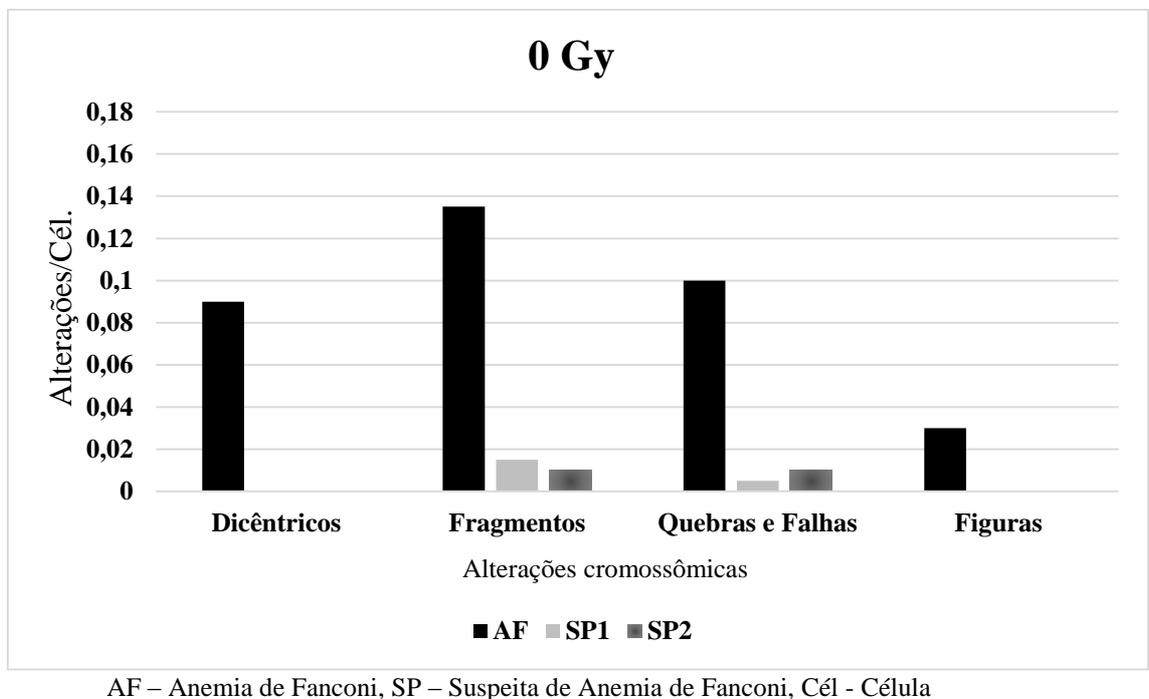
Indivíduo	0 Gy			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
SP1	0	0,010	0,010	0
SP1R	0	0,015	0,005	0
SP2	0	0,010	0,010	0

SP – Suspeita de Anemia de Fanconi, SP1R – Repetição do SP1, DIC – Dicêntricos, FRAG – Fragmentos

Os resultados citogenéticos alcançados na Tabela 11 não são compatíveis com aqueles encontrados para o grupo AF (como ilustra a Figura 14), cuja frequência de alterações

cromossômicas espontânea é superior àquelas descritas na tabela com presença de figuras radiais. Como o paciente SP1 possuía algumas características clínicas de AF foi solicitada uma nova coleta de sangue para reanálise citogenética deste indivíduo (SP1R). Contudo, mais uma vez, o resultado apresentado não foi sugestivo de paciente com AF. Em estudos atuais como os de Lima e cols. (2013), Fargo e cols. (2014) e Auerbach (2015), os pacientes com AF também apresentaram frequências elevadas de alterações cromossômicas espontâneas, além de figuras radiais.

**Figura 14 – Mediana das frequências de alterações cromossômicas espontâneas do grupo AF; e valores encontrados nas amostras dos pacientes SP1 e SP2**



Entretanto, para fins de elucidação diagnóstica, também foi necessário analisar e verificar as frequências e tipos de ACs nas amostras de sangue irradiadas. Estes dados estão descritos na Tabela 12.

**Tabela 12 - Avaliação citogenética em amostras irradiadas pertencentes a pacientes com suspeita de AF**

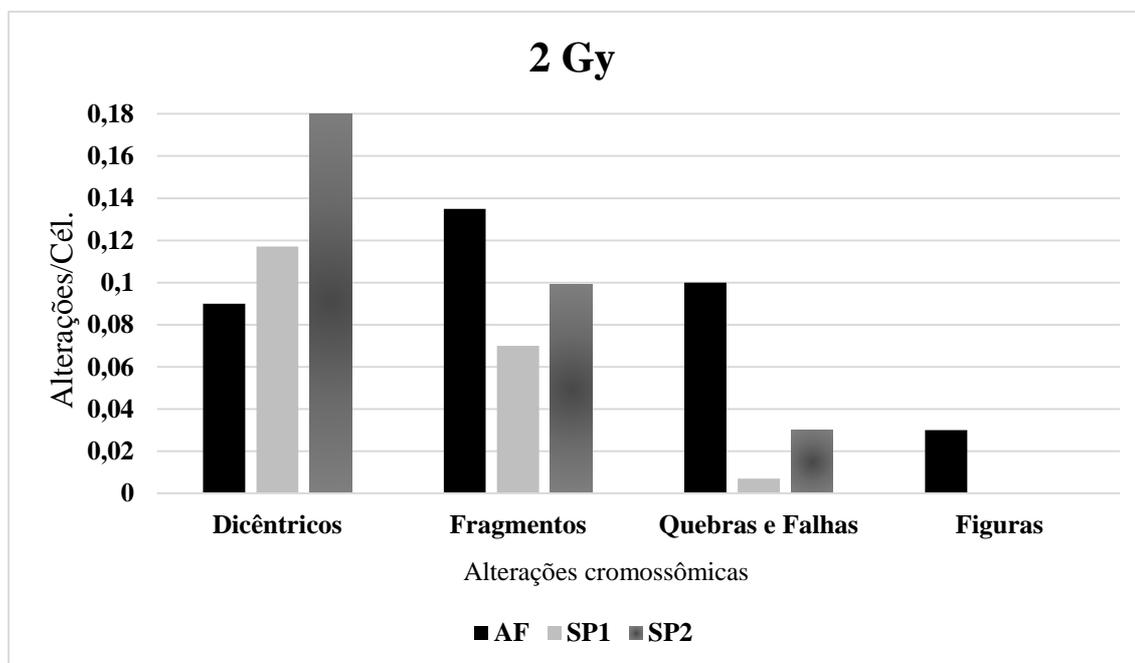
Indivíduo	2 Gy			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
SP1	0,110	0,070	0,010	0,000
SP1r	0,125	0,070	0,005	0,000
SP2	0,183	0,099	0,030	0,000

SP – Suspeita de Anemia de Fanconi, SP1r – Repetição do SP1,

DIC – Dicêntricos, FRAG – Fragmentos

Após a irradiação das amostras, os resultados permaneceram fora dos intervalos de confiança estabelecido para diagnóstico de pacientes AF. Portanto, esses pacientes foram qualificados como **AF negativo** (Figura 15).

**Figura 15- Mediana das frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas do grupo AF; e valores encontrados nas amostras dos pacientes SP1 e SP2**



AF – Anemia de Fanconi, SAF– Suspeita de Anemia de Fanconi, Cél - Célula

Também foi realizada a análise do sangue periférico (SP) irradiado dos pais destes pacientes, a fim de verificar se apresentavam características citogenéticas de **HAF** e associar estes achados com os resultados negativos obtidos para os seus filhos (Tabela 13).

**Tabela 13 – Frequências de alterações cromossômicas radioinduzidas em amostras de SP dos pais de pacientes com suspeita de AF**

Indivíduo	2 Gy			
	DIC	FRAG	FALHAS E QUEBRAS	FIGURAS
SH1	0,160	0,055	0,005	0
SH2	0,145	0,040	0,020	0

SH – Suspeita de Heterozigoto para AF, DIC – Dicêntricos, FRAG – Fragmentos

Ratificando a indicação de não AF para os pacientes SP1 e SP2, os dados encontrados para os possíveis heterozigotos (SH1 e SH2) foram semelhantes aos do grupo N, fortalecendo mais uma vez o diagnóstico citogenético negativo para o teste de fragilidade cromossômica, com uso de radiações ionizantes.

De acordo com as Diretrizes para diagnóstico e tratamento da AF (Guideline), publicado pela Fundação de Pesquisa em Anemia de Fanconi, no ano de 2014, sugerem-se algumas recomendações para a triagem em busca do diagnóstico destes pacientes com suspeita de AF, iniciando-se pelas avaliações clínicas e hematológicas, e em seguida, o teste de quebras cromossômicas utilizando DEB ou MMC. De modo que, o resultado será negativo em definitivo, apenas se o teste de quebras for negativo e não houver forte suspeita clínica para AF. Em contrapartida, se o teste DEB/MMC for negativo, mas as características clínicas indicarem forte suspeita de AF, emprega-se o teste de quebras em fibroblastos, que tem como uma de suas limitações a natureza invasiva da coleta.

Neste sentido, concomitantemente com o teste de radiação ionizante, as amostras de sangue periférico dos pacientes **SP1** e **SP2** foram submetidas ao teste de fragilidade cromossômica induzida por MMC (baseado no protocolo estabelecido por Oostra e cols. 2012), com o objetivo de comparar, e assim, confirmar o diagnóstico (**AF-**) que foi obtido através do teste utilizando RI. Os resultados para ambos os pacientes foram negativos, reforçando os resultados obtidos através da metodologia utilizada no presente trabalho, os quais estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14 - Comparação entre metodologias utilizadas para diagnóstico de dois pacientes com suspeita de AF**

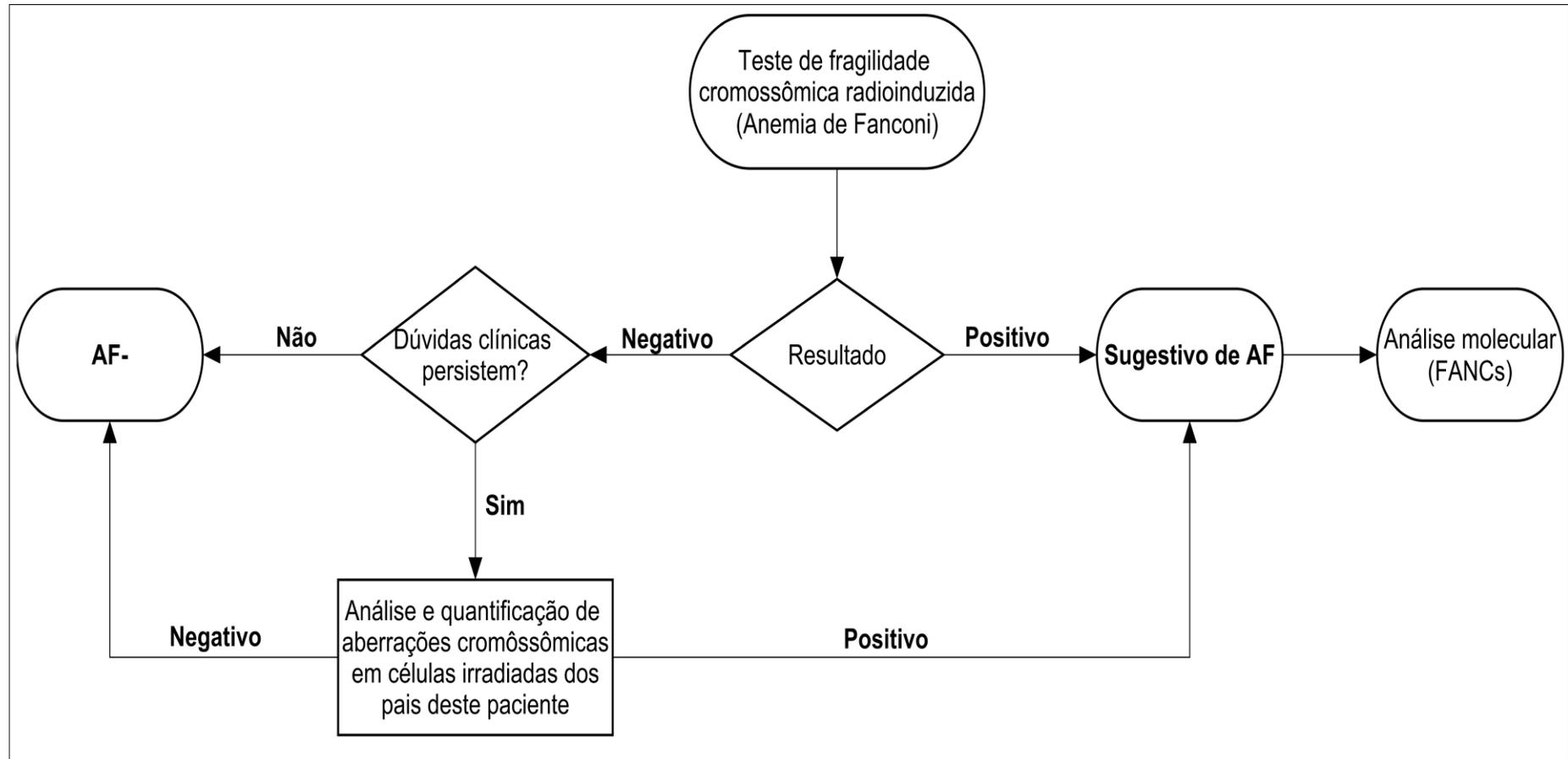
Indivíduo	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO		
	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	MMC	RI
<b>SAF1</b>	+	Negativo	Negativo
<b>SAF2</b>	++	Negativo	Negativo

+ - Suspeita clínica intermediária, ++ - Forte suspeita clínica, **SAF** – Suspeita de Anemia de Fanconi, **MMC** – Mitomicina C, **RI** – Radiação Ionizante

Este estudo de caso demonstra que, quando os resultados dos pacientes com suspeita de AF forem negativos, a análise e quantificação de aberrações cromossômicas dos pais podem contribuir para a conclusão deste diagnóstico a partir das características citogenéticas obtidas no presente estudo em amostras de sangue do grupo HAF. Assim, a metodologia em questão aplicada à identificação de heterozigotos para AF pode auxiliar em casos duvidosos de diagnóstico AF, de tal modo a evitar, em alguns casos, o teste de quebras em fibroblastos, tornando-se mais cômodo ao paciente. Esta proposta está ilustrada na Figura 16.

**Figura 16 – Proposta de fluxograma metodológico como alternativa no diagnóstico AF:**

**Análise e quantificação de aberrações cromossômicas radioinduzidas**



Embora os resultados para a identificação de indivíduos heterozigotos tenham se apresentado de maneira satisfatória, a técnica ainda não permite garantir, isoladamente, se o indivíduo é heterozigoto para AF. Isto porque o teste utilizando RI até agora não foi utilizado em pesquisas focadas em outras síndromes genéticas, a saber: síndrome da quebra de Varsóvia, de Roberts, da quebra de Nijmegen, Disqueratose congênita, Anemia de Blackfan-Diamond, as quais não foram possíveis distingui-las dos heterozigotos AF e AF-mosaicos, em recentes pesquisas utilizando DEB e MMC. Além disso, em casos específicos, como o pai sendo paciente de AF com mosaicismo somático, o teste poderia retornar um falso positivo para HAF (FARGO et al., 2014; OOSTRA et al., 2012; VAN DER LELIJ et al., 2010). No entanto, com base no fluxograma metodológico, é válido utilizá-lo como um teste subsidiário em casos de diagnóstico duvidoso para AF.

Apesar disso, o presente estudo fortalece o objetivo de futuramente utilizar a técnica de fragilidade cromossômica radioinduzida como método complementar no diagnóstico da Anemia de Fanconi, bem como auxiliar em casos de resultados inconclusivos, evitando o uso da cultura de fibroblastos para o teste de fragilidade, que é considerada uma técnica invasiva. Além disso, o teste pode contribuir para uma melhor qualidade de vida dos indivíduos heterozigotos para AF, uma vez que eles têm mutações monoalélicas que contribuem para o desenvolvimento de cânceres e neoplasias. Nesta óptica, quando diagnosticado como heterozigoto, eles poderiam ser aconselhados a respeito dos fatores sociais que contribuiriam ainda mais para o desenvolvimento de cânceres. Concomitante a isto, seriam também alertados sobre os riscos associados em gerar um filho com AF.

Em termos atuais, com base nos custos determinados nesta pesquisa, em termos de saúde pública, o teste de fragilidade cromossômica radioinduzida contribuiria para a criação de novos centros públicos voltados para os pacientes AF, assim como para os heterozigotos, por se tratar de uma técnica de fácil manipulação, não demandando cuidados adicionais de biossegurança, com custo estimado em 1/10 daquele associado ao padrão ouro. O teste de fragilidade cromossômica radioinduzida pode ser facilmente implementado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e em qualquer laboratório do mundo que trabalhe com citogenética, assim agilizando a liberação do diagnóstico e nas orientações associadas à melhoria na qualidade de vida destes grupos, precisando apenas que o técnico saiba a metodologia de cultura de linfócitos para citogenética convencional.

## 5 CONCLUSÕES

- Os heterozigotos para AF apresentaram dicêntricos, fragmentos, quebras e falhas na mesma proporção que os pacientes AF, mas não apresentaram figuras.
- Apenas os pacientes com AF apresentaram figuras radiais, como: trirradiais, quadrirradiais e rearranjos cromossômicos.
- O teste de sensibilidade às radiações ionizantes se mostrou eficaz na identificação de indivíduos heterozigotos para AF, dentro da população de estudo, indicando ser possível a sua utilização no reconhecimento destes indivíduos.

➤ **PERSPECTIVAS**

- Implementar essa técnica nas políticas públicas de saúde estabelecidas pelo SUS.
- Ampliar o número de laboratórios para diagnóstico de AF, bem como heterozigotos para AF.
- Ofertar ao mercado uma técnica alternativa ao DEB que possa garantir o diagnóstico citogenético, com eficiência e eficácia, dos indivíduos AF, além das demais vantagens em termos de custos e acessibilidade.
- Introduzir essa técnica como subsidiária em diagnósticos duvidosos de AF, podendo evitar o teste em cultura de fibroblastos.
- Ampliar as pesquisas no âmbito das síndromes associadas à fragilidade cromossômica.

## REFERÊNCIAS

- A. MOHSENI-MEYBODI; H. MOZDARANI; P. VOSOUGH. Cytogenetic sensitivity of G0 lymphocytes of Fanconi anemia patients and obligate carriers to mitomycin C and ionizing radiation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 195, p. 191–195, 2007.
- AKKARI, Y. M. et al. DNA replication is required To elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 21, p. 8283–8289, 2000.
- ALTER, B. P. et al. Fanconi Anemia. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 131, n. 7, p. 635, 1 jul. 2005.
- ALTER, B. P. Fanconi anemia and the development of leukemia. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, v. 27, n. 3–4, p. 214–221, 2014.
- AMARAL, A.; FERNANDES, T. S.; CAVALCANTI, M. B. Bioindicators in radiation protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. SPECIALISSUE, p. 91–96, 2008.
- ASLAN, D.; AMEZIANE, N.; DE WINTER, J. P. Molecular diagnosis of Fanconi anemia with next-generation sequencing in a case with subtle signs and a negative chromosomal breakage test. **Turkish Journal of Pediatrics**, v. 57, n. 3, p. 282–285, 2015.
- AUERBACH, A. D. Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Fanconi anemia and its diagnosis. **Mutation Research**, v. 668, p. 4–10, 2009.
- AUERBACH, A. D. Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis. In: **Current Protocols in Human Genetics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 8.7.1-8.7.17.
- AUERBACH, A.; ROGATKO, A.; SCHROEDER-KURTH, T. International Fanconi Anemia Registry: Relation of Clinical Symptoms to Diepoxybutane Sensitivity. **Blood**, v. 73, n. 2, p. 391–396, 1989.
- BARQUINERO, J. et al. Cytogenetic sensitivity of three Fanconi anemia heterozygotes to bleomycin and ionizing radiation. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 124, p. 80–83, 2001.
- BIGELOW, S. B.; RARY, J. M.; BENDER, M. A. G2 chromosomal radiosensitivity in Fanconi's anemia. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 63, n. 1, p. 189–199, nov. 1979.
- BOGLIOLO, M.; SURRALLÉS, J. Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. **Current opinion in genetics & development**, v. 33, p.

32–40, 2015.

BONATO, C. C.; ELNECAVE, R. H. Alterações tireoidianas associadas à radiação externa em crianças e adolescentes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 6, p. 359–366, 2011.

BOSCH, P. C.; BOGLIOLO, M.; SURRALLÉS, J. Activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway at low doses of ionization radiation. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 793, p. 9–13, 2015.

BRASIL, P. **Ministério da Saúde aprimora atendimento para pacientes de 12 doenças raras — Portal Brasil**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/06/ministerio-aprimora-atendimento-para-pacientes-com-12-doencas-raras>>. Acesso em: 27 maio. 2016a

BRASIL, P. Ministério da Saúde aprimora atendimento para pacientes de 12 doenças raras — Portal Brasil. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/06/ministerio-aprimora-atendimento-para-pacientes-com-12-doencas-raras>>. Acesso em: 27 maio. 2016a.

BRASIL, P. **Doenças raras ainda representam desafio para saúde pública — Portal Brasil**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/03/doencas-raras-ainda-representam-desafio-para-saude-publica>>. Acesso em: 27 maio. 2016b.

BUTTURINI, A et al. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1650–1655, 1994.

CASTELLA, M. et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. **Journal of medical genetics**, v. 48, n. 4, p. 242–50, 2011.

CERVENKA, J.; HIRSCH, B. A.; OPITZ, J. M. Cytogenetic differentiation of Fanconi anemia, “idiopathic” aplastic anemia, and Fanconi anemia heterozygotes. **American Journal of Medical Genetics**, v. 15, n. 2, p. 211–223, jun. 1983.

COHEN, M. M. et al. The identification of fanconi anemia genotypes by clastogenic stress. **Am J Hum Genet**, v. 34, n. 5, p. 794–810, 1982.

COMUNICAÇÃO, E. B. **Especialistas pedem inclusão de anemia de Fanconi em política de doenças raras | Agência Brasil**. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-04/especialistas-pedem-inclusao-de-anemia-de-fanconi-em-politica-de-doencas-raras>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

D’ANDREA, A. D.; GROMPE, M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 23–34, 2003.

DJUZENOVA, C. S. et al. Response to X-Irradiation of Fanconi Anemia Homozygous and Heterozygous Cells Assessed by the Single-Cell Gel Electrophoresis ( Comet ) Assay

SUMMARY : **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 2, p. 185–192, 2001.

DOGAN, Z. et al. Anesthesia for a patient with Fanconi anemia for developmental dislocation of the hip: a case report. **Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)**, v. 64, n. 3, p. 201–204, maio 2014.

DU, W.; ERDEN, O.; PANG, Q. TNF- $\alpha$  signaling in Fanconi anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 52, n. 1, p. 2–11, 2014.

DUXIN, J. P.; WALTER, J. C. What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 37, p. 49–60, 2015.

FARGO, J. H. et al. Comparison of Chromosome Breakage in Non-Mosaic and Mosaic Patients with Fanconi Anemia, Relatives, and Patients with Other Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 144, n. 1, p. 15–27, 2014.

FAY, M. P.; PROSCHAN, M. A. Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. **Stat Surv**, p. 1–39, 2010.

FEBEN, C. et al. Biallelic BRCA2 mutations in two black South African children with Fanconi anaemia. **Familial Cancer**, 9 fev. 2017.

GAUBEUR, M. A.; MOURA, E. I. DE; CHAMMAS, R. Marcadores radiométricos de dano ao DNA: possíveis alvos e estado atual Radiometric markers of DNA damage: possible targets and current status. **Revista de Medicina**, v. 95, n. 1, p. 46–56, 2015.

HART, A. Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. **Bmj**, v. 323, n. 7309, p. 391–393, 2001.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica - 12ed: Lange**. AMGH Editora, 2013.

KENNEDY, R. D.; D'ANDREA, A. D. DNA repair pathways in clinical practice: Lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 23, p. 3799–3808, 2006.

KHINCHA, P. P.; SAVAGE, S. A. Neonatal manifestations of inherited bone marrow failure syndromes. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 1, p. 57–65, 2015.

KOOK, H. et al. Fanconi anemia screening by diepoxybutane and mitomicin C tests in Korean children with bone marrow failure syndromes. **Journal of Korean Medical Science**, v. 13, n. 6, p. 623, 1998.

KUPFER, G. M. Fanconi anemia: a signal transduction and DNA repair pathway. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 86, p. 491–7, 2013.

LEMOS-PINTO, M. M. P. et al. A dose-response curve for biodosimetry from a 6 MV electron

linear accelerator. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 10, p. 908–914, 2015.

LIMA, S. C. **Uso da radiação ionizante no diagnóstico da anemia de fanconi**. [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

LLOYD, D. C.; DOLPHIN, G. W. Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. **British journal of industrial medicine**, v. 34, n. 4, p. 261–73, 1977.

MEINDL, A. et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. **Nature genetics**, v. 42, n. 5, p. 410–4, 2010.

METS, S. et al. Genetic Counselors' Experiences Regarding Communication of Reproductive Risks with Autosomal Recessive Conditions found on Cancer Panels. **Journal of genetic counseling**, p. 359–372, 2015.

MIZUTANI, S.; TAKAGI, M. XCIND as a genetic disease of X-irradiation hypersensitivity and cancer susceptibility. **International Journal of Hematology**, v. 97, n. 1, p. 37–42, 2013.

MOLDOVAN, G.-L.; D'ANDREA, A. D. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, p. 223–249, dez. 2009.

NALEPA, G.; CLAPP, D. W. Fanconi anemia and the cell cycle: new perspectives on aneuploidy. **F1000prime reports**, v. 6, n. April, p. 23, 2014.

OLIVEIRA, D. **Mecanismos de reparo de DNA em células BCR-ABL positivas**. [Tese de Doutorado] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

OOSTRA, A. B. et al. Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. **Anemia**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

OTTONI, F. et al. Do you know this syndrome? Você conhece esta síndrome? **An Bras Dermatol**, v. 81, n. 5, p. 487–489, 2005.

PAGANO, G. Mitomycin C and diepoxybutane action mechanisms and FANCC protein functions : further insights into the role for oxidative stress in Fanconi ' s anaemia phenotype Evidence for redox-dependent toxicities of mitomycin C sensitivity to these agents . **Recent. Carcinogenesis**, v. 21, n. 5, p. 1067–1068, 2000.

PAGANO, G.; D'ISCHIA, M.; PALLARDÓ, F. V. Fanconi anemia (FA) and crosslinker sensitivity: Re-appraising the origins of FA definition. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 7, p. 1137–1143, jul. 2015.

PILONETTO, D. V. et al. FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 3, p. 237–243, 2009.

- PORTO, B. et al. [Fanconi anemia: cytogenetic diagnosis of 40 cases]. **Acta Med Port**, v. 24, n. 3, p. 405–412, 2011.
- PRESTON, R. J. Radiation biology: concepts for radiation protection. **Health physics**, v. 88, n. 6, p. 545–56, 2005.
- ROSENBERG, P. S.; TAMARY, H.; ALTER, B. P. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, v. 155A, n. 8, p. 1877–83, 2011.
- ROTHFUSS, A.; GROMPE, M. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 1, p. 123–134, 2004.
- SARASWATHY, R.; NATARAJAN, A. T. Frequencies of X-ray induced chromosome aberrations in lymphocytes of xeroderma pigmentosum and Fanconi anemia patients estimated by Giemsa and fluorescence in situ hybridization staining techniques. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 893–899, 2000.
- SAWYER, S. L. et al. Biallelic Mutations in BRCA1 Cause a New Fanconi Anemia Subtype. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 2, p. 135–142, 1 fev. 2015.
- SHIMAMURA, A.; ALTER, B. P. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. **Blood Reviews**, v. 24, n. 3, p. 101–122, maio 2010.
- STINGELE, J. et al. A DNA-Dependent Protease Involved in DNA-Protein Crosslink Repair. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 327–338, jul. 2014.
- TAYLOR, A M. R. Effects of Ionizing Radiation on Cells from Fanconi's Anemia Patients. **Cancer Research**, v. 45, n. January, p. 416–420, 1985.
- TRIEMSTRA, J. et al. A Review of Fanconi Anemia for the Practicing Pediatrician. **Pediatric annals**, v. 44, n. 10, p. 444–52, 2015.
- VAN DER LELIJ, P. et al. Diagnostic overlap between fanconi anemia and the cohesinopathies: Roberts syndrome and Warsaw breakage syndrome. **Anemia**, v. 2010, 2010.
- VAZ, F. et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. **Nature genetics**, v. 42, n. 5, p. 406–409, 2010.
- YUSUF, I.; FRUMAN, D. A. Regulation of quiescence in lymphocytes. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 7, p. 380–386, 2003.
- .

## **APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: MENORES DE 18 ANOS**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MENORES DE 18 ANOS**

Convido o(a) seu/sua filho(a) (ou menor de idade) que está sob sua responsabilidade para participar, como voluntário(a), da pesquisa **USO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES PARA INOVAÇÃO METODOLÓGICA DO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA DE FANCONI**, que está sob a responsabilidade do pesquisador ADEMIR DE JESUS AMARAL, CPF 274 237 274-15, residente: Rua Dom José Lopes 487, Apto 1001, Boa Viagem – Recife – PE, CEP 51021-370, Telefone: (81) 21267985, e-mail: [amaral@ufpe.br](mailto:amaral@ufpe.br). Também participa desta pesquisa a pesquisadora: Terezinha de Jesus Marques Salles, telefones para contato: 81-21011536 - Ramal 113, e-mail: [tjmsalles@uol.com.br](mailto:tjmsalles@uol.com.br). Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

**Em caso de recusa o(a) seu/sua filho(a) não será penalizado(a) de forma alguma.**

#### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

- O estudo será feito com o mesmo material (sangue periférico) obtido para o diagnóstico de rotina do paciente. Este procedimento não comprometerá seu diagnóstico nem seu tratamento, o objetivo deste estudo é estabelecer método inovador para diagnóstico laboratorial da Anemia de Fanconi (AF) por meio da análise de bioindicadores citogenéticos e moleculares.
- Este estudo não acarreta nenhum risco adicional para o paciente, pois a amostra utilizada é parte do material que será coletado para exames de rotina, desta forma, a obtenção da amostra é realizada independentemente da realização desta pesquisa.
- O benefício principal da participação de seu/sua filho(a) neste estudo é contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia que possibilite a avaliação rápida e com baixo custo de possíveis alterações cromossômicas associadas à Anemia de Fanconi, podendo também ser usado como teste complementar aos demais exames indicados para o paciente.
- Amostras de sangue periférico serão coletadas em tubos contendo heparina sódica, utilizando sistema a vácuo e obedecendo aos princípios de biossegurança e, conseqüentemente, boas práticas de laboratório.
- Além da equipe de saúde que cuidará de seu/sua filho(a), seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética e a equipe de pesquisadores envolvidos. Sua identidade **NÃO SERÁ REVELADA** ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação. Todas as informações desse estudo serão confidenciais e o(a) seu/sua filho(a) não será identificado em nenhuma publicação.
- A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhuma forma de pagamento, caso dê sua autorização. O(a) seu/sua filho(a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize sua participação. Todos os cuidados assim como os tratamentos ministrados serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no estudo.

**PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA, NÃO HAVERÁ CUSTOS PARA O PACIENTE**

É importante que o Sr.(a) saiba que a participação neste estudo é completamente voluntária e que pode interromper a participação de seu/sua filho(a) a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais ele(a) tem direito. Em caso de decidir interromper a participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com os responsáveis pelo estudo: Prof. Ademir de Jesus Amaral (81 - 21267985) do Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada - LAMBDA. Se o Sr.(a) tiver perguntas com relação aos seus direitos ou de seu/sua filho(a) como participante desta pesquisa, poderá solicitar esclarecimentos em qualquer momento que achar necessário.

O material coletado será processado e armazenado no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada – LAMBDA, durante um período de 5 anos sob responsabilidade do Prof. Ademir de Jesus Amaral coordenador do Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia – GERAR.

**Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – email: [cepccs@ufpe.br](mailto:cepccs@ufpe.br)).**

---

Prof. Ademir de Jesus Amaral

## CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_,  
 RG/\_\_\_\_\_ CPF/\_\_\_\_\_, abaixo assinado, responsável pelo  
 (a) menor \_\_\_\_\_ autorizo a sua  
 participação no estudo **USO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES PARA INOVAÇÃO  
 METODOLÓGICA DO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA DE FANCONI**, como voluntário (a). Fui  
 devidamente informado (a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos  
 nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me  
 garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer  
 penalidade ou interrupção do acompanhamento/ assistência/tratamento de meu/minha filho(a).

Local e data: Recife, \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do Paciente: \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do(a) Menor: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em  
 participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

## **APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: MAIORES DE 18 ANOS**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MAIORES DE 18 ANOS**

Convido o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa **USO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES PARA INOVAÇÃO METODOLÓGICA DO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA DE FANCONI**, que está sob a responsabilidade do pesquisador ADEMIR DE JESUS AMARAL, CPF 274 237 274-15, residente: Rua Dom José Lopes 487, Apto 1001, Boa Viagem – Recife – PE, CEP 51021-370, Telefone: (81) 21267985, e-mail: [amaral@ufpe.br](mailto:amaral@ufpe.br). Também participa desta pesquisa a pesquisadora: Terezinha de Jesus Marques Salles, telefones para contato: 81-21011536 - Ramal 113, e-mail: [tjmsalles@uol.com.br](mailto:tjmsalles@uol.com.br). Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

**Em caso de recusa o(a) Sr.(a) não será penalizado(a) de forma alguma.**

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

- O estudo será feito com o mesmo material (sangue periférico) obtido para o diagnóstico de rotina do paciente. Este procedimento não comprometerá seu diagnóstico nem seu tratamento, o objetivo deste estudo é estabelecer método inovador para diagnóstico laboratorial da Anemia de Fanconi (AF) por meio da análise de bioindicadores citogenéticos e moleculares.
- Este estudo não acarreta nenhum risco adicional para o paciente, pois a amostra utilizada é parte do material que será coletado para exames de rotina, desta forma, a obtenção da amostra é realizada independentemente da realização desta pesquisa.
- O benefício principal da participação de seu/sua filho(a) neste estudo é contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia que possibilite a avaliação rápida e com baixo custo de possíveis alterações cromossômicas associadas à Anemia de Fanconi, podendo também ser usado como teste complementar aos demais exames indicados para o paciente.
- Amostras de sangue periférico serão coletadas em tubos contendo heparina sódica, utilizando sistema a vácuo e obedecendo aos princípios de biossegurança e, conseqüentemente, boas práticas de laboratório.
- Além da equipe de saúde que cuidará de seu/sua filho(a), seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética e a equipe de pesquisadores envolvidos. Sua identidade **NÃO SERÁ REVELADA** ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação. Todas as informações desse estudo serão confidenciais e o(a) seu/sua filho(a) não será identificado em nenhuma publicação.
- A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhuma forma de pagamento, caso dê sua autorização. O(a) seu/sua filho(a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize sua participação. Todos os cuidados assim como os tratamentos ministrados serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no estudo.

**PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA, NÃO HAVERÁ CUSTOS PARA O PACIENTE**

É importante que o(a) Sr.(a) saiba que a participação neste estudo é completamente voluntária e que pode recusar-se a participar ou interromper participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais o(a) Sr.(a) tem direito. Em caso de decidir interromper a participação neste estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com os responsáveis pelo estudo: Prof. Ademir de Jesus Amaral (81 - 21267985) do Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada - LAMBDA. Se o(a) Sr.(a) tiver perguntas com relação aos seus direitos como participante desta pesquisa, poderá solicitar esclarecimentos em qualquer momento que achar necessário.

O material coletado será processado e armazenado no Laboratório de Modelagem e BioDosimetria Aplicada – LAMBDA, durante um período de 5 anos sob responsabilidade do Prof. Ademir de Jesus Amaral coordenador do Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia – GERAR.

**Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – email: [cepccs@ufpe.br](mailto:cepccs@ufpe.br)).**

---

Prof. Ademir de Jesus Amaral

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu, \_\_\_\_\_  
 \_\_, RG/\_\_\_\_\_ CPF/\_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **USO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES PARA INOVAÇÃO METODOLÓGICA DO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA DE FANCONI**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data: Recife, \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do Paciente: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:





( )SIM:

Qual?\_\_\_\_\_ Quando?\_\_\_\_\_ Parte do corpo:\_\_\_\_\_

- Preciou realizar exame com Tomografia computadorizada?

( )NÃO

( )SIM:

Qual?\_\_\_\_\_ Quando?\_\_\_\_\_ Parte do corpo:\_\_\_\_\_

- Preciou realizar Transfusão sanguínea?

( )NÃO

( )SIM: Quando?\_\_\_\_\_