

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

MARIA LUIZA ROCHA DA ROSA BORGES

**ANEMIA DE FANCONI EM PERNAMBUCO:
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA**

RECIFE

2022

MARIA LUIZA ROCHA DA ROSA BORGES

**ANEMIA DE FANCONI EM PERNAMBUCO:
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de
Doutora em Genética.

Orientador: Profa Dra Neide Santos

Coorientador: Dra Terezinha de Jesus Marques Salles

RECIFE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Rosa Borges, Maria Luiza da
Anemia de Fanconi em Pernambuco: caracterização clínica e genética / Maria Luiza da Rosa Borges – 2022.

110 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Coorientadora: Terezinha de Jesus Marques Salles

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2022.
Inclui referências e anexos.

1. Anemia 2. Mitomicina C 3. Citogenética I. Santos, Neide (orient.)
II. Salles, Terezinha de Jesus Marques (coorient.) III. Título

616.152

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -022

MARIA LUIZA ROCHA DA ROSA BORGES

ANEMIA DE FANCONI EM PERNAMBUCO: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E
GENÉTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Genética. Area de concentração: Genética.

.

Aprovado em: 13/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Neide Santos (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr Roberto Rodrigues Capela de Matos

Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Dra. Teresa de Souza Fernandes Seixas

Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Dra Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Antes de agradecer gostaria de dedicar este trabalho a minha avó, Geninha da Rosa Borges, que deixou o plano físico durante esse processo, mas sempre foi uma grande apoiadora da minha vida acadêmica. Assim como gostaria de dedicar as minhas filhas caninas, Annie, Ellie e Dora, que também não estão mais entre nós, mas sem elas eu com certeza não teria conseguido passar pela pandemia e seguir meu sonho.

Agradeço a Profa Neide por ter aceitado o desafio de me orientar e por ter feito esse papel maravilhosamente bem. Mostrando que orientador pode se tornarnão só um exemplo, mas também uma amiga.

Agradeço demais a Dra Terezinha que sempre foi uma mãe científica para mim, está comigo desde a iniciação científica, sempre acreditou e confiou em mim. Espero agora poder contribuir profissionalmente com ela, além de levar a diante seus aprendizados.

Agradeço a toda equipe do laboratório de citogenética do HUOC pelo apoioconcedido durante esses quatro anos.

ESPECIAIS

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por me ensinarem a amar os estudos e por me proporcionarem, com muita luta e esforço, todo o alicerce para que a conquista deste sonho fosse possível;

A toda minha família pelo apoio de sempre;

À João Lucas que além de amigo se tornou colega de trabalho, me ajudou ativamente no desenvolvimento da pesquisa, além de todo apoio emocional duranteesses 4 anos;

A minha esposa, Alessandra Lemos, que sempre me ajudou nas traduções, apoiou e incentivou a sempre prosseguir e amadurecer tanto quanto pessoa, comoprofissional.

RESUMO

Anemia de Fanconi (AF) é uma doença rara, autossômica recessiva caracterizada por fragilidade cromossômica decorrente do defeito no sistema de reparo do DNA. A clínica da doença é heterogênea variando de pacientes assintomáticos até fenótipos mais graves que envolvem alterações na pele, baixa estatura, alterações esqueléticas e falência medular. O diagnóstico é realizado a partir do teste de fragilidade cromossômica usando agentes alquilantes como mitomicina C (MMC) e/ou diepoxibutano (DEB) ou, ainda pela identificação de mutações nos genes *FANCS*. No Brasil não existem dados epidemiológicos a respeito da doença e poucos centros realizam o teste diagnóstico de fragilidade cromossômica, que até o momento era ausente nos centros da região Nordeste. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi diagnosticar através da MMC e traçar o perfil clínico e genético dos genes *FANCS* dos pacientes pediátricos com AF do estado de Pernambuco. No período de 2018 a março de 2022, foram estudados 16 de 100 pacientes suspeitos para AF. Dentre os pacientes AF foi observado uma pequena prevalência no sexo feminino (55%), e as principais alterações clínicas foram manchas café com leite (60%) e anormalidades esqueléticas (53%). A análise de citogenética da medula óssea realizada em oito pacientes AF, mostrou em caso a trissomia clonal do cromossomo 21. O estudo molecular realizado em 6 pacientes mostrou o acometimento do gene *FANCA* em 66,6% apresentando as seguintes mutações: c.2535_2526delCT, c.4011-2A>C, c.1475A>G e c.3788_3790delTCT. O outro gene acometido foi o *FANCG* (33%) apresentando as mutações: c.1077-2A>G e c.908T>C. A partir dos dados obtidos, foi possível traçar um perfil clínico, citogenético e molecular preliminar dos pacientes do estado de Pernambuco, favorecendo com os dados epidemiológicos para a região Nordeste. A anemia de Fanconi é uma doença subdiagnosticada no Brasil e a implantação do teste diagnóstico em PE proporcionou um diagnóstico precoce, e consequentemente um melhor acompanhamento aos pacientes, garantindo um melhor tratamento e qualidade de vida.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi; Mitomicina C; Citogenética.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare autosomal recessive disease characterized by chromosomal fragility resulting from a defect in the DNA repair system. The clinical profile of the disease is heterogeneous, ranging from asymptomatic patients to more severe phenotypes involving skin alteration, short stature, skeletal abnormalities and bone marrow failure. The diagnosis is made with the chromosomal fragility test using alkylating agents such as mitomycin C (MMC) and/or diepoxybutane (DEB), or even by the identification of mutations in the FANCS genes. In Brazil, there are no epidemiological data on the disease and few centers perform the diagnostic test for chromosomal fragility, which was absent in centers in the Northeast region. Thus, the objective of this work was to diagnose by MMC and to trace the clinical and genetic profile of the FANCS genes of pediatric patients with FA in the state of Pernambuco. From 2018 to March 2022, 16 out of 100 patients suspected of FA were studied. Among FA patients, a small prevalence was observed in females (55%), and the main clinical features were café au lait spots (60%) and skeletal abnormalities (53%). The bone marrow cytogenetic analysis performed in eight FA patients showed clonal trisomy of chromosome 21. Molecular study in 6 patients showed the involvement of the FANCA gene in 66.6% with the following mutations: c.2535_2526delCT, c.4011-2A>C, c.1475A>G and c.3788_3790delTCT. Other gene affected was FANCG (33%) with mutations: c.1077-2A>G and c.908T>C. With data obtained, it was possible to draw a preliminary clinical, cytogenetic and molecular profile of patients in the state of Pernambuco, improving the epidemiological data for the Northeast region. Fanconi anemia is an underdiagnosed disease in Brazil and the implementation of the MMC test in PE provided an early diagnosis, and consequently a better follow-up to patients, ensuring better treatment and quality of life.

Keywords: Fanconi anemia; Mitomycin C; cytogenetics.

LISTA DE FIGURAS

TESE

Figura 1- Principais achados clínicos na Anemia de Fanconi.....	18
Figura 2- Mecanismo de ação NKG2D-L/NKG2D/CD8+ em resposta ao estresse oxidativo causado pelo dano de DNA.....	22
Figura 3- Vias de reparo das ICL's através da via das proteínas FANC's.....	25
Figura 4- Tipos de mutações.	30
Figura 5- Esquema exemplificando mutação em intron.....	31
Figura 6- Metáfases apresentando fragilidade cromossômica.....	33
Figura 7- Alterações cromossômicas frequentes em AF	36
Figura 8- Fluxo de diagnóstico para AF.....	37
Figura 9- Variantes cromossômicas observadas em pacientes AF+.....	38

ARTIGO 1- HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN A PATIENT WITH FANCONI ANEMIA AND VACTERL ASSOCIATION

Figure 1- A) MMC test showing chromosomal variants (radial figures and chromosome breakage being pointed out) B) Bone marrow karyotype without abnormalities (46, XY) C) Clinical features of the patient: Macrocephaly and absence of Fanconi's face. D) X-ray of the right hand showing thumb hypoplasia. E) X-ray showing hemivertebra (D12).	56
--	----

ARTIGO 2- CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF MITOMYCIN C CYTOGENETIC TEST IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL

Figure 1- Presentation of the clinical symptoms of FA. a) Hyperpigmentation on the face; b) Hypoplasia of the thumb; c) skeletal malformation in the feet.	74
Figure 2- Cytogenetic data of patient FA11. a) Karyotype showing 47,XY,+21 b) FISH showing +21.	75

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1- Grau de comprometimento medular em pacientes AF.....	20
Tabela 2- Genes diretamente relacionados na etiopatogenia da AF.....	24
Tabela 3- Composição do painel de triagem para AF da população brasileira.	39

ARTIGO 1-HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN A PATIENT WITH FANCONI ANEMIA AND VACTERL ASSOCIATION

Table 1- Result of chromosomal fragility test by MMC.....	57
Table 2- Clinical manifestations described in concomitant FA and VACTERL.	58

ARTIGO 2- CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF MITOMYCIN C CYTOGENETIC TEST IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL

Table 1- Standard values of the MMC test.....	76
Table 2- Results of the fragility test by MMC.....	76
Table 3- Clinical and demographic data of patients with FA	77

ARTIGO 3- FANCONI ANEMIA PATIENTS FROM PERNAMBUCO, BRAZIL: A NEW FOUNDER PATHOGENIC VARIANT IN *FANCA*

Table 1- Mutations found in patients with Fanconi anemia.....	88
Table 2- Identification of the variants found	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
AF	Anemia de Fanconi
ATP	Adenosina trifosfato
BRCA1	Breast Cancer Suscetibility Gene 1
CCHMC	Cincinnati children's hospital medical center
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CFS	Sitíos Fragéis Comuns
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
DEB	Diepoxibutano
DEL	Deleção
DER	Derivativo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAJC21	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C21
DUP	Duplicação
EFL1	Elongation Factor Like GTPase 1
FAAP	Fanconi anemia associated protein
FACCC	Fanconi Anemia comprehensive care center
FANCA	Grupo de complementação A
FANCB	Grupo de complementação B
FANCC	Grupo de complementação C
FANCD1	Grupo de complementação D1
FANCD2	Grupo de complementação D2
FANCE	Grupo de complementação E
FANCF	Grupo de complementação F
FANCG	Grupo de complementação G
FANCH	Grupo de complementação H
FANCI	Grupo de complementação I
FANCJ	Grupo de complementação J
FANCL	Grupo de complementação L
FANCM	Grupo de complementação M
FANCN	Grupo de complementação N
FANCO	Grupo de complementação O
FANCP	Grupo de complementação P

FANCO	Grupo de complementação R
FANCR	
FANCS	Grupo de complementação S
FANCT	Grupo de complementação T
GM-CSF	O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN- γ	Interferon Gama
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ICLS	Crosslink entre fitas de DNA
IL	Interleucina
INV	Inversão
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia mieloide Aguda
Mar	Marcador
MLPA	Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação
MMC	Mitomomicina C
MO	Medula óssea
MRE11	Meiotic recombination 11
NBS1	Nibrina
NER	Reparo por excisão de nucleotídeo
NK	Natural Killer
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RBM8A	RNA Binding Motif 8 ^a
RI	Radiação Ionizante
RPS19	Proteína ribossomal S19
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SD	Síndrome de Down
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SRP54	Signal Recognition Particle 54
SUS	Sistema Único de Saúde
TAR	Trombocitopenia e agenesia de rádio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VACTERL	Anormalidade vertebral, anal, cardíaca, traqueal, esofágica, renal e dos membros
WGS	Sequenciamento completo do genoma
WES	Sequenciamento completo do exoma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2Objetivos Específicos.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 HISTÓRICO DA ANEMIA DE FANCONI.....	16
2.2 CLÍNICA E EPIDEMIOLOGIA	17
2.3 MANIFESTAÇÕES HEMATOLOGICAS.....	19
2.4 IMUNOLOGIA.....	20
2.5 ETIOPATOGENIA	23
2.5.1 Perfil Mutacional da Anemia de Fanconi.....	29
2.6 ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NA AF.....	32
2.6.1 Fragilidade cromossômica.....	32
2.6.2 Alterações citogenéticas na MO.....	34
2.7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	37
2.7.1 Teste citogenético de fragilidade cromossômica.....	37
2.7.2 Teste de biologia molecular.....	39
2.7.3 Detecção da monoubiquitização.....	40
2.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	41
2.9 TRATAMENTO DE AF.....	43
3 ARTIGOS	
3.1 ARTIGO 1- HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN A PATIENT WITH FANCONI ANEMIA AND VACTERL ASSOCIATION.....	46
3.2 ARTIGO 2- CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF MITOMYCIN C CYTOGENETIC TEST IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL.....	59

3.3 ARTIGO 3: FANCONI ANEMIA PATIENTS FROM PERNAMBUCO, BRAZIL: A NEW FOUNDER PATHOGENIC VARIANT IN FANCA.....	78
4 DISCUSSÃO GERAL.....	90
5 CONCLUSÕES.....	93
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
· Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisaenvolvendo Seres Humanos	105
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE).....	106
ANEXO C - Carta de aceite revista ABCS HEALTH SCIENCES.....	119
ANEXO D - Carta de aceite da revista HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY	110

1 INTRODUÇÃO

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença hereditária, rara, com padrão autossômico recessivo, caracterizada por defeito no sistema de reparo no DNA. As principais apresentações clínicas consistem em presença de manchas café com leite na pele, alterações esqueléticas (em especial hipoplasia do polegar), face triangular e alterações hematológicas decorrentes da falência medular. Muitas vezes o diagnóstico é difícil de ser realizado, pois os achados clínicos se confundem com outras doenças genéticas e hematológicas, havendo necessidade de testes específicos. O diagnóstico da AF requer avaliação clínica e laboratorial, teste de fragilidade cromossômica, e estudos moleculares dos genes envolvidos no desenvolvimento na doença. Para confirmação do diagnóstico é necessário pelo menos dois desses métodos.

No Brasil, os estudos sobre a doença são escassos e apenas três centros localizados nas regiões sudeste e sul realizam o teste de fragilidade cromossômica para o diagnóstico da AF. Na região nordeste, até o momento não existia centro que realizasse o teste de fragilidade cromossômica, apesar de haver quatro centros de referência hematológica em Pernambuco que recebem pacientes com suspeitas de AF, que muitas vezes não eram confirmadas por falta do teste diagnóstico específico para doença. A limitação na realização dos testes citogenéticos e de biologia molecular para AF pelo SUS (Sistema Único de Saúde), torna a doença cada vez mais subdiagnosticada e pouco conhecida.

Assim, foi imprescindível a realização desse estudo pois estabeleceu o perfil de apresentação da doença no estado, após a implementação do teste de fragilidade cromossômica pela MMC pelo sistema único de saúde (SUS), além de possibilitar realização dos testes moleculares para buscar variantes genéticas características da região. Desse modo, este é um estudo pioneiro que vai contribuir para um diagnóstico precoce e oferecer um maior suporte para esses pacientes e melhor direcionamento e acompanhamento terapêutico, proporcionando uma maior e melhor qualidade de vida.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Descrever os aspectos clínicos e genéticos dos pacientes pediátricos portadores de AF do estado de Pernambuco.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Descrever as características clínicas e laboratoriais dos pacientes;
2. Realizar o teste de fragilidade cromossômica com mitomicina C no sangue periférico dos pacientes suspeitos de AF
3. Definir o perfil citogenético na medula óssea ao diagnóstico dos pacientes com AF pediátricos;
4. Pesquisar a presença de variantes regionais nos genes *FANC-A*, *FANC-C* e

FANC-G nos portadores de AF.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2 Histórico da Anemia de Fanconi

Em 1927, Guido Fanconi, pediatra suíço, descreveu um caso familiar de anemiagrave com macrocitose e pancitopenia envolvendo três irmãos, cujas apresentações clínicas eram microcefalia e hiperpigmentação da pele, os quais vieram a óbito entre os 5 e 7 anos de idade. Em 1931, Naegeli associou a anemia aplásica familiar com malformação congênita ao termo AF. Quarenta anos após a primeira descrição da AF, Fanconi publicou as características clínicas associadas à doença (FANCONI, 1967; AUERBACH *et al.*, 1989).

Garrida e Crosby (1959) levantaram a possibilidade das leucemias agudas serem um dos principais agravantes da AF, com a confirmação de uma maior predisposição desses pacientes a neoplasias descrita por Levy *et al.* (1974). A presença de quebras cromossômicas espontâneas foi descrita por Shroeder (1964), que 12 anos depois estabeleceu o padrão de herança autossômico recessivo da doença. Em 1982, a partir de estudos de células somáticas híbridas foi descrita uma heterogeneidade genética dos pacientes com, pelo menos, dois grupos de complementação (ZAKRZEWSKI; SPERLING, 1982).

O teste citogenético de fragilidade cromossômica para diagnóstico da AF foi desenvolvido por Auerbach *et al.* (1981), que utilizou a droga diepoxibutano (DEB), sendo ainda hoje considerado o padrão ouro. Mas Oostra *et al.* (2012) desenvolveram um protocolo similar utilizando mitomicina C (MMC) e possibilitou a detecção dos pacientes mosaicos. A análise cromossômica na medula óssea possibilitou avaliar a evolução cariótica nos pacientes com AF, sendo as primeiras alterações descritas as dos cromossomos 1 e 7 por Huret *et al.* (1988).

Os estudos moleculares permitiram a caracterização dos genes envolvidos na patogênese da doença e atualmente já foram descritos pelo menos 22 genes associados a doença, permitindo assim maiores esclarecimentos sobre o sistema de reparo do DNA para *cross-links* entre

fitas de DNA (ICLs) (SHARID et al., 2022).

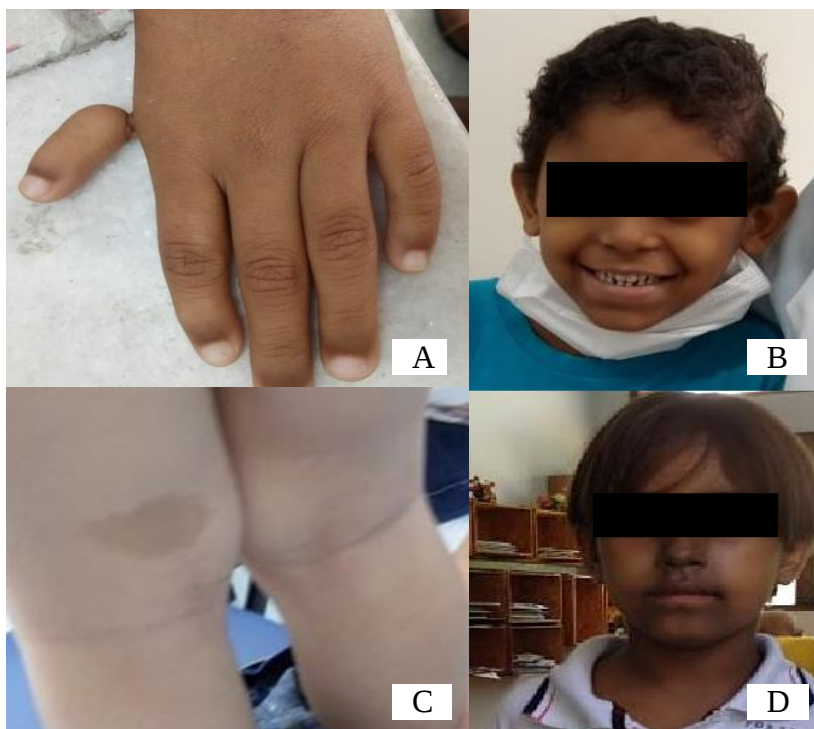
2.3 Clínica e epidemiologia

A AF é caracterizada por uma tríade composta por defeitos congênitos, falência medular progressiva e predisposição neoplásica. É uma doença de herança autossômica recessiva na grande maioria dos casos, com exceção do subtipo B que apresenta herança dominante ligada ao X (SANTOS, 2017).

O quadro clínico clássico de AF inclui pancitopenia, alterações da pigmentação cutânea (manchas café au lait), malformações esqueléticas, baixa estatura (TERESA et al., 2016) (Figura 1). Todavia, estudos realizados em pacientes com AF apontaram a presença de outros sintomas menos recorrentes como apresentações clínicas da doença: agenesia renal, microcefalia, alterações endócrinas, osteoporose, perda de audição e má formação da orelha. A AF é considerada a principal síndrome hereditária de falência medular associada à perda de audição (PINTO et al., 2016). Apesar dos achados clínicos característicos da doença, cerca de 30% dos pacientes não apresentam nenhuma característica fenotípica, sendo diagnosticado apenas após a detecção de irmãos com características clínicas (GIRI et al., 2007; ELDER et al., 2008).

Um estudo realizado na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR, de 2006 a 2015, revelou que 70 – 80 % dos pacientes portadores de AF no Brasil apresentam pelo menos uma alteração endócrina. A baixa estatura é alteração mais comum e está relacionada a insuficiência do hormônio de crescimento decorrente do hipogonadismo, mas também se destacam dislipidemias e hipovitaminose D. O fenótipo endócrino da doença ainda pode incluir intolerância à glicose, resistência à insulina e hipertireoidismo (ALVES, 2016; ROSE et al., 2012).

Figura 1. Principais achados clínicos na Anemia de Fanconi. A) Displasia de polegar. B) Implantação baixa das orelhas e orelhas em abano. C) mancha-café-com-leite. D) Hiperpigmentação de pele. Fonte: O autor.



Fonte: O autor (2022)

A anemia de Fanconi tem incidência de aproximadamente 1/200.000 – 400.000, com uma maior incidência em grupos populacionais, como os judeus asquenazes (1:30.000) e os Africânderes (1:22.000). A frequência estimada de portadores é de 1/300 em europeus e americanos, mesmo a doença sendo rara (CASTELLA *et al.*, 2011).

No Brasil poucos dados epidemiológicos que mostram a incidência da doença são encontrados, apenas um estudo realizado por Pilonetto *et al.* (2017), com 255 pacientes oriundos de todas as regiões do Brasil, mostrou que 66 (25,88%) dos casos eram originados da região nordeste. A prevalência da doença entre os sexos é contraditória, não existindo um consenso (NOWZARI *et al.*, 2001; KUTLER *et al.*, 2003). A expectativa de vida tem melhorado com um diagnóstico precoce e tratamentos multidisciplinares, incluindo o transplante de medula óssea. Atualmente a expectativa de vida de um paciente com AF é de 33 anos (MAMRAK *et al.*, 2017).

2.4 Manifestações hematológicas

Pacientes com AF geralmente desenvolvem algum grau de falência medular, resultando na deficiência de células hematológicas ou na produção de células anormais. As disfunções medulares em AF variam de discreta e assintomática citopenia à severa anemia aplástica. Os pacientes com AF apresentam um risco aumentado (500x) de evolução para síndrome mielodisplásica (SMD) e/ ou leucemia mieloide aguda (LMA). Todavia, a ausência de falha medular não exclui o diagnóstico da doença (ALTER *et al.*, 2000).

Em geral, o primeiro achado hematológico é a macrocitose, seguida de trombocitopenia e anemia (KUTLER *et al.*, 2003). Além disso, pacientes AF apresentam maior predisposição ao desenvolvimento de tumores sólidos de cabeça e pescoço, na idade adulta, sendo o genótipo FANCD1 o mais suscetível com uma probabilidade acumulativa de 97% aos 14 anos (MYERS *et al.*, 2017). Em relação ao período de surgimento dos primeiros sintomas hematológicos não há um consenso, há autores que defendem o surgimento destes na primeira década de vida e outros que indicam o seu surgimento em qualquer momento, desde o nascimento até a fase adulta (ALTER, 1992; AUERBACH, 1994; KUTLER *et al.*, 2003).

O processo que torna a medula óssea (MO) progressivamente hipoplásica foi caracterizado em três graus de comprometimento (Tabela 1) (BUTTURINI *et al.*, 1994; GUARDIOLA *et al.*, 2000). Com a instabilidade cromossômica sendo responsável por ocasionar a falência progressiva da MO, além de tornar os pacientes predispostos a neoplasias, especialmente leucemias e síndrome mielodisplásica (HURET, 2002).

Tabela 1. Grau de comprometimento medular em pacientes AF.

Graus de Comprometimento	Característica	Critérios
Grau I	Sem falha medular	Plaquetas acima de 100.000/ μ L, neutrófilos acima de 1000/ μ L; hemoglobina acima de 10 g/dL
Grau II	Falha medular inicial	Pelo menos um dos critérios: plaquetas entre 100.000/ μ L e 20.000/ μ L; neutrófilos entre 1.000/ μ L e 500/ μ L; hemoglobina menor que 10g/dl; sem necessidade de transfusões ou até 20 transfusões
Grau III	Falha medular avançada	Pelo menos um dos critérios: plaquetas abaixo de 20.000/ μ L; neutrófilos abaixo de 500/ μ L ou necessidade de mais de 20 transfusões de hemácias e/ou plaquetas

Fonte: Adaptado de GUARDIOLA *et al.* (2010)

2.5 Imunologia

A deficiência imune é bastante frequente em pacientes portadores de AF. Um estudo de coorte realizado com pacientes do *Fanconi Anemia Comprehensive Care Center* (FACCC) no *Cincinnati Children's Hospital*

Medical Center (CCHMC) mostrou uma diminuição do número e função de células B e natural killer (NK). O estudo observou também mudanças quantitativas em células T CD4⁺, além de anormalidades funcionais de células T, demonstrada por resposta antigênica e função CTL reduzidas (MYERS *et al.*, 2017).

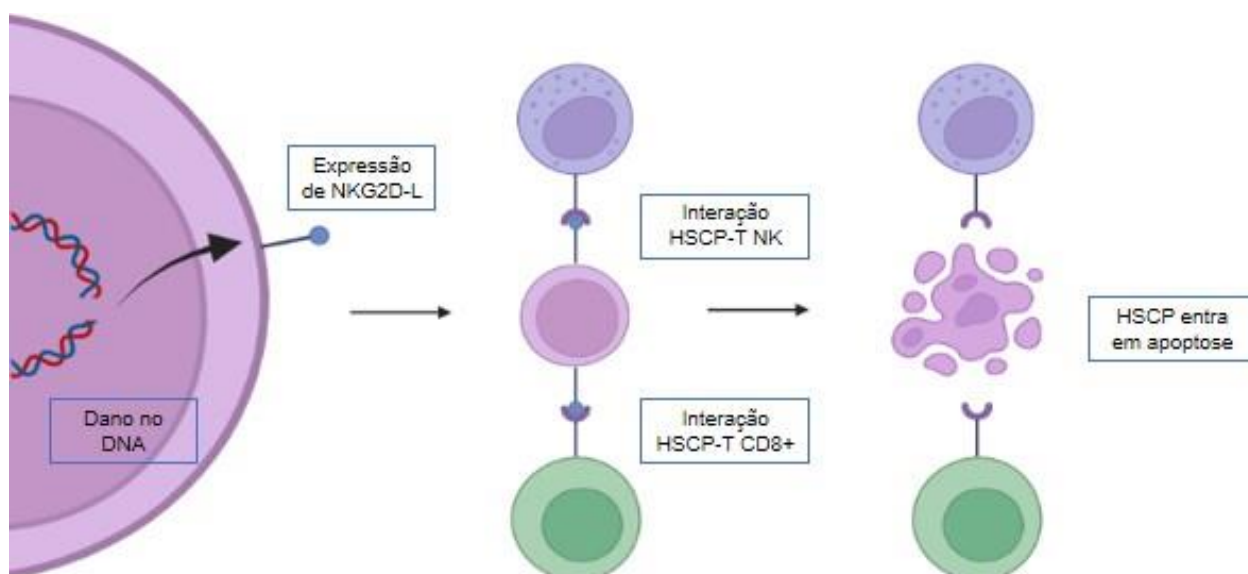
A resposta imune, dependente de p53, é uma das principais vias de resposta ao estresse e ao dano no DNA e está relacionada com envelhecimento hematopoiético e manutenção das células tronco hematopoiética e células progenitoras (HSPC), portanto o desequilíbrio neste mecanismo pode levar a instabilidade genômica, falência progressiva da medula óssea e neoplasias hematológicas (BLANPAIN *et al.*, 2011). Ceccaldi *et al.* (2012) analisaram os níveis de p53/p21 em pacientes AF e relataram que diminuição nos níveis de expressão da p53 permite a replicação das células com instabilidade genômica, sugerindo que defeito no mecanismo de ativação da p53, decorrente de danos celulares, não reparados, pode ser uma via de sinalização comum para as doenças de falência medular.

Casado *et al.* (2022) testaram a hipótese de que células tronco hematopoiéticas e células progenitoras expressam moléculas de estresse oxidativo associando ao dano no DNA, um exemplo desta molécula é o ligante D2 das células natural killer (NKG2D-L) que quando integrado ao seu receptor (NKG2D) ativa células T NK e CD8⁺ citotóxicas. E confirmou que o aumento de células HSCP expressando o NKG2D-L é inversamente proporcional ao número de CD34⁺ na MO. Mostrando que o aumento de células NKGD2⁺ pode causar depleção progressiva das células HSPC de pacientes AF (Figura 2). Sendo assim, as células NK podem ser uma causa a jusante da falência medular observada em AF (DULMOVIST; OLSO, 2022).

Outras alterações imunológicas encontradas nesses pacientes são os elevados níveis de citocinas pró inflamatórias. Dufour *et al.* (2003) relataram *in vitro* o aumento de níveis de TNF- α , IFN- γ em células AF, além de observar que outros moduladores negativos da hematopoiese como MIP-1 e ligante não sofrem alteração dos seus níveis. Em contraponto, baixa produção de interleucinas (IL), incluindo IL1, IL2 e IL6, assim como GM-CSF

também foram observadas em AF (MYERS *et al.*, 2017).

Figura 2. Mecanismo de ação NKG2D-L/NKG2D/CD8+ em resposta ao estresse oxidativo causado pelo dano de DNA.



Fonte: O autor (2022)

Experimentos realizados com camundongos com anemia de Fanconi do subtipo FANCC mostraram além da resposta inflamatória anormal, uma diminuição na produção de monócitos/macrófagos. Também foi possível observar uma redução na mobilidade, adesão aos tecidos e função fagocítica dessas células, as quais os autores atribuíram à desestruturação de seu citoesqueleto (LIU *et al.*, 2012).

Com os avanços do tratamento e melhoria dos achados hematológicos, as infecções surgem como principal complicação clínica, decorrente da imunodeficiência ocasionada pela doença. Sendo as infecções bacterianas e fúngicas as principais causas de morte, principalmente quando essas infecções são decorrentes de neutropênias, pois geralmente, são pouco toleradas e de difícil tratamento (ZEN *et al.*, 2011).

2.6 Etiopatogenia

A etiopatogenia da AF é baseada na formação de *cross-link* entre fitas de DNA (ICLs) que pode ter causas exógenas, pela ação de drogas clastogênicas e a radiação ionizante, ou causa endógenas, pela presença de estresse oxidativo e formação de aldeídos, provenientes de alimentos ou do metabolismo celular (JOENJE *et al.*, 1981; LANGEVIN *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2019). As ICLs levam a pontos de bloqueio da transcrição e da replicação, causando deleções e quebras, que consequentemente podem ocasionar uma diminuição no número de células, por apoptose, daquelas que não conseguiram efetuar o reparo corretamente, ou mesmo causarem neoplasias (DEANS; WEST, 2011).

O processo de reparo das ICLs é complexo, sendo realizado durante as fases S e G2 do ciclo celular, e inclui a ação cooperativa das vias de reparo do DNA: das proteínas AF, do reparo por excisão, recombinação homologa e síntese translesão (NIEDZWIEDZ *et al.*, 2004; HIRANO *et al.*, 2005). Sendo assim, cerca de 62 genes atuam no reparo das ICLs e de forma direta ou indireta, mutações nesses genes podem estar relacionados com a falha de reparo no DNA. Existem 22 genes diretamente relacionados com a anemia de Fanconi, sendo denominados *FANCs* (Tabela 2) (Moreno *et al.*, 2021).

O produto desses genes são proteínas que atuam diretamente no mecanismo de reparo do DNA, desde a fase de reconhecimento da lesão, até o processo de reparo final. Algumas destas proteínas também atuam como sinalizadores de resposta imune (LIU *et al.*, 2020). A tabela 2 apresenta os 22 genes envolvidos diretamente na etiologia da AF e sua localização cromossômica.

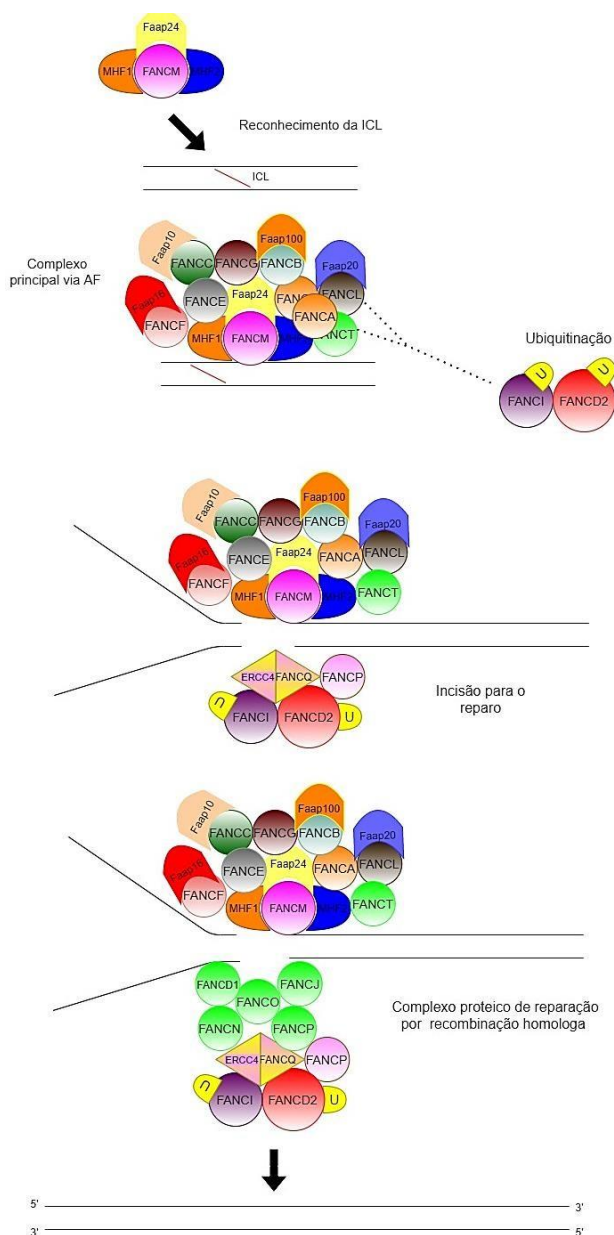
Tabela 2. Genes envolvidos diretamente na etiopatologia de AF

Abreviatura	Localização cromossômica
<i>FANCA</i>	16q24.3
<i>FANCB</i>	Xp22.31
<i>FANCC</i>	9q22.3
<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12.13
<i>FANCD2</i>	3p25.3
<i>FANCE</i>	6p21.22
<i>FANCF</i>	11p15
<i>FANCG</i>	9p13
<i>FANCI</i>	15q26.1
<i>FANCJ/BRIP1</i>	17q23.2
<i>FANCL</i>	2p16.1
<i>FANCM</i>	14q21.3
<i>FANCN/PALB2</i>	16p12
<i>FANCO/RAD51C</i>	17q23
<i>FANCP/SLX4</i>	16p13.3
<i>FANCQ/ERCC4</i>	16p13.12
<i>FANCR/RAD51</i>	15q15.1
<i>FANCS/BRCA1</i>	17q21.31
<i>FANCT/UBE2T</i>	1q32.1
<i>FANCU/XRCC2</i>	7q36.1
<i>FANCV/REV7</i>	1p36.22
<i>FANCW/RFWD3</i>	16q23.1

Fonte: adaptado de Santos (2017).

O processo de reparo inicia com o reconhecimento da lesão pela FANCM, que associada a *Fanconi anemia-associated protein 24* (FAAP24) e as proteínas de dobrade histona FAAP16 (MHF1) e FAAP10 (MHF2), se ligam à ICL e funciona como um ponto de ancoragem do complexo principal AF. O complexo principal AF é formado por 14 proteínas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FAAP100, FAAP10, FAAP16, FAAP20 e FAAP24) e realiza a monoubiquitinação das proteínas FANCD2 e FANCI (ID2 complex) através da sua subunidade ubiquitinaligase FANCL e a enzima ubiquitina-conjugante UBE2T (FANCT) (Figura3).

Figura 3. Via de reparo das ICL's através da via das proteínas FANCS. Processo de ação das proteínas FANCS quando identificado uma ICL, formação do complexo principal, seguido pela ubiquitinação e reparo do dano.



Fonte: O Autor (2022)

O processo continua quando a FANCD2 ubiquitinada recruta a proteína FANCP que ativa o heterodímero nuclease FANCD1-FANCD2 para realizar a incisão na fita de DNA. Em seguida, a quebra de dupla fita causada pela inserção de nucleotídeos é reparada por recombinação homóloga através de um outro complexo com proteínas reparadores que é recrutado adjacente a FANCD2, este complexo é formado pela FANCD1, FANCD2, FANCL, FANCM, FANCT, FANCF, FANCE, FANCO e FANCP (GARCIA-HIGUERA *et al.*, 2001; CECCALDI *et al.*, 2016). O

antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), monoubiquitinado pela enzima RAD18, promove o recrutamento da FANCD2 e a ativação da FANCL (GENG *et al.*, 2010; CHEUNG; TANIGUCHI, 2017). O FANCI tem papel crucial nesse complexo, atuando como uma helicase no processo de reparo de dano de dupla fita do DNA (DATTA e BROSH, 2019).

Pacientes que apresentam alteração na proteína FANCD2 possuem o complexo principal AF normal e funcional, porém não conseguem localizar a ICL. Enquanto defeitos na proteína FANCD2 impedem que a proteína FANCD2 se ligue corretamente na fita lesionada, e consequentemente que o complexo principal AF seja recrutado para correção da ICL (KIM *et al.*, 2008). É importante salientar que o principal caminho para reparo das ICL'S através da enzima NEIL3, que age de maneira rápida e direcionada. Quando essa via não consegue reparar o dano, é inativada para que a via FA/FANCD2 possa ser ativada. Quando esse dano é causado pela MMC, observa-se que a via NEIL3 atua de maneira dependente da via FA/FANCD2 (LI *et al.*, 2020).

Na via FA/FANCD2 a monoubiquitinação da proteína FANCD2 leva a sua relocação de um compartimento nuclear difuso a um local contendo a proteína BRCA1(FANCS) em uma via comum de reparo. Ao final do reparo a proteína pode ser desubiquitinada e reaproveitada (GARCIA-HIGUERA *et al.*, 2001). A maneira como a ubiquitinação e desubiquitinação de FANCD2/FANCI realmente contribui para o reparo das ICL'S e da manutenção da estabilidade do genoma ainda é pouco entendida. Mas Alcon *et al* (2020) mostraram que o complexo ID2 funciona como um grampo que é preso no DNA através da ubiquitina, gerando assim interfaces distintas para recrutar outros fatores de reparo de DNA. Mas salientou que para o processo de reparo de DNA ser completo e eficaz é necessário que ocorra a desubiquitinação do ID2, caso contrário o complexo ID2 fica bloqueado na fita, gerando uma sinalização incorreta de sítios lesados que devem sofrer reparo por incisão de base ou pode se tornar um obstáculo para as helicases que agem na replicação e transcrição do DNA.

O processo independente de ubiquitinação de FANCI e FANCD2 é bastante interligado, pois a ubiquitinação de FANCI protege a ubiquitina do FANCD2 da ação de USP1 – UAF1 que atuam como proteases específicas da ubiquitina (RENNIE *et al.*, 2020). Assim como a ubiquitinação de FANCD2 é

necessária para a iniciação e manutenção das atividades de FANCI (LEMONIDIS *et al.*, 2021).

As funções de reparo do complexo AF não se limitam apenas às ICLs. A exemplo, a técnica de edição de genoma CRISPR-Cas9 em células humanas envolve a quebra seletiva de dupla cadeia de DNA que requer reparo da fita, para o qual é necessário a incorporação de DNA endógeno via reparo de modelo de cadeia simples. Esse reparo no DNA é mediado pela via AF, logo, sem o conhecimento da funcionalidade da via de reparo do DNA mediado pelas proteínas FANCS pesquisas nessa área não seriam possíveis (RICHARDSON *et al.*, 2018).

Além das funções no reparo das ICLs, as proteínas FANCC também desempenham funções fora do Complexo AF que contribuem para patogenicidade molecular. Estas funções estão relacionadas com resposta inflamatório, estresse oxidativo, produção de aldeídos endógenos, mitofagia e desenvolvimento hematopoietico (BAGBY, 2018). Experimentos desenvolvidos por Sumpter *et al.* (2016) demonstraram que a proteína FANCC tem atividade citoplasmática seletiva na autofagia, e dessa forma, no controle de organelas. Os autores notaram ainda que a proteína tem importante atividade na virofagia, funcionando como marcador de nucleocapsídeo, o que pode explicar uma maior suscetibilidade de pacientes FANCC⁻ a infecções. Além disso, o estudo mostrou que as proteínas FANCA, FANCL, FANCF, FANCD2 e BRCA1 e 2 desempenham um papel importante na atividade autofágica seletiva. Assim como, atuam também como moduladores de sinalização de resposta a citocinas.

Pacientes AF⁺ tendem a ser hipersensíveis a certas citocinas como TNF- α e INF- γ e sua superprodução pode ser um fator de causa endógena de dano ao DNA (GARAYCOECHEA; PATEL, 2013). Brégnard *et al.* (2016) mostraram também que a ausência da proteína FANCP leva ao aumento da transcrição e retro transposição de DNA imunogênico, que em seguida é transportado para o citoplasma e ativa a via cGAS-STING induzindo a superprodução de proteínas pró-inflamatórias.

Dubois *et al.* (2019) analisaram a FANCI em camundongos em diversos processos que são expressos fenotipicamente nos pacientes AF, como por exemplo, a falência medular, deficiência no desenvolvimento e a

presença de alterações esqueléticas. Os autores observaram que a proteína FANCI está presente na embriogênese e quando ausente ou não funcional acarreta retardo no desenvolvimento e alterações esqueléticas, além de diminuir a capacidade de reconstruir o sistema hematopoiético. Os autores relataram também que o complexo formado pela interação de FANCI e RAD51 atua diretamente no processo de recombinação meiótica.

Oka et al. (2020) relataram que mutações no gene *ALDH2* (localizado no cromossomo 12q24.12), responsável pela enzima acetaldeído desidrogenase 2, combinado com mutações no gene *ADH5* (localizado no cromossomo 4q23), responsável pela enzima álcool desidrogenase 5, está relacionado a redução da capacidade de diferenciação da célula hematopoiéticas (progenitora e derivadas), sugerindo assim que a deficiência no processo de desintoxicação de aldeídos causa um grande número de anormalidades hematopoiéticas. Estudo realizado por Takayo et al. (2022) corrobora com essa hipótese ao relatar um paciente com variante *ALDH2* que desenvolveu falência medular precoce.

A relação da AF com o câncer foi reafirmada quando Shen et al. (2015) mostraram que alterações genéticas nos genes AF aparecem em grande quantidade em células cancerígenas de pacientes AF negativo. Além disso, a super ativação da via AF leva a perda da atividade supressora de tumor, e conseqüentemente à carcinogênese. Partindo do pressuposto que a instabilidade genômica e desregulação do ciclo celular estão diretamente associados a desenvolvimento de células cancerígenas, e que os pacientes com AF possuem tanto instabilidade genômica como ciclo celular anormal, o estudo realizado por Liu et al. (2020) investigou a via reparo do DNA dos genes *FANCs* como potencial alvo terapêutico para o câncer, principalmente na fase inicial.

Os primeiros estudos realizados demonstraram que células AF apresentam uma fase G2/M mais lenta que células normais, e que essa lentidão era provocada pela falha da célula em tentar reparar o DNA (ELMORE; SWIFT, 1975; DUTRILLAUX; FOSSE, 1976). Porém, no trabalho realizado em 2012 apontou que, devido a superativação das proteínas p21 e p53 que normalmente cooperam junto com a proteína FANCG e FANCD2

para supressão de tumor, apresentam um atraso na fase G1/G0 do ciclo celular. Essa ativação exacerbada da proteína p53, face aos danos no DNA, também leva a depleção das células tronco hematopoiéticas dos pacientes AF, e que esse quadro se inicia ainda na fase embrionária, no momento de formação do *pool* de células hematopoiéticas progenitoras (CECCALDI *et al.*, 2012).

Outro estudo recente descreveu um novo mecanismo regulador, específico do ciclo celular, da proteína FANCD2 que garante a fidelidade mitótica. Neste mecanismo foi identificada uma CDK reguladora fosforilada (S592) próxima ao local de monoubiquitinação de FANCD2. A fosforilação S592 mediada por CDK promove a monoubiquitinação na fase S do ciclo celular e esse processo é requerido para garantir a conclusão de maneira eficiente da replicação e da estabilidade cromossômica (CANTRES-VELEZ *et al.*, 2021). A ubiquitinação do complexo ID2 parece ser o ponto central do mecanismo de reparo ao dano no DNA, e além de ser a principal via para reparos DSB, também está envolvido no reparo das ICL'S e reparo por excisão de base (REB) (SUSUKI *et al.*, 2017).

2.6.1 Perfil mutacional da Anemia de Fanconi

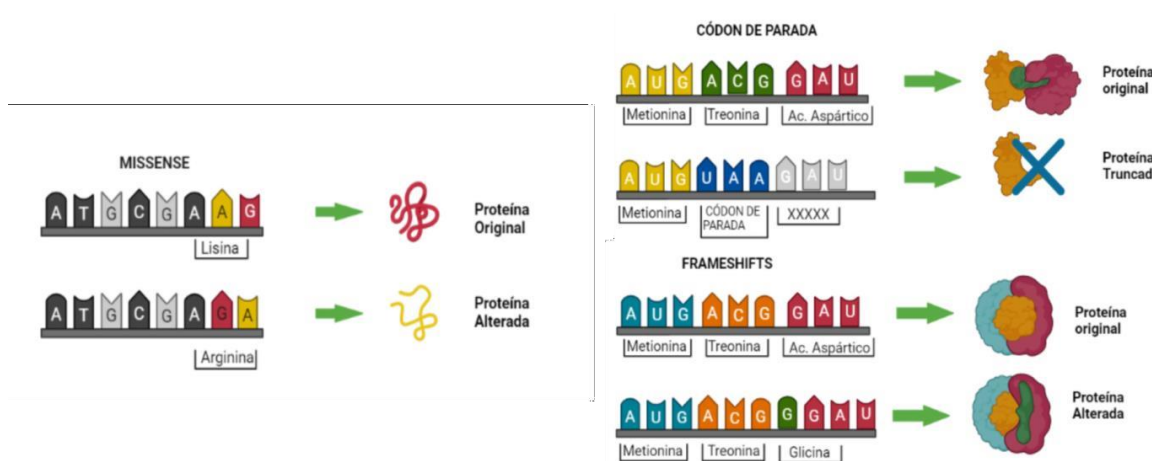
A anemia de Fanconi apesar de possuir 22 genes relacionados a sua etiopatogenia, possui cerca de 90% das mutações relatadas em apenas três genes: *FANCA* (65%), *FANCC* (20%) e *FANCG* (10%). Estes genes produzem produtos proteicos que atuam principalmente como parte do complexo principal da via FA/FANCD2 (FARJADO *et al.*, 2022).

O perfil das mutações encontradas incluem: as que geram produtos proteicos diferentes (*missense* e deleções *in-frame*), as que impedem a formação da proteína funcional (*frameshifts*, códon de parada e grandes deleções) e as que afetam o *splicing* (mutações em aceptores de *splicing*). As mutações *missense* são caracterizadas por uma troca de base nitrogenada, gerando assim um aminoácido diferente. Enquanto a *frameshifts* acontece uma inserção ou deleção de base nitrogenada em números não múltiplos de três, acarretando alteração na matriz de leitura que pode resultar em produto gênico diferente ou ausência de produto.

Mutação do tipo códon de parada antecipa o aparecimento do códon de parada, gerando assim uma proteína truncada (Figura 4). Recentemente, mutações em 12 genes que atuam na biogênese ribossomal foram encontradas em pacientes AF, sendo está, atualmente considerada uma ribossomopatia (GUEIDERIKH et al., 2022).

O gene *FANCA* está localizado no cromossomo 16q24.3, possui 43 éxons e gera uma proteína com 1455 aminoácidos. Já foram identificadas 666 variantes neste gene (ALI et al., 2021). Dentre as 666 variantes são observadas mutações de todos os tipos. Grande parte de mutações *missenses* em *FANCA* causa alteração funcional na proteína, fazendo com que não ocorra a dimerização da *FANCA*, ocasionando a montagem de um complexo principal AF simétrico duplo que se prevê ser inativo (CASTELLA et al., 2011; WANG et al., 2021). Sharid et al. (2022) fizeram análises *in silico* de mutações *missenses* nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*, relatando 16 variantes no *FANCA*, seis no *FANCC* e uma variante no *FANCG* que foram consideradas altamente deletérias. Bottega et al. (2018) analisaram o efeito das mutações *missenses* na atividade mitocondrial e concluíram que a proteína *FANCA* alterada tem uma influência negativa na eficácia da mitofagia acarretando acúmulo de mitocôndrias alteradas.

Figura 4. Tipos de mutações. Mutação tipo Missense onde ocorre a troca na ordem de um nucleotídeo, formando assim uma proteína alterada. Mutação tipo códon de parada ocorre quando um nucleotídeo é trocado por outro e ocorre a formação de um códon de parada precoce, tendo como resultado uma proteína truncada. Mutação tipo Frameshifts é caracterizada pela inserção de um novo nucleotídeo, alterando assim a matriz de leitura e ocasionando uma proteína alterada.



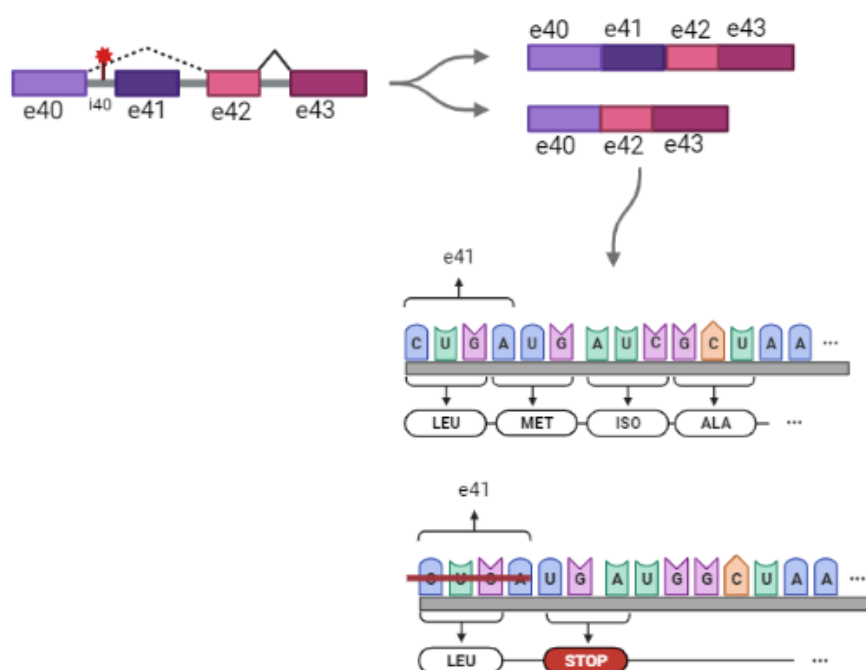
Fonte: O auto(2022)

Diferente das mutações *missenses*, as mutações do tipo *frameshift* acarretam a ausência de produção da proteína FANCA (Balta *et al.*, 2000). Os autores relataram a mutação 3639delT, onde ocorre a deleção de uma timina na posição 3639 do éxon

37. Mutações que alteram o *splicing* vêm sendo cada vez mais relatadas em introns e associadas a variantes patogênicas causadoras de AF, muitas delas acarretam a falta de leitura do éxon seguinte, mudando assim toda a matriz de leitura na tradução (BARALLE, 2005; REPCZYNSKA *et al.*, 2022).(Figura 5)

O gene *FANCG* está localizado no cromossomo 9p13, possui 14 éxons e gera um produto proteico com 622 aminoácidos. Atualmente 77 variantes são relatadas e dentre as variantes são encontradas mutações de todos os tipos. Mutações em sítios aceptores de *splicing* também vêm sendo cada vez mais relatadas (REYES *et al.*, 2022). Assim como a proteína FANCA, a proteína FANCG faz parte do core principal de atuação da via AF, e a presença de mutações no gene *FANCG* tendem a gerar uma proteína truncada em 80% dos casos (DEMUTH *et al.*, 2000).

Figura 5. Esquema exemplificando mutação em intron que causa a não leitura de um éxon, acarretando alteração no *splicing*.



Fonte: O autor (2022)

O gene *FANCC* é localizado no cromossomo 9p22.35, possui 25 éxons e produz uma proteína com 558 aminoácidos. Até o momento, 377 variantes foram relatadas, e destas, 23 têm efeitos benignos, 36 possuem efeitos patogênicos e o restante possui efeito incerto. O gene *FANCC* possui mutações de todos os tipos relatada. A mutação IVS4+4A>T em *FANCC* é associada a um fenótipo mais severo de AF quando em homozigose, e a um fenótipo mais leve quando em heterozigose. (AFTAB *et al.*, 2017).

2.7 ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NA AF

2.7.1 Fragilidade Cromossômica

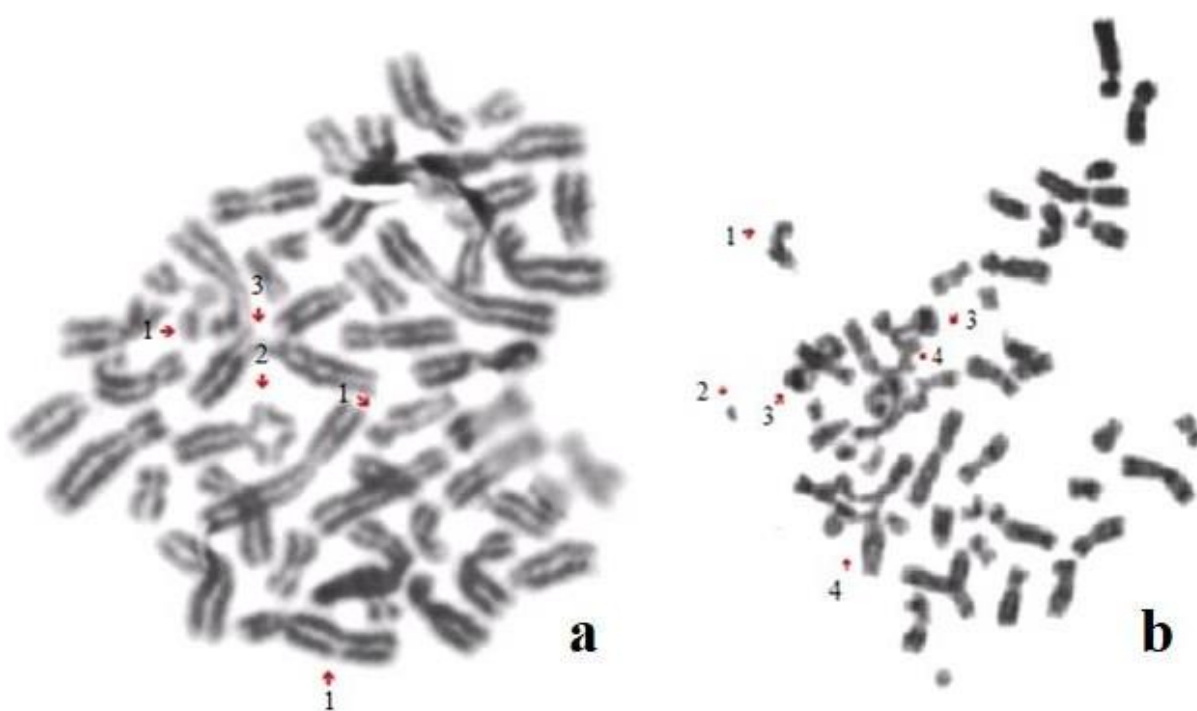
As primeiras alterações citogenéticas de AF foram descritas por Schroeder *et al.* (1964), onde foi observado a presença de quebras, de falhas de cromátides, de cromossomos, e presença de fragmentos cromossômicos, que ocorriam espontaneamente, confirmando a instabilidade cromossômica da doença (Figura 5). Mais tarde, os mesmos autores realizaram um estudo comparativo entre AF e Síndrome de Bloom, ambas síndromes de fragilidade cromossômica, com apresentações citogenéticas espontâneas sutilmente diferentes (SCHROEDER *et al.*, 1974). Mas a anemia de Fanconi, devido a maior dificuldade de reparo das ICLs apresentavam uma maior quantidade de figuras radiais e trocas de cromátides nível $\geq V$ (envolvendo um número maior de cromossomos não homólogos).

A fragilidade cromossômica característica da doença é altamente associada ao nível de saturação de oxigênio (JOENJE *et al.*, 1981). Ponte *et al.* (2012) relataram que células AF+ tratadas com ácido lipóico e N-acetilcisteína, ambos antioxidantes, apresentaram uma drástica diminuição na fragilidade cromossômica. No ano seguinte, Cappelli *et al.* (2013), mostraram a presença de defeitos na função respiratória da mitocôndria, levando a baixa produção de

adenosina trifosfato (ATP) e aumento do estresse oxidativo da célula. Devido a esses estudos, Ravera *et al.* (2018) sugeriram que a fragilidade cromossômica dos pacientes portadores de AF se deve ao alto nível de estresse oxidativo nas células, associada a deficiência do sistema de reparo de DNA provocada pela doença.

Aproximadamente 30% das células hematológicas conseguem reverter essa fragilidade, levando a apresentação da doença como um mosaico no tecido hematopoiético, com algumas células apresentando variantes cromossômicas e outras normais (KWEE *et al.*, 1983). Este mecanismo representa uma dificuldade nas técnicas diagnósticas que utilizam agentes alquilantes no sangue periférico, podendo levar a identificação de falsos negativos. Por conta disso, é indicado que casos com clínica compatível a AF e teste de fragilidade realizado em sangue periférico negativo, repitam o teste de fragilidade em células de fibroblastos, onde não ocorre reversão (OOSTRA *et al.*, 2012).

Figura 5. Metáfases apresentando fragilidade cromossômica. Em (a) Quebras (1), Figura quadrirradial (2) e Rearranjo (3); e em (b) Quebra (1), Fragmento (2), Cromossomos em anel (3) e Rearranjo (4).



Um caso de gêmeas monozigóticas para a mutação no gene *FANCA* foi descrita por Mankad *et al.* (2006), as quais não apresentaram comprometimento medular até os 28 anos devido à capacidade de reversão dessas alterações. Os autores chamaram o mosaicismo de terapia gênica natural, e apontou o caso como comprovação de possibilidade de terapia gênica na doença.

A fragilidade cromossômica também parece ser afetada por bioflavonoides. Partindo do pressuposto que bioflavonoides são inibidores naturais da enzima topoisomerase II, Galeano e Guevara (2007) testaram cinco flavonoides (baicaleína, miricetina, quercetina, fisetina e kaenferol) e dois isoflavonoides (genisteína e genistina) como agentes estimulantes da fragilidade cromossômica em células de paciente AF, onde foi relatado que as culturas que receberam os bioflavonoides obtiveram um aumento considerável no número de variantes cromossômicas (62% genisteína; 56% genistina; 55% Fisetina e 46% Kaenferol) quando comparado ao controle.

O estudo realizado por Filipović *et al.* (2016), envolvendo análises molecular e citogenética de células de pacientes com AF em diferentes estágios da doença, demonstrou que os pontos de quebra mais comuns estão relacionados aos sítios frágeis comuns (CFS) dos cromossomos, e que sua distribuição está ligada ao grau de severidade da doença. Além disso, foi demonstrado que a maior susceptibilidade dessas células de formarem figuras radiais e rearranjos está relacionada ao aumento do encurtamento dos telômeros, que aumentam com a progressão da doença.

2.7.2 Alterações Citogenéticas na Medula Óssea

Os primeiros estudos citogenéticos realizados na medula óssea de pacientes AF não encontraram alterações cromossômicas (BLOOM *et al.*, 1966; DOSIK *et al.*, 1970, SCHROEDER *et al.*, 1974). Enquanto estudos realizados em pacientes com quadro hematológico mais grave e em evolução para neoplasias hematológicas, frequentemente apresentam alterações cromossômicas, mas curiosamente essas alterações não

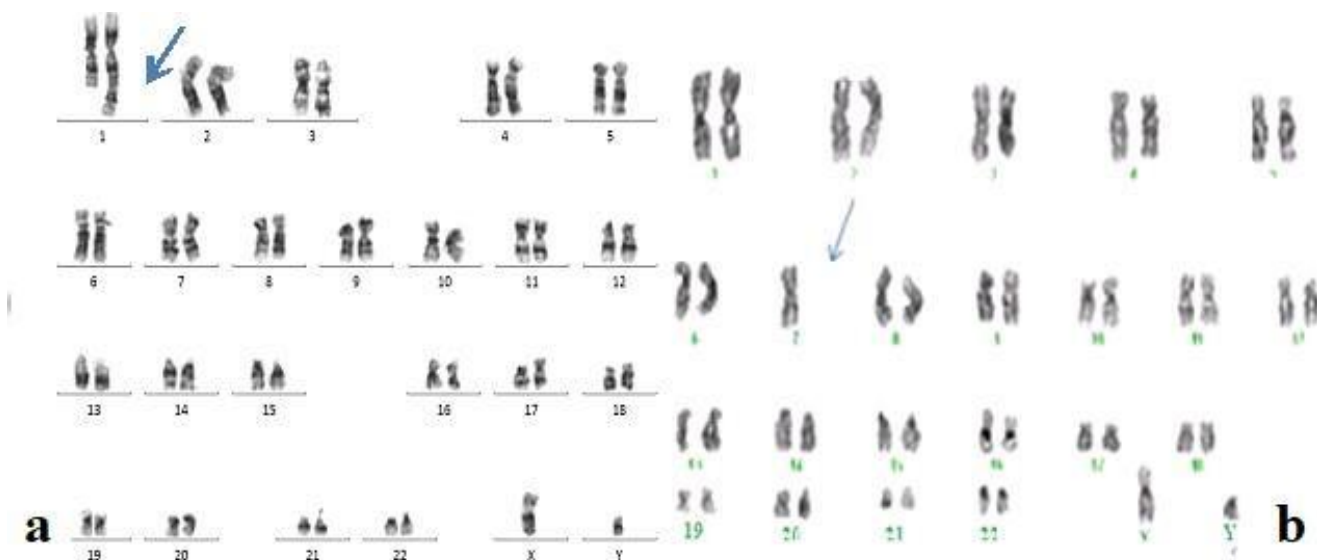
ocorrem envolvendo regiões dos oncogenes específicos (genes FANCs) (AUERBACH, 1992)

Os pacientes AF possuem elevado risco de desenvolver malignidades hematológicas, principalmente SMD e LMA, esta evolução da doença muitas vezes pode ser percebida através da análise do cariótipo da MO, pois estes pacientes em evolução tendem a apresentarem alterações cromossômicas clonais (NOWELL; BESA, 1989). Diversos estudos em pacientes leucêmicos ou com SMD secundária a AF descreveram alterações cromossômicas clonais sinalizando a evolução da doença, cujo prognóstico é desfavorável ao paciente. Huret *et al.* (1988) ao realizarem uma avaliação de evolução cariotípica em uma paciente AF com leucemia, perceberam a presença de alterações clonais recorrentes, sendo as mais comuns a monossomia do cromossomo 7(-7), duplicações e deleções em 1q e 3q. Alguns clones têm comportamentos incertos com desaparecimento, surgimento e evolução ao longo do tempo. Também analisando pacientes AF que evoluíram para SMD e LMA, Korgaonkar *et al.* (2010) relataram 5 pacientes indianos com cariótipos alterados que envolviam dup(1q), -7 e +10.

Em um estudo com 57 pacientes AF em evolução para SMD/LMA, Quentin *et al.* (2011) observaram que os principais cromossomos envolvidos foram os 1, 3 e 7, mas também relataram alterações no cromossomo 21, inclusive alteração críptica envolvendo o gene *RUNX1*(21q22). Berger *et al.* (1975) também relataram um paciente AF com trissomia livre do cromossomo 21. Enquanto Veiga (2009) relatou dois pacientes apresentando monossomia do cromossomo 21.

Alterações citogenéticas em 73 pacientes AF após transplante de MO foi descrito por Wang *et al.* (2018). Desses, 16 apresentaram alterações, sendo as mais comuns duplicações no braço longo dos cromossomos 1 e 3, e deleções, ou monossomia envolvendo o cromossomo 7. Nesses estudos, os pacientes com alterações no cromossomo 3 apresentaram pior prognóstico em relação aos outros pacientes estudados. A figura 6 mostra as alterações frequentes observadas em pacientes AF.

Figura 7 Alterações cromossômicas frequentes em AF. a) Cariótipo 46,XY,der(1)dup(1q12~1q43); b) Monossomia do cromossomo 7 (46,XY,-7).



Fonte: O autor (2022)

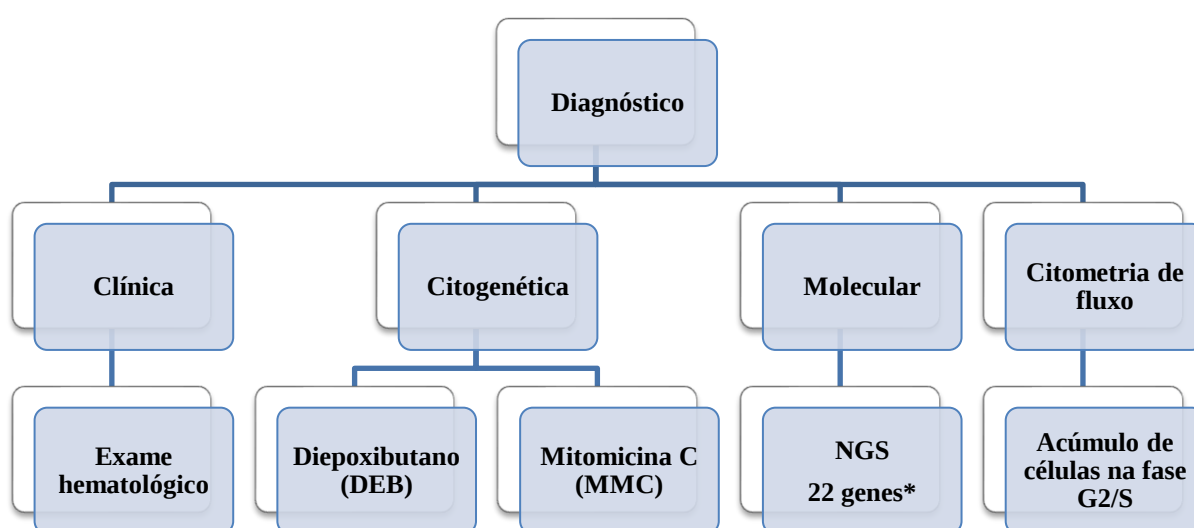
Outras alterações, menos frequentes, também são relatadas em pacientes em evolução. Sugita *et al.* (2000) relataram a t(11;16)(q23;p13) em um paciente que evoluiu para LLA. Borges *et al.* (2017) descreveram três novas alterações cariotípicas na evolução da AF: der(1)t(1;3)(p35.2;p22.3-p23); der(11)t(11;21)(q25;q21),del(11)(q14q23);e der(2)t(2;20)(q13.1;q13.1q13.2),del(5)(q12.3q13.3),der(13)t(13;17)(q34;q21.2),der(17)(:q11.1>q21),der(20)t(17;20)(q11.1;q13.1-q13.2). Todas as alterações envolviam cromossomos relacionados à evolução leucêmica. Contudo as regiões cromossômicas dos 22 genes *FANC's* foram raramente envolvidas.

Pollard *et al.* (2022) estudaram 14 casos AF, onde 12 tiveram cariótipo normal e dois tiveram cariótipos alterados. Nestes dois últimos havia um paciente com clone estável: 46,XY,dup(12)(q15q13)[5], alteração essa incomumente observada na AF e o outro paciente possuía evolução biclonal com os clone 46,XY,del(20)(q11.2q13.1)[3] e 46,XY,del(7)(q22)[4]. O paciente que apresentou o clone em evolução era dependente de transfusão.

2.8 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico de AF é complexo pelo fato de ser uma doença com sintomas heterogêneos e comuns a diversas outras doenças genéticas. Portanto, dois ou mais métodos para confirmação da doença devem ser realizados. Os principais métodos são: citogenética, biologia molecular e citometria de fluxo. Esses métodos devem sempre ser associados com a clínica do paciente para confirmação do diagnóstico (Figura 7) (AUERBACH, 2009).

Figura 8. Fluxo de diagnóstico para AF.



Fonte: O autor (2022)

2.8.1 Teste Citogenético de Fragilidade Cromossômica

O teste citogenético de fragilidade cromossômica é baseado na principal função do complexo FA-BRCA que é atuar no reparo das ICLs. Desta forma as células dos pacientes com AF são hipersensíveis á agentes indutores de danos ICL's, como os alquilantes. Esta sensibilidade é a base do diagnóstico citogenético da AF, e a exemplo desses agentes clastogênicos, temos o Diepoxibutano (DEB) e a Mitomicina C (MMC) (AUERBACH, 1993; OOSTRA *et al.*, 2012).

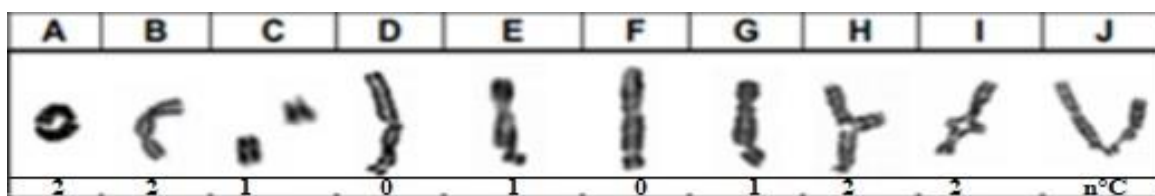
O principal agente utilizado é o DEB, considerado o padrão ouro para o diagnóstico da AF, porém este composto é altamente cancerígeno e

volátil, requerendo equipamentos de segurança mais complexos para o seu manuseio. Além disso, em contato com a água ele perde lentamente sua atividade, com um tempo de meia vida de aproximadamente 4 dias. Um composto químico alternativo para o teste de fragilidade cromossômica é a MMC, que apesar de algumas limitações como necessidade de precisão na concentração utilizada para não gerar resultados falsos positivos e a possibilidade de formação de monoaductos. Entretanto, é menos tóxica e menos volátil que o DEB, tem um maior tempo de meia vida e apresenta desempenho semelhante. Além disso, o teste utilizando a MMC tem a capacidade de diagnosticar mosaicos, o que é impossibilitado com o uso do DEB (OOSTRA *et al.*, 2012). Um método recentemente publicado utiliza a análise citogenética, através da radiação ionizante (RI) como agente clastogênico da fragilidade cromossômica, sendo assim um teste complementar (AMARAL *et al.*, 2019).

Na análise do teste de fragilidade cromossômica com agente alquilantes (DEB ou MMC) adicionados ao meio de cultura contendo o material biológico do paciente, após a cultura *in vitro*, são obtidas metáfases para avaliar o índice de fragilidade cromossômica e a porcentagem de células com fragilidade. Este índice é calculado através da presença de variantes cromossômicas que tendem aparecer em portadores AF (OOSTRA *et al.*, 2012).

Para o cálculo deste índice, valores são atribuídos a cada variante encontrada. As principais são: figuras quadri e trirradiais (2 pontos), quebras de cromossomos (1 ponto), fragmentos (1 ponto), rearranjos (é contado o número de centrômeros envolvidos), cromossomo em anel (2 pontos) e cromossomos dicêntricos (2 pontos). Falhas de cromátide e cromossomos não são computadas por serem frequentes em culturas controle induzidas com agentes alquilantes (Figura 8) (OOSTRA *et al.*, 2012).

Figura 9. Variantes cromossômicas observadas em pacientes AF+ com sua respectiva pontuação. A) cromossomo em anel B) dicêntrico c) Fragmentos D) falha de cromátide E) quebra de cromossomo F) falha de cromossomo G) quebra de cromátide H) figura trirradial I) figura quadriradial J) rearranjo.



Fonte: Adaptado de Auerbach,(1989)

2.8.1 Teste de Biologia Molecular

Os testes diagnósticos por biologia molecular têm como objetivo pesquisar pormutações e podem ser realizados por diversas metodologias, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação multiplex de sondas dependente de Ligação (MLPA) ou sequenciamento de nova geração (NGS). Na AF as técnicas de PCR e MLPA são metodologias que não permitem a análise simultânea e completa de todos os 22 genes atualmente relacionados com a doença. Mas nem sempre se faz necessário a análise de todos os genes, pois cerca de 60 a 70% das mutações são observadas no gene *FANCA*, sendo destas 15 a 40% compostas por grandes deleções (PILONETTO *et al.*, 2017).

Através destes dois métodos Pilonetto *et al.* (2017) identificaram que a mutação mais frequentemente encontrada nos portadores de AF na população brasileira era ac.3788_3790delCTC do *FANCA* (27,1%), seguida pela c.1077-2A>G do *FANCG* (11%), esses autores desenvolveram um *screen* de triagem que abrange as mutações mais frequentes em três principais genes (Tabela 3). Cerca de 85% dos casos são resolvidos após investigação dos genes *FANCA*, *FANCC*, *FANCG*, *FANCE*, *FANCF* e *FANCB* (GILLE *et al.*, 2012).

Tabela 3. Composição do painel de triagem para AF da população brasileira.

Gene	Mutações
<i>FANCA</i>	c.3788_3790delTCT
	c.2535_2536delCT
	c.987_990delTCAC
	c.2853-19_2853-1del19
	c.1115_1118delTTGG
<i>FANCC</i>	c.65G>A
	c.456+4 A>T
	c.1393 C>T
<i>FANCG</i>	c.1077-2A>G

Fonte: Pilonetto, et al.,2017

Sendo assim, painéis de triagem com as alterações mais frequentes nos genes mais recorrentes têm sido realizados para o diagnóstico através da técnica de MLPA (CHEUNG; TANIGUCHI, 2017; KNIES *et al.*, 2017). Quando o paciente apresenta clínica sugestiva e teste de fragilidade positivo, nenhuma mutação é encontrada pelo painel de triagem. Nesses casos é recomendado a realização do sequenciamento completo do genoma (WGS) ou sequenciamento do exoma (WES), a fim de buscar por mutações em genes menos frequentes ou mutações ainda não conhecidas. Através do sequenciamento destes genes, Pilonetto *et al.* (2017) identificaram 22 novas mutações nos genes *FANCA*, *FANCC* E *FANCG* da população brasileira através do sequenciamento destes genes.

2.8.2 Detecção da monoubiquitização de FANCD2

Um método complementar para o diagnóstico da AF foi desenvolvido por Shimamura *et al.* (2002), baseado na detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2. A ausência da isoforma monoubiquitinada da proteína FANCD2 (FANCD2L) em decorrência de alterações nas proteínas formadoras do complexo principal da AF (FANCA, B, C, E, F, G, L e M) ou na própria proteína FANCD2, também leva a uma falha no mecanismo de reparo do DNA. Contudo, este método só se torna eficaz quando mutações ocorrem em genes que produzem proteínas que estão envolvidas nos processos anteriores a ubiquitinação, reconhecimento do dano (FANCM), formação do complexo principal (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FAAP100, FAAP10, FAAP16, FAAP20 e FAAP24) e processo inicial de ubiquitinação (FANCL E FANCI). Caso ocorra mutação a jusante do complexo de monoubiquitinação, este método não se torna efetivo para o diagnóstico (PILONETTO *et al.*, 2017).

2.9 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A anemia de Fanconi possui sintomas muito heterogêneos e semelhantes a diversas outras doenças genéticas. Seja de falha medular como anemia Diamond-blackfan, síndrome Shwachman-Diamond e síndrome de TAR, como também doenças de fragilidade cromossômica espontânea como Síndrome de Bloom, Neijmegen, Ataxia telangiectasia, entre outras ou ainda doenças de malformações congênita como VACTER (JOENJE; PATEL, 2001).

As doenças de falência medular possuem sintomas clínicos e hematológicos muito semelhantes, como risco aumentado ao desenvolvimento de SMD ou LMA, infecções recorrentes, hipoplasia medular e pigmentação anormais na pele, sendo necessário sempre a realização de exames específicos para definição da doença (DONADIEU *et al.*, 2012). No caso da AF o teste citogenético de fragilidade cromossômica é o principal aliado no diagnóstico diferencial, uma vez que anemia Diamond-blackfan, síndrome Shwachman-diamond e síndrome de TAR não apresentam fragilidade cromossômica (SHIMAMURA, 2009).

Para a confirmação do diagnóstico entre elas é necessário a pesquisa por mutação nos genes correspondentes a doença. Na anemia Diamond-blackfan mutações são observadas nos genes *RP's*, sendo o mais comumente afetado, o *RPS19*, que está presente em 25% dos casos e possui mais de 80 mutações identificadas e relacionadas com a doença. Outros genes *RP's* responsáveis por cercade 43% dos casos são os *RPS24*, *RPS17*, *RPL35A*, *RPL5*, *RPL11* e *RPS7* (DILSHADJAHAN *et al.*, 2020).

Na síndrome Shwachman-Diamond deve-se pesquisar variantes patogênicas bialélicas nos genes *DNAJC21*, *EFL1*, *SBDS* ou variante patogênica em heterozigose no gene *SRP54* (CARAPITO *et al.*, 2017; DHANRAJ *et al.*, 2017; STEPENSKY *et al.*, 2017). Enquanto na síndrome de TAR o gene relacionado com a doença é o *RBM8A*, podendo ser observado microdeleções ou alelos hipomórficos (c.-21G>A e 67+32G>C) (ALBERS *et al.*, 2012).

Dentre as síndromes de fragilidade cromossômica, a principal

característica em comum é a etiologia baseada em falhas no sistema de reparo de DNA. Sendo falha de reparo por excisão de nucleotídeo (NER) na síndrome de Bloom, falha no sistema de reparo de dano dupla fita no caso da Ataxia telangiectasia e na síndrome de Nejimegen, e o sistema de reparo de ICL's na anemia de Fanconi (WU, 2016). Por terem a mesma base etiológica, muitos sintomas são comuns, mas a síndrome de Nejimegen é a que mais se sobrepõe em sintomas com a AF (GENNERY *et al.*, 2004). A síndrome de Nejimegen é uma doença autossômica recessiva e apresenta sintomas comuns a AF, à exceção da hipoplasia medular, tem anormalidades de pigmentação de pele, retardo no crescimento, face de “passarinho”, microcefalia, predisposição ao câncer, infecções recorrentes e imunodeficiência (CHRZANOWSKA *et al.*, 2012). Apresenta também fragilidade cromossômica espontânea derivada de mutação no gene *NBS1*, um membro do complexo MRN (*MRE11*, *RAD50*, e *NBS1*) que atua no processo de sinalização de reparo de quebra dupla fita do DNA, sendo mais sensível a danos causados por radiação ionizantes (RI) (WILLIAMS *et al.*, 2007). Logo, para o diagnóstico da síndrome de Nejimegen é recomendado o teste de fragilidade cromossômica usando RI, mas também através de teste com MMC.

A diferença entre resultados de MMC de pacientes AF e síndrome de Nejimegen se dá pelo menor índice de fragilidade quando comparado com paciente AF. Além do tipo de variante cromossômica observada, sendo mais frequentes quebras e fragmentos na síndrome de Nejimegen e figuras radiais em AF (RÃO *et al.*, 2007).

A síndrome VACTERL é uma doença de diagnóstico clínico, caracterizada por malformações congênitas decorrentes de anormalidades estruturais do mesoderma embrionário, cuja etiologia é desconhecida e cada letra corresponde a uma anormalidade clínica. O diagnóstico se dá pela ocorrência simultânea de, pelo menos, três das seguintes malformações congênitas: vertebrais (vértebras ausentes, hemivértebras, vértebras “borboleta”, fendas e fusões vertebrais), costelas (costelas ausentes, costelas supranumerárias, fusões e divisão), de membros, cardíacas, renais, anorretais e fistula traqueoesofágica. Diversos estudos relataram pacientes com AF e associação VACTERL, um percentual de 5%-

12% dos pacientes com AF podem ser classificados como tendo a associação VACTERL (ALTER; ROSENBERG, 2013; MOISÉS *et al.*, 2019). Dessa forma, caberá ao geneticista observar esses pacientes na infância para considerar o diagnóstico de AF, através do teste de fragilidade cromossômica, considerar o aconselhamento genético para a família e encaminhar para o hematologista pediátrico para acompanhamento (ALTER; GIRI, 2016).

2.10 TRATAMENTO

O tratamento da AF consiste em tratar os sintomas, decorrentes da severa citopenia, característica da doença, até o paciente encontrar um doador compatível para o HSCT. Este tratamento inclui o uso de corticoides, como prednisolona, andrógenos sintéticos com efeito anabolizante como oximetolona e oxandrolona, e derivados de esteroides como o danazol. O uso de andrógenos sintéticos em doenças de falência medular visa à recuperação hematológica do paciente e seu mecanismo de ação na eritropoiese vem sendo estudado (McMANUS *et al.*, 2020).

O tratamento com oximetolona foi mais utilizado com uma melhor resposta, mas os severos efeitos colaterais que incluem hepatotoxicidade e virilização fez com que fosse descontinuado (CALADO; CLÉ, 2017). Outro esteroide anabolizante com potencial de uso, é a oxandrolona que apesar da elevada hepatotoxicidade, apresenta baixo índice de virilização e irritabilidade gástrica (SUSAN *et al.*, 2016). O danazol é um esteroide, com efeito, antigonadotrópico que vem ganhando espaço, sendo bastante utilizado porque mostrou uma resposta semelhante ao oximetolona e uma diminuição dos efeitos colaterais, principalmente a virilização, sendo assim, mais indicado para mulheres (CATALÀ *et al.*, 2020).

Recentemente, o uso terapêutico utilizando outras drogas não andrógenas como a metformina vem apresentando bons resultados na recuperação do quadro hematológico, acarretando aumento nos neutrófilos, plaquetas e hemácias em pacientes AF não diabéticos (POLLARD *et al.*, 2022). Este resultado foi acrescido ao retardo na formação de tumor observados em estudos realizados em ratos *Fancd2*^{-/-}

(ZANG; TANG, 2016).

Terapêuticas alternativas para recuperação da falência medular estão em estudo. Casado *et al.* (2022) testaram, em camundongos AF, bloqueadores de anticorpo anti-NKG2D e observaram efeito protetor na linhagem de eritrócitos. Hira *et al.* (2013) também relataram que drogas antagonistas de ALDH2, como alda-1, tem efeito protetor contra a falência medular de pacientes AF.

O transplante alogênico de medula óssea ainda é a única alternativa curativa para pacientes AF+. Porém, essa metodologia enfrenta problemas, devido à sensibilidade das células dessas pessoas a agentes alquilantes e radiação. Dessa forma, esses pacientes devem passar por um regime de condicionamento adaptado no pré HSCT (BONFIM *et al.*, 2022).

No Brasil, o primeiro transplante foi realizado em 1983 no Centro de Transplante de MO da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Atualmente, este centro é referência no tratamento e transplante de pacientes AF e desenvolveram um protocolo adaptado para seus pacientes. Dentre as adaptações, a dosagem de ciclofosfamida foi reduzida e a fludarabina não é administrada (BONFIM *et al.*, 2022).

Os riscos que devem ser avaliados no pós transplante de medula óssea (TMO) nos pacientes AF, incluem a doença versus hospedeiro (GVHD), suscetibilidade a tumores sólidos (Fanconi Anemia Research Fund, 2014; FRONTBRUNE *et al.*, 2017) e o risco aumentado a infecções. Além da chance de 50% de retorno da doença mesmo após transplante de medula óssea (UPPULURI *et al.*, 2020).

Frente à grande dificuldade em encontrar doadores compatíveis, estudos de diagnóstico genético pré-implantação, no qual o embrião fruto de uma inseminação artificial, tem seu genoma estudado para doenças genéticas antes de sua implantação no útero, o que permite associar a avaliação pré-natal de uma possível criança com AF ao estudo HLA do embrião. Dessa forma, é possível produzir embriões AF negativo com potencial para doar medula óssea para um irmão já diagnosticado com a doença (VERLINSKY *et al.*, 2001).

Com o avanço recente da técnica de edição de DNA CRISPR,

alguns grupos têm se destacado o seu uso para tratamento da AF. O estudo realizado por Vrugt *et al.* (2019) conseguiu reverter com sucesso fibroblastos e células tronco embrionárias *FANCF* mutadas em células normais. Por questões éticas, o estudo ainda é limitado a experimentos *in vitro*, mas abre espaço para estudos com o objetivo de desenvolvimento da técnica de forma terapêutica.

3. ARTIGO

3.1 ARTIGO I

HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN A PATIENT WITH FANCONI ANEMIA AND VACTERL ASSOCIATION

Maria Luiza Rocha da Rosa Borges^{1,2}, Victor Coentro Torreiro de Moraes³, João Lucas Cruz Souza^{1,4}, Edinalva Pereira Leite¹, Neide Santos², Terezinha de Jesus Marques-Salles¹

¹*Centro de Oncohematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) - Recife (PE), Brasil.*

²*Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Recife (PE), Brasil.*

³*Departamento de Pediatria, Hospital Infantil Maria Lucinda (HIML) - Recife (PE), Brasil.*

⁴*Laboratório de Imunogenética, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Recife (PE), Brasil.*

Autor para correspondência: Maria Luiza Rocha da Rosa Borges - Laboratório de Citogenética do Centro de Oncohematologia Pediátrica, Hospital Oswaldo Cruz - Rua Arnóbio Marques, nº 310 - Santo Amaro – CEP: 50100-130 – Recife (PE), Brasil - Email: marialuiza.rosaborges@hotmail.com

**ARTIGO ACEITO NO PERIÓDICO ABCS HEALTH SCIENCES - F.I = 0.6;
QUALIS UNIFICADO: A3 (Anexo C)**

Relato de Caso (MS 2021-021)

ABSTRACT

Introduction: Hemophagocytic syndrome results from hyperactivity of histiocytes and lymphocytes, triggered by infections, mainly viral by cytomegalovirus, Epstein-Barr and herpes. Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease with heterogeneous symptoms common to other diseases such as VACTERL, a disease of unknown etiology in which there are several congenital malformations. The concomitance of Fanconi and VACTERL anemia occurs in 5 to 30% of FA patients. **Report:** A 14-month-old male infant was admitted to investigate fever, hepatosplenomegaly, and granulopenia. The patient was diagnosed with hemophagocytic syndrome due to hyperferritinemia, bone marrow hemophagocytosis, transaminase elevation, decreased fibrinogen, and cytomegalovirus (CMV) infection confirmed by serology and PCR. The test with mitomycin C (MMC) showed chromosomal fragility. The patient was diagnosed with a VACTERL/FA association for having a clinic and a test compatible with both FA and VACTERL. **Conclusion:** The VACTERL/FA association is seldom described, but is present in pediatric medical practice. This study presented the main clinical-laboratory aspects and reviewed the main aspects of the concurrence of this pathology.

Keywords: lymphohistiocytosis; hemophagocytic; Fanconi anemia; congenital abnormalities; cytogenetics; chromosome fragility.

RESUMO

Introdução: A síndrome hemofagocítica decorre da hiperatividade de histiócitos e linfócitos e é desencadeada por infecções, principalmente virais por citomegalovírus, Epstein-barr e herpes. A anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara com sintomas heterogêneos em comum a outras doenças como a associação VACTERL, uma doença de etiologia desconhecida na qual existe diversas mal formações congênitas. A concomitância da anemia de Fanconi e VACTERL é descrita em 5 a 30% dos pacientes AF. **Relato:** Lactente de 14 meses, sexo masculino, admitido para investigar um quadro de febre, hepatoesplenomegalia e granulopenia. Os exames laboratoriais mostraram a hiperferritemia, elevação da transaminases, medula óssea com hemofagocitose, sorologia e PCR positivos para citomegalovírus (CMV). O paciente foi diagnosticado com síndrome hemofagocítica por citomegalovírus. Como havia também hipoplasia do polegar esquerdo, presença de hemivértebra, agenesia renal e teste positivo de fragilidades cromossômicas com mitomicina C (MMC), o paciente foi diagnosticado com associação VACTERL/AF. **Conclusão:** O citomegalovírus quando infecta pacientes com problemas de imunidade como AF, apresenta risco de desencadear a síndrome hemofagocítica. A associação VACTERL/AF é pouco descrita, mas presente na prática médica da pediatria. Esse estudo descreveu os principais aspectos clínicos-laboratoriais e revisou os aspectos fundamentais descritos sobre a concomitância dessas patologias.

Palavras-chave: linfo-histiocitose hemofagocítica; anemia de Fanconi; anormalidades congênitas; citogenética; fragilidade cromossômica.

INTRODUCTION

Hemophagocytic syndrome (HS) is a rare but potentially fatal disease that arises from the hyperactivity of histiocytes and lymphocytes. It can be present primarily or secondarily. The primary form is due to mutations in autosomal recessive genes that encode proteins related to the process of cytotoxic granule exocytosis during programmed natural killer (NK) cell death. Secondary hemophagocytic syndrome (acquired SHS) can arise from various conditions such as immunodeficiencies, rheumatologic diseases, malignancies, and infections. The most frequent infection is the virus of the herpes family, but bacterial, fungal, and parasitic pathogens can also trigger the disease^{1,2}.

Fanconi anemia (FA) is a rare disease with a heterogeneous clinical and genetic profile. The main signs and symptoms described in the disease arise from congenital bone abnormalities and bone marrow failure that may lead to a picture of aplastic anemia. These patients have a high risk of mortality from malignancies such as myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, and solid tumors^{3,4}. The etiopathogenesis of the disease results from mutations in genes involved in DNA repair and mostly presents an autosomal recessive profile, but an X-linked profile can be observed when the *FANCB* gene is affected, or more rarely an autosomal dominant profile when the *FANCR* gene is affected^{5,6}.

VACTERL associations are congenital malformations resulting from structural abnormalities of the embryonic mesoderm, whose etiology is unknown and each letter corresponds to a clinical abnormality. The diagnosis is made by the simultaneous occurrence of at least three of the following congenital malformations: vertebrae (absent vertebrae, hemivertebrae, butterfly vertebrae, vertebral fissures, and fusions), ribs (absent ribs, supernumerary ribs, fusions, and division), limbs, heart, kidneys, anorectal and tracheoesophageal fistula^{7,8}.

This study describes a patient diagnosed with SHS by cytomegalovirus (CMV) who presented with congenital skeletal abnormalities of the vertebrae, thumb hypoplasia, unilateral renal agenesis,

absence of microcephaly, and Fanconi face, characteristic of the disease. The chromosomal fragility test with mitomycin C (MMC) showed positivity, characterizing the diagnosis of Fanconi anemia associated with VACTERL.

REPORT

A 14-month-old male infant from Recife, Brazil was taken to the pediatric emergency room due to a cough associated with daily fever and hypoxia for 7 days; in the last 24 hours, he had three emetic episodes. On admission, the patient was afebrile, cyanotic, tachycardic, and tachydyspneic (respiratory rate 42 breaths per minute, saturation 96%). On respiratory auscultation, he had diffuse rales and expiratory wheezing. Laboratory tests showed: Hemoglobin: 11.7 g/dL; Hematocrit: 28.7%; White cell count: $26.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Segmented 82%; Eosinophils 0%; Basophils 0%; Lymphocytes 14%; Atypical lymphocytes 0%; Monocytes 3%); Platelets: $450 \times 10^3/\mu\text{L}$. Abdominal ultrasound revealed the absence of the left kidney and hepatosplenomegaly. Chest X-ray showed perihilar condensation on the right, the presence of a hemivertebra (D12), and scoliosis on the right. The patient was treated with cefepime but persisted with daily fever, there was diffuse exanthema and palpable lymph nodes in cervical and inguinal chains. CMV serology revealed positive IgM and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for CMV detected 4,960 viral copies. Other viral serologies and cultures for fungi and bacteria were negative. Laboratory tests showed ferritin 17.759 ng/mL, transaminases (AST 185 U/L and ALT 110 U/L), LDH 913 U/L and fibrinogen 494 mg/dL. The patient was diagnosed with cytomegalovirus (CMV) associated SHS and treated with ganciclovir and intravenous dexamethasone. Due to the associated bone deformities, he was transferred to the Pediatric Oncology Center for follow-up and investigation of chromosomal fragility syndrome which was confirmed by testing with MMC (Table 1 and Figure 1a), the conventional bone marrow cytogenetic study showed normal karyotype (46,XY) (Figure 1b). The patient was diagnosed with SHS secondary to CMV and FA. During outpatient follow-up, it was observed that the patient did not have a face typical of FA, had renal agenesis, a renal alteration rarely described in

FA, and other skeletal abnormalities, such as hemivertebrae, were not consistent with FA, thus the hypothesis of VACTERL association was considered, following the necessary criteria shown in table 2. The patient is being followed up as an outpatient with granulopenia and remains stable, with no need for therapy. However, the human leukocyte antigen (HLA) system of the patient and genitors was requested, as well as the registration in the REREME.

This study was submitted to the Research Ethics Committee with CAAE approval number 73905817.1.1001.5192.

DISCUSSION

Patients with FA have a high risk of infectious processes that is due to abnormalities of adhesion, migration, phagocytosis, recruitment, and mobilization of inflammatory monocytes⁹ especially if associated with granulopenia, caused by bone marrow failure. This case reports a patient with a CMV infectious process associated with HS confirmed through clinical and laboratory data who was successfully treated with ganciclovir and dexametasona. Due to the abnormality of the right thumb (Figure 1c), the patient was also investigated for chromosomal fragility testing by MMC and

confirmed as FA. However, the patient did not have the café-au-lait spots and Fanconi face that is characteristic of the disease; instead, he had mild to moderate macrocephaly (Figure 1d), hemivertebrae (Figure 1e), and scoliosis, both on the right, and renal agenesis, unusual findings in patients with FA.

FA is a rare autosomal recessive disease with heterogeneous manifestations. This diversity makes diagnosis difficult, due to the many differential diagnoses. The main features of FA are skeletal abnormalities (Table 1) that may occur in other frailty syndromes, such as Rothmund-Thompson syndrome and its variants¹⁰, but also other pathologies such as VACTERL or VACTERL-H association, a disease estimated in 1/40,000 live births¹¹.

The patient described in this paper evolved with granulopenia, and so far no pancytopenia, which is characteristic of the disease in a later stage (7-8 years), has appeared. This could be due to hemophagocytosis, but as it appeared months after the SHS, it made us assume that the granulopenia is a consequence of medullary hypoplasia due to the chromosomal instability syndrome and not the SHS. Besides presenting other symptoms of FA, such as thumb hypoplasia and chromosomal fragility test with a high number of breaks, and how, the patient had no microcephaly, typical triangular facies, and no skin pigmentation changes, frequent findings in FA. On the other hand, the patient had renal agenesis and other skeletal abnormalities such as hemivertebrae and marked scoliosis on the right and frequent changes in VACTERL association. The patient was diagnosed with VACTERL/FA association, which is described in 5% of these cases. Rothmund-Thompson syndrome and variants were ruled out since the patient had no skin alterations and had chromosomal fragility, findings not found in this pathology¹⁰.

Evidence for the link between FA and VACTERL was first demonstrated by Porteous et al.¹², by analyzing two unrelated male patients who had features of both diseases and had chromosomal breaks in the MMC test. In agreement with the finding of Porteous, Giampietro et al.¹³ demonstrated a high correlation between the presence of the VACTERL association and FA, by restudying 376 patients with FA, in which 37 (10%) presented at least three manifestations of VACTERL. After this finding, chromosomal fragility testing should always be performed in both VACTERL-H and VACTERL patients who present with radial and thumb changes, skin changes, growth retardation, microcephaly, and microphthalmia¹⁴.

Similar to the case described in this report, Botto et al.¹⁵ found that carriers of FA and VACTERL-H have a higher frequency of limb abnormalities (preferably in the radius and/or thumb) and vertebral abnormalities (e.g., scoliosis), and a few cases had anal atresia, and none with FA had a tracheoesophageal fistula. While, Alter e Rosenberg⁷ studied 2245 patients with FA and found that 118 had FA and VACTERL

association, 90% of these patients had renal defects and skeletal alterations of the limbs (mainly radius and fingers).

Thus, the patient in this report was diagnosed with FA/VACTERL association and is stable in outpatient follow-up. At the moment, he is suffering from mild granulopenia (1,400 granulocytes). Patients with FA/VACTERL have greater involvement of the *FANCD1* gene, as well as shorter survival and a higher and earlier incidence of cancer compared to FA patients⁷.

Since at least 5% of patients with FA can be classified as having the VACTERL association, it is up to the geneticist to observe these patients in childhood to consider the diagnosis of FA, through the chromosomal fragility test, consider genetic counseling for the family and refer them to the pediatric hematologist for follow-up. In this way, it will be possible to know the real incidence of this association.

REFERENCES

1. Zen PRG, Moraes FN, Rosa FRM, Graziadio C, Paskulin GA. Características clínicas de pacientes com anemia de Fanconi. *Rev Paul Pediatr.* 2011;29(3):392-9
2. Dufour C. How I manage patients with Fanconi anemia. *Br J Haematol.* 2017;178(1):32-47.
3. Schneider M, Chandler K, Tischkowitz M, Meyer S. Fanconianaemia: genetics, molecular biology, and cancer-implications for clinical management in children and adults. *Clin Genet.* 2014;88(1):13-24.
4. Soulier J. Fanconi anemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2
5. Deng W, Zhao M, Liu Y, Cao L, Yang M. Fanconi anemia in twins with neutropenia: a case report. *Oncol Lett.* 2018;16(4):5325-30.
6. Fiesco-Roa MO, Giri N, McReynolds LJ, Best AF, Alter BP. Genotype-phenotype associations in Fanconi anemia: a literature review. *Blood Rev.* 2019;37:100589.
7. Alter BP, Rosenberg PS. VACTERL-H Association and Fanconi anemia. *Mol Syndromol.* 2013;4(1-2):87-93.
8. Solomon BD, Baker LA, Bear KA, Cunningham BK, Giampietro PF, Hadigan C, et al. An Approach to the Identification of Anomalies and Etiologies in Neonates with Identified or Suspected VACTERL (Vertebral Defects, Anal Atresia, Tracheo-Esophageal Fistula with Esophageal Atresia, Cardiac Anomalies, Renal Anomalies, and Limb Anomalies) *Assoc J Pediatric.* 2014;164(1):451-7.
9. Liu Y, Ballman K, Li D, Khan S, Derr-Yellin E, Shou W, et al. Impaired function of Fanconi anemia type C-deficient macrophages. *J Leukoc Biol.* 2012;91(2):333-40.

10. Guerrero-González GA, Martínez-Cabriales SA, Hernández-Juárez AA, Lugo-Trampe JJ, Espinoza-González NA, Gómez-Flores M, et al. Rothmund-Thomson Syndrome: A 13-Year Follow-Up. *Case Rep Dermatol.* 2014;6(2):176-9.
11. Alter BP, Giri N. Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi anemia according to PHENOS. *Am J Med Genet.* 2016;170(6):1520-4.
12. Porteous ME, Cross I, Burn J. VACTERL with hydrocephalus: One end of the Fanconi anemia spectrum of anomalies? *Am J Med Genet.* 1992;43(6):1032-4.
13. Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics.* 1993;91(6):1116-20.
14. Faivre L, Portnoï MF, Pals G, Stoppa-Lyonnet D, Le Merrer M, Thauvin-Robinet C, et al. Should chromosome breakage studies be performed in patients with VACTERL association? *Am J Med Genet.* 2005;137A(1):55-8.
15. Botto LD, Khoury MJ, Mastroiacovo P, Castilla EE, Moore CA, Skjaerven R, et al. The spectrum of congenital anomalies of the VATER association: an international study. *Am J Med Genet.* 1997;71(1):8-15.

FIGURE

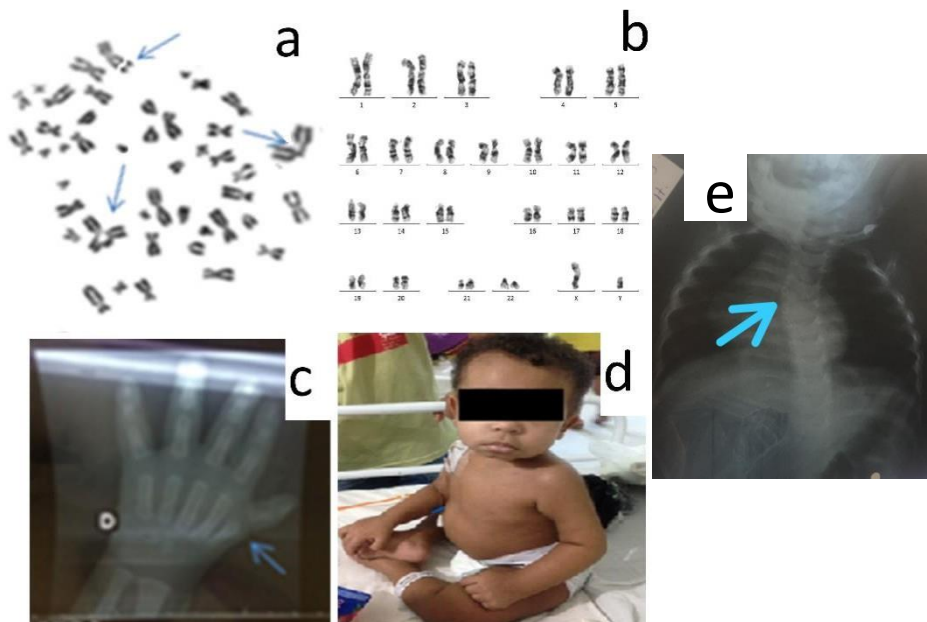


Figure 1: A) MMC test showing chromosomal variants (radial figures and chromosome breakage being pointed out) B) Bone marrow karyotype without abnormalities (46, XY) C) Clinical features of the patient: Macrocephaly and absence of Fanconi's face. D) X-ray of the right hand showing thumb hypoplasia. E) X-ray showing hemivertebra (D12)

TABLE**Table 1:** Result of chromosomal fragility test by MMC.

Culture	General Events	Analyzed events/cells	Anormal events/cells	Anormal cells (%)
Without MMC	4	0.08	1.3	6%
With MMC	48	0.96	1.3	66%

Table 2: Clinical manifestations described in concomitant FA and VACTERL.

Symptoms	%	Patient
VACTERL		
Vertebral anomalies/ribs	60-95%	Present
Hemivertebrae	(80%)	Present
Anal atresia	55-90%	Absent
Tracheoesophageal Fistula	50-80%	Absent
Cardiac alterations	40-80%	Absent
Renal alterations	50-80%	Present
Renal Agenesis	(61%)	Present
Limb skeletal abnormality	40-50%	Present
FANCONI ANEMIA		
Thumb abnormality	35%	Present
Vertebral Anomalies	2%	Present
Flappy Ears	10%	Absent
Cardiac Alterations	6%	Absent
Renal alterations	20%	Present
Renal Agenesis	(5%)	Present
Café au lait stains	40%	Absent
Hematological alterations	90%	Present

3.2 ARTIGO II

CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF MITOMYCIN C CYTOGENETIC TEST IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL

M.D. Maria Luiza Rocha da Rosa Borges ^{1,2}, João Lucas Cruz Souza ²,
Luiz Henrique Rodrigues ², M.D. Maria Teresa Marquim Nogueira Cornélio
², Ana Cláudia dos Anjos ³, Ph.D. Neide Santos ¹, Ph.D. Terezinha de Jesus
Marques Salles ^{2*}

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife,
Pernambuco, Brazil.

² Centro de OncoHematologia Pediátrica, Hospital Universitário
Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brazil.

³ Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

Short title: Profile of Fanconi Anemia in Pernambuco

*Corresponding author: Terezinha de Jesus Marques Salles, Centro de
OncoHematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Rua
Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:
50.100-130. e-mail:terezinha.jms20@gmail.com

**ARTIGO ACEITO NO PERIODICO HEMATOLOGY, TRANSFUSION
AND CELL THERAPY - F.I = 1,5 ; QUALIS B4 (Anexo D)**

Abstract

Background: Fanconi anemia (FA) is a rare autosomal recessive disease characterized by chromosomal instability and increased predisposition to malignancy. The diagnosis of FA requires clinical evaluation, confirmation of chromosomal fragility, and/or analysis of genetic mutations. Therefore, this study aims to identify the clinical profile of patients with FA in the state of Pernambuco, Brazil.

Method: We analyzed 80 individuals referred from the major hematology and bone marrow (BM) transplant centers in the state of Pernambuco, Brazil, between the years 2018 and 2020. The diagnosis of FA was performed using the mitomycin C chromosomal fragility test, clinical data, and classical and molecular cytogenetic analyses.

Results: This study was carried out with 16 patients. Most of these individuals (87.5%) came from the Agreste and Sertão regions of Pernambuco. We observed a slight female prevalence of FA (1.3:1). The primary clinical and laboratory findings were café au lait spots (62.5%) and bone abnormalities (53%, mainly thumb deformities [40%]). We performed BM cytogenetic analysis for eight patients – seven showed no chromosomal abnormalities, and one was karyotype 47,XY,+21[15].

Conclusions: Our results are important to promote public health measures for the early diagnosis of FA, as well as to foster the engagement of a multidisciplinary group in the treatment of this disease.

Keywords: Fanconi Anemia, MMC test, Cytogenetic

Introduction

Fanconi anemia (FA) is a rare autosomal recessive disease characterized by chromosomal instability. The classic clinical profile of this disease is highly variable: 90% of patients have hematological abnormalities; 75% have physical and/or skeletal deformities; 60% have delayed physical development; 25% have Fanconi-like facies; 40% have café au lait spots; 35% have thumb abnormalities (Mehta and Jakub, 2018).

The etiopathogenesis of FA is related to a mutation in 22 genes in charge of DNA repair, as well as 13 genes in charge of ribosome biogenesis (Gueiderikh et al., 2022). The diagnosis of FA is based on clinical and molecular aspects, as well as chromosomal break hypersensitivity testing to alkylating agents such as diepoxybutane (DEB) and mitomycin C (MMC) (Auerbach, 1993). Because of the consequences of spinal cord failure and the increased predisposition to malignancy, early identification of these individuals is essential for their appropriate clinical management.

The median survival of patients with FA in the USA was 19 years between 1981 and 1990. However, with early diagnosis and the introduction of new treatment modalities, survival from 1991 to 2006 increased to 30 years (Taniguchi and D'andrea, 2006). There is no data regarding patient survival in Brazil, but Bonfin et al. (2022) reported an adapted protocol for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This protocol was associated with overall 5-year survival of 83%, good engraftment, and a low incidence of acute graft-versus-host disease at 100th-day post-transplantation.

Patients with FA have a 500-fold increased risk of developing myelodysplastic syndrome (MDS) and/or acute myeloid leukemia (AML) (Tamary et al., 2010). About 80% of patients evolve to MDS and/or AML, and the main indicators of this evolution are chromosomal alterations in

bone marrow (BM) such as -7/del (7q), abnormalities in 3q and 11q, and complex karyotypes (Mehta et al., 2010).

About 1:181 Americans and 1:93 Israelis are affected by FA (Rosenberg et al., 2011). Although FA can affect all races, it is rare in African descendants (1:476.000) (Castella et al., 2011). In Brazil, two important groups in the states of São Paulo (Caputo, 2002; Rodriguez et al., 2005) and Paraná (Veiga, 2009), Brazil, registered 148 and 52 patients with chromosomal breakage, respectively. Two other studies were conducted – one described the clinical profile of 17 patients with FA (Zen et al. 2011), and another that identified mutations in the FANCA, FANCC, and FANCG genes in 255 patients, of whom 68 were from the Northeast region of Brazil (Pilonetto et al., 2017).

The implementation of MMC chromosomal fragility test has supplied the Northeast region of Brazil with an early and rapid diagnosis of FA cases, providing a targeted follow-up and increasing the patient's quality of life. However, there are no studies in loco with epidemiological data, forms of clinical presentation, and cytogenetic profile of FA for this region. Therefore, conducting research on the FA and implementing the MMC chromosomal fragility test in patients of the Unified Health System (Sistema Único de Saúde [SUS]) in Pernambuco is relevant for Brazil, mainly for the Northeast region. Further, it can provide specific regional information concerning the clinical, laboratory, and cytogenetic characteristics of patients with FA.

Material and method

Patient and sample

A prospective study was conducted between the years 2018 and 2020 to investigate the clinical profile of FA. Sixteen individuals (seven males and nine females) participated in this study. These patients were admitted to the outpatient clinic of the Centro de OncoHematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz for evaluation of clinical and family history, physical examination, and laboratory tests. The individuals included were referred from the Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Instituto do Câncer do Agreste, Instituto de Medicina

Integral Professor Fernando Figueira, and Hospital Português – Centro de Transplante de Medula Óssea. Only patients with at least two of the following symptoms were included in the study: hypoplastic or aplastic BM, skeletal abnormalities, café au lait spots, and pancytopenia with an increase in mean corpuscular volume or fetal hemoglobin.

The study protocol was approved by the local research ethics committee (approval number 73905817.1.1001.5192). The guardians of the children were informed about the tests to be performed and authorized participation, as well as the disclosure of findings by signing the informed consent form. Data collection began after the approval of the study.

Mitomycin C chromosomal fragility test

The test protocol was adapted from Oostra et al. (2012). Each patient had 5mL of peripheral venous blood collected in a heparinized syringe. Lymphocyte culture was performed according to the standard PVB culture protocol (Bain, 1996) with the addition of MMC at a concentration of 150 nM at the time of culture medium preparation. A total of 20 μ L of 10^{-3} colcemid (Sigma) were added after 70 hours-culture in a CO₂ incubator. The material was centrifuged and hypotonic shocked with potassium chloride for 15 minutes at 37 °C in a water bath after 72 hours, and then fixed with methanol and acetic acid (3:1). The slides were made and stained with Giemsa (Merck) at 5% for 8 minutes. Twenty-five metaphases from each individual were evaluated, and chromosomal variants such as breaks, fragments, ring chromosomes, radial figures, and rearrangements were analyzed.

A score was assigned for each chromosomal variant in the following way: for each break and fragment, one point; for each ring and radial figure chromosome, two points; for each chromosome involved in the rearrangement, one point. The total points were added up to produce a final score, and patients were classified as suggestive (>40%) or not suggestive of FA (<20%) based on the score, as shown in Table 1.

Bone marrow cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis of BM was performed using 24-hour cultures according to standard protocols (Testa et al. 1995). At least 20 metaphases in each case were analyzed by G-banded according to Seabright (1971) and characterized in compliance with the International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2020).

The cytogenetic analysis could not be performed in all individuals because we did not have medical approval to perform the BM aspiration. Patients undergoing cytogenetic analysis are followed up every six months for medical evaluation.

Fluorescence in situ hybridization

Fluorescent probes were used for the molecular cytogenetic technique, as per Liehr (2017) and the manufacturer's instructions. Analyses were performed in metaphase and or interphase cells using the centromeric probe of cytosolic chromosome 21.

Results

In the present study, 80 individuals were referred for investigation of FA. Among those with a negative test, one patient was diagnosed with TAR syndrome and another with Pearson syndrome. A third patient, who had skeletal abnormalities of the thumb, renal agenesis, hemivertebrae, and a positive MMC chromosomal fragility test, had a final diagnosis of VACTERL/FA association (FA3). The remaining 16 individuals were diagnosed as FA through the MMC chromosomal fragility test, as shown in Table 2. One patient (FA16) presented as a mosaic for FA.

The mean age at diagnosis was 8.5 years (average between symptoms started and diagnosis was 6 months), with a slight female prevalence of FA (56.25%). About 87.5% of patients were from the Agreste and Sertão of the state of Pernambuco, and 62.5% were born to consanguineous parents.

The clinical and laboratory profiles of FA (Table 3) showed that most patients had hematological alterations (80%), particularly medullary failure (87.5%). The hypoplasia of BM was seen in 92.86% and aplasia in 7.14%. Café au lait spots occurred in 62.5% of cases, and 53% of patients had skeletal changes, especially thumb hypoplasia (40%) (Figure 1). Fewer patients had short stature, protruding ears, microcephaly, heart disease, and unilateral renal agenesis.

Cytogenetic studies of BM were performed on 8 of 16 patients. Seven individuals had normal karyotype and one (FA11) had karyotype 46,XY[5]/47,XY,+21[15] (Figure 2). This patient had a phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood lymphocyte culture with normal karyotype (46.XY[5]). The main criteria described for the indication for HSCT include unfavorable cytogenetic changes such as gain or loss of 1q, 3q, and 11q, -7, del7q and +8 and worsening of pancytopenia with the need for transfusions or antibiotic therapy (Bonfim et al., 2022). Thus, at the moment, the remaining patients still did not present criteria for HSCT indication and are in outpatient follow-up.

One patient died of sepsis (FA12) throughout the present study, and two others (FA2 and FA7) are alive after HSCT. The remaining individuals were treated with Danazol, but to date, there has been no complete recovery from the hypoplasia of BM. Furthermore, these patients had side effects such as virilization, hypertrichosis, and incomplete response.

Discussion

The FA is a rare and poorly studied disease in Brazil, and studies involving a clinical approach and cytogenetic and molecular profiles of this disease in the Northeast region are even more scarce. Most of the patients analyzed in previous studies were from the South (state of Paraná) and Southeast (state of São Paulo) regions of Brazil.

Sixteen individuals were diagnosed with FA in the state of Pernambuco over four years – meaning 4.5 cases/year, with a mean age at diagnosis of 8.5 years. From 1995 to 2012, Piloneto et al. (2017) studied 68

cases of FA in the Northeast region of Brazil and observed a rate of 3.4 cases/year. This underreporting observed may be explained by the difficulty of sending samples for MMC chromosomal fragility testing to the South region of Brazil because this test was not available in the Northeast region.

A difference in the age range at diagnosis was observed when comparing our results with the findings of Shimamura and Alter (2010). These authors described that the mean age at diagnosis of FA was 6.5 years, whereas our study showed a mean age of 8 years (minimum of 2 years, maximum of 34 years). This demonstrates a deficit in the early diagnosis of the disease. However, when compared with a previous study in which the mean age was 13 years, it was possible to observe a decrease of 5 years in diagnosis with the start of the MMC chromosomal fragility test in Pernambuco, which provided the patient with better follow-up, treatment, and survival time (personal communication).

There is no consensus with regard to the prevalence of FA between the sexes. Some authors stress that there is an equal distribution (Nowzari et al., 2001; Kutler et al., 2003), whereas others found a higher male prevalence (Sagaseta de Ilurdoz, 2003; Alter, 2005; Mehta and Jakub, 2018). The present study demonstrated a discrete female prevalence of the FA (1:1.3) in the state of Pernambuco, Brazil.

Among the 16 patients with a confirmed diagnosis of FA, 62.5% were born of consanguineous marriages. This demonstrates that consanguinity is a relevant factor for the predisposition of the disease, as well as increases the prevalence of FA in the overall population (Kutler et al., 2003). The high level of consanguinity observed in our state is probably related to the region of origin of these patients because 87.5% of them come from the Agreste and Sertão regions.

The clinical profile of FA identified in the current research was the same as that reported by Santos (2017). According to Santos, approximately 75% of patients with AF present with the principal clinic symptoms pigmentation and café au lait spots on the skin, described in more than 50% of patients, short stature in about 50%, and skeletal anomalies in 30%. Zen et al. (2011) also reported thumb alterations (60%) and café au lait spots

(43%) as the primary alterations, besides renal agenesis. This study reported all these clinical presentations for one patient.

Acquired chromosomal changes are frequent findings in BM karyotypes of patients with FA undergoing clonal evolution to MDS or AML. Rosa Borges et al. (2017) reported four patients with FA undergoing transformation to MDS (three cases) and AML (one case) who showed chromosomal changes in the BM – one recurrent and others as new translocations. Acquired chromosomal changes are the main indication for BM transplantation, and the main changes described are losses and gains in the 1q, 3q, and 11q regions, as well as -7 and +8 (Cioc et al., 2010). However, in this study, only one patient (FA11) showed acquired trisomy 21, which may indicate clonal evolution. Unlike de novo acute leukemias, alterations involving chromosome 21 have been poorly described for FA.

Ayas and Walter (2008) described a case of FA with a complex karyotype in which $\text{dup}(21)(q22) \times 2, +\text{add}(21)(q22)$ was observed. In this duplicated region, the AML1 gene (RUNX1) is present, which is correlated with myeloid neoplasms, suggesting an important role of this gene in characterizing disease progression. Another case of FA with monosomy 21, $(21q22.1-q22.1)$ was reported by Byrd et al. (2011), resulting in monosomy of the RUNX1 gene that is directly related to thrombocytopenia and defect in platelet functionality (Beri-Dexheimer, 2008). Additionally, four other cases of chromosomal alteration involving chromosome 21 in patients with FA have been described by Quentin et al. (2011) – two cases involved in complex

k

aryotypes

46,XX,der(1)t(1;21)(p36;q22).ish(RUNX1+,PRDM16+),der(2)t(2;3)(q37q21),der(16)t(

1;16)(q21;q12)[20] and 46,XY,add(21)(q21)[1] /46,XY,der(7)t(7;21)(q32;q22)[3]; one

case with a deletion 46,XX,del(21)(q22.12); one case with a duplication 46,XX, dup(21)(q22.12-q22.3). All four patients progressed to MDS or AML,

confirming the important role of chromosome 21, particularly the RUNX1 gene (21q.22), in the etiopathogenesis of progression to acute leukemia.

In the present study, patient FA11 with trisomy 21 did not have Down syndrome (stimulated peripheral blood karyotype did not detect +21). The occurrence of acquired trisomy 21 led to overexpression of the RUNX1 oncogene in this patient and possibly a stage of clonal evolution to MDS and or AML. The clinical phenotype of patients with

FA is highly heterogeneous, which makes diagnosis difficult because they present symptoms common to several other pathologies such as VATER/VACTERL, Nejmegen syndrome, Seckel syndrome, thrombocytopenia syndrome, TAR syndrome, Diamond-Blackfan anemia, Pearson syndrome, Bloom syndrome, and ataxia-telangiectasia syndrome (Tischkowitz and Hodgson, 2003). Syndromes such as Nejmegen, Seckel, and Bloom may have chromosomal breaks by DEB and MMC in smaller numbers than in FA cases and may be confused with heterozygous patients. For these cases, the search for a specific genetic mutation is mandatory for an accurate diagnosis (Mehta and Jakub, 2018). Therefore, patients with chromosomal fragility tests non-compatible with FA but who have low fragility index and signs suggestive of other pathologies should always perform differential diagnosis with another chromosomal fragility disease.

Our results have relevance for *Sistema Único de Saúde (SUS)* and help in the early recognition of FA. Therefore, we hope that this study encourages public health measures aimed at early diagnosis, and improving the care and treatment of patients and their families. We highlight the importance of monitoring BM by cytogenetic studies in these patients, aiming at the early identification of possible signs of worsening or disease progression to MDS or AML. The HSCT is an important therapeutic modality for patients with these disease progressions.

Acknowledgments

The authors thank the patients, families, and doctors for the data. We are also grateful for the partial support supplied by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for this study – Finance Code 001.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Alter, BP. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. *Pediatr Transplant*. 2005; 7:81-86.

Auerbach, AD. Fanconi Anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp. Hematol*. 1993; 21(6):731-733.

Ayas M, Walter C. Fanconi Anemia patient with AML1 gene amplification and monosomy 7 in pre-transplant myelodysplasia (MDS) relapsing 7 years after successful allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 42(8): 555–557.

Bain, S.M. Human chromosomes: Manual of basic techniques (2nd edition). *Chromosome Res*. 1996; 4: 80–81

Béri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, et al. Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet*. 2008; 16: 1014–1018.

Bonfim C, Nichele S, Loth G, Funke VAM, Nabhan SK, Pilonetto DV, Lima ACM, Pasquini R. Transplantation for Fanconi anaemia: lessons learned from

Brazil.

Lancet Haematol. 2022; 9(3): e228-e236

Borges MLRR, Matos RR, Amaral BD, et al. Molecular Cytogenetic Approach to Characterize Novel and Cryptic Chromosome Abnormalities in Childhood Myeloid Malignances of Fanconi Anemia. JPediatric Hematol/Oncol. 2017; 39(2): e85-e91.

Byrd RS, Zwerdling T, Moghaddam B, et al. Monosomy 21q22.11-q22.13 presenting as a Fanconi anemia phenotype. Am J Med Genet. 2011; 155(1): 120–125.

Caputo LZ. Implantação da técnica de quebras cromossômicas com Diepoxibutano (DEB) em laboratório de citogenética: um estudo de 148 casos [thesis]. São paulo: Universidade de São Paulo;2002.111p.

Castella M, Pujol R, Callén E, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. J Med Genet. 2011; 48(4): 242- 250.

Cioc AM, Wagner JE, MacMillan ML, et al. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. Am J Clinical Pathol. 2010; 133(1): 92–100.

Gueiderikh A, Maczkowiak-Chartois F, Rosselli F. A new frontier in Fanconi anemia: From DNA repair to ribosome biogenesis. Blood Rev. 2022; 52: 100904.

Hannah Tamary, Daniella Nishri, Joanne Yacobovich, et al. Frequency and natural history of inherited bone marrow failure syndromes: the Israeli Inherited Bone Marrow Failure Registry. Haematologica. 2010; 95(8): 1300-

1307.

ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020) Reprint of: Cytogenetic and Genome Research (2020) Vol. 149, No. 1–2 1st Edition. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (Editors). Karger, Basel, 170pp.

Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003; 101(4): 1249-1256.

Liehr T. Fluorescence in situ Hybridization (FISH) Application Guide. 2ed. Berlin: Springer, 2016; 1: 429-444

Mehta PA, Jakub T. Fanconi anemia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al. (eds). *Gene Reviews*. 2018. University of Washington: Seattle, WA.

Mehta PA., Richard E. Harris, Stella M, et al. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 203(2): 180-186.

Nowzari H, Jorgensen MG, Contreras A, et al. Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. *J Periodontol*. 2001; 72(11): 1601-1606.

Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia*. 2012; 2012:238731.

Pilonetto DV, Pereira NF, Bonfim CMS, et al. A strategy for molecular

diagnostics of Fanconi anemia in Brazilian patients. *Mol Genet Genomic Med*. 2017; 5(4): 360–372.

Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R, et al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 2011; 117(15): e161–e170.

Rodriguez DEA, Lima CSP, Lourenço GJ, et al. Molecular analysis of the most prevalent mutations of the FANCA and FANCC genes in Brazilian patients with Fanconi anaemia. *Genet Mol Biol*. 2005; 28(2): 205-209.

Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet*. 2011; 155(8): 1877–1883.

Sagaseta de Ilurdoz M. Updating Fanconi's anaemia. *An Sist Sanit Navar*. 2003; 26(1):63-78.

Santos PAD. Síndromes de falência medular congênitas: da fisiopatologia à clínica [thesis]. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2017.61p.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971; 30(7731): 971-2.

Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev*. 2010; 24(3): 101–122.

Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood*. 2006; 107(11): 4223-33.

Testa JR; Misawa S, OGREMA N, et al. Chromosomal alterations in acute leukemia patients. Studies with improved culture methods. Cancer research. 1985; 45: 430-434

Tischkowitz MD and Hodgson SV. Fanconi anaemia. J Med Genet. 2003; 40(1): 1-10.

Veiga LBA. Anemia de Fanconi: Análise citogenética [thesis]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2009. 147p.

Zen PRG, Moraes FN, Rosa RFB, et al. Clinical characteristics of patients with Fanconianemia. Rev Paul Pediatr. 2011; 29(3): 392-9.

FIGURES

Figure 1.

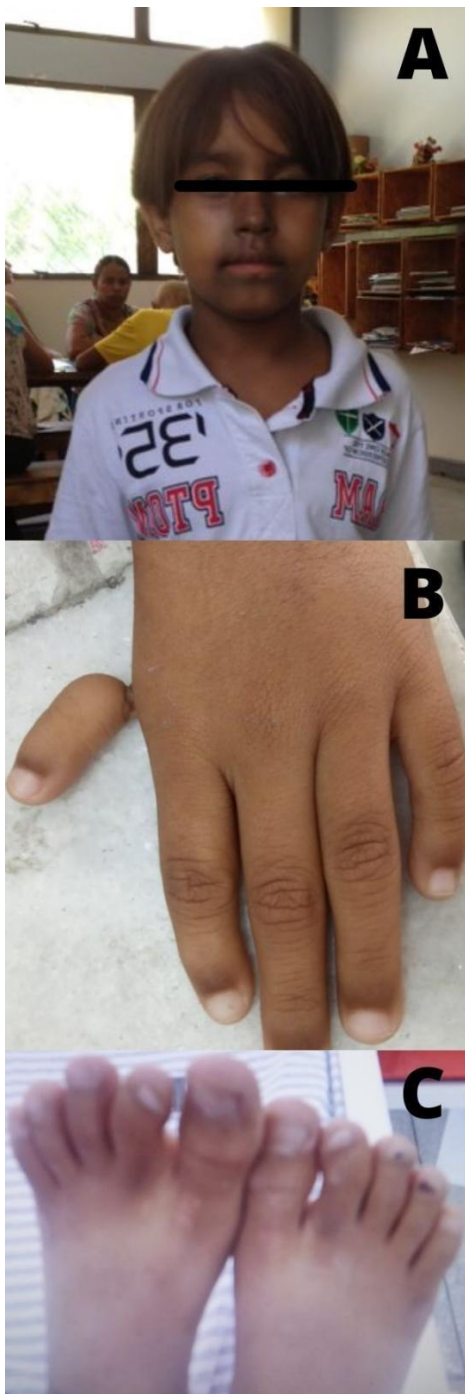
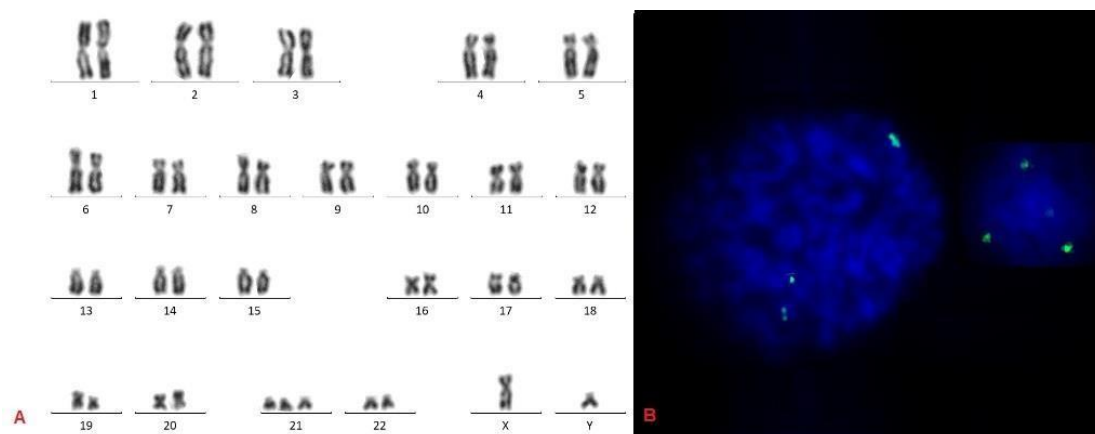


Figure 2.



LEGENDS

FIGURE

Figure 1- Presentation of the clinical symptoms of FA. a) Hyperpigmentation on the face; b) Hypoplasia of the thumb; c) skeletal malformation in the feet.

Figure 2.- Cytogenetic data of patient FA11. a) Karyotype showing 47,XY,+ 21 b) FISH showing +21.

TABLES

Table 1. Standard values of the
MMC test

AF	General Events	Events/cell	Number of cell affected
Negative	≤ 9	$\leq 0,39$	$\leq 20\%$
Mosaic	10 - 14.	0,40 - 0,79	20% - 40%
Positive	> 14	$\geq 0,80$	$> 40\%$

Table 2. Results of the fragility test
by MMC

Cases	General Events	Events/Analyzed cells	Events/Affected cells	Affected cells (%)
FA1	31	1.24	2.38	52%
FA2	62	2.48	3.1	80%
FA3	21	0.86	1.3	66%
FA4	58	5.8	5.8	100%
FA5	32	1.28	2.13	60%
FA6	34	1.36	1.88	72%
FA7	27	1.08	1.8	60%
FA8	65	5.41	6.5	84%
FA9	22	0.88	1.83	48%
FA10	16	1.3	2	67%
FA11	100	5.3	5.5	95%
FA12	20	0.8	1.8	44%
FA13	86	6.61	6.61	100%
FA14	15	0.8	1.5	55%
FA15	15	0.8	1.6	46%
Mosaic				
FA16	10	0,4	1,66	24%

Table 3. Clinical and demographic data of patients with FA

Cases	Sex	Age(years)	CG	Origin	Clinical Symptoms	BM	karyotype	Status
FA1	M	7	Yes	Pesqueira – PE	Café au lait spots, hematological, protruding ear	Hypoplasia	46,XY[20]	Alive
FA2	M	4	Yes	Paranatama – PE	Café au lait spots, skeletal and hematological alteration	Hypoplasia	46,XY[20]	Alive
FA3	M	3	No	Recife – PE	Short stature, Café au lait spots, renal agenesis, skeletal alteration, protruding ear	Normal	46,XY[20]	Alive
FA4	F	9	Yes	Bom Conselho- PE	Café au lait spots and hematological alteration	Aplasia	-	Alive
FA5	M	10	Yes	Pesqueira – PE	Café au lait spots, skeletal and hematological alteration, protruding ear	Hypoplasia	46,XY[20]	Alive
FA6	F	14	No	Xexéu – PE	Hematological alteration, ectopic and horseshoe kidneys	Hypoplasia	-	Alive
FA7	F	7	No	Sairé -PE	Café au lait spots, short stature and protruding ears	Hypoplasia	46,XX[20]	Alive
FA8	F	34	Yes	Betânia-PE	Thumb e hematological alteration	Hypoplasia	46,XX[20]	Alive
FA9	M	12	Yes	Ouricuri – PE	Café au lait spots and hematological alteration	Hypoplasia	-	Alive
FA10	F	17	Yes	Ouricuri – PE	Café au lait spots and skeletal alteration	Hypoplasia	-	Alive
FA11	M	6	Yes	Peixinhos-PE	Short stature, protruding ears, skeletal and hematological alteration	Hypoplasia	47,XY,+21[15]	Alive
FA12	M	16	No	Gravatá-PE	Hematological alteration hepatosplenomegaly	Hypoplasia	46,XY[20]	Death (19 years)
FA13	F	6	No	IATI-PE	Hematological alteration and microcephaly	Hypoplasia	-	Alive
FA14	F	2	Yes	Floresta-PE	Café au lait spots, hematological and skeletal disorders	Hypoplasia	-	Alive
FA15	F	8	No	Recife-PE	Hematological alteration, heart disease	Hypoplasia	-	Alive
FA16	F	8	Yes	Pesqueira- PE	Café au lait spots and protruding ear	Normal	-	Alive

CG: Consanguineous marriage; BM: Bone marrow; M: Male; F: Female.

3.3 ARTIGO III

FANCONI ANEMIA PATIENTS FROM PERNAMBUCO, BRAZIL: A NEW FOUNDER PATHOGENIC VARIANT IN FANCA

Maria Luiza Rocha da Rosa Borges¹, Terezinha de Jesus Marques Salles², Juan Llerena Junior³, Fabio Miyajima⁴, Neide Santos¹.

¹ *Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE/Brazil*

² *Centro Especializado em Oncohematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife-PE/Brazil.*

³ *Centro de Genética Médica & Centro de Doenças Raras, Instituto Nacional Fernandes Figueira, Fiocruz-RJ, RJ/Brazil.*

⁴ *Rede Genômica, Fundação Oswaldo Cruz, Ceará/Brazil*

Short title: NOVEL MUTATIONS IN FANCONI ANEMIA BRAZILIAN PATIENTS

Autor correspondente: Maria Luiza Rocha da Rosa Borges, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, PE, Brazil. E-mail: marialuiza.rosaborges@hotmail.com

Acknowledgments

We thank Dr. Sayoana Gonzalez and Isabelle de Oliveira Moraes and the entire team from the Laboratory of Genomic Medicine - Instituto Nacional Fernandes Figueira - Fiocruz-RJ for their partnership in carrying out the genetic analyses.

The present work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001

MANUSCRITO SUBMETIDO NA REVISTA MOLECULAR BIOLOGY REPORTS
FATOR DE IMPACTO: 2.7 ; QUALIS 2016 : B2.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare disease with a heterogeneous genetic basis and its etiopathogenesis is related to mutations in 22 genes involved the DNA repair mechanism. The symptoms of FA include café au lait spots, skeletal changes, deafness, hematological changes and bone marrow hypoplasia. Six patients with diagnosis of FA were analyzed by next-generation sequencing (Nextseq 500) using a clinical panel of FA genes. In the analysis six mutation were found, four in the *FANCA* gene (c.3788_3790delTCT; c.2535_2536delCT; c.1475A>G and c.4011-2A>C) and two in *FANCG* gene (c.1077-2A>G and c.908T>C). This is the first report of the c.4011-2A>C variant in *FANCA* which is a splicing acceptor mutation. Mutations in the canonical splicing sequences usually lead to a single exon skipping, in which case several distinct transcripts can be generated, resulting in mRNA isoforms that can result in a truncated or non-functional protein product. The c.1475A>G variant had only been reported once in Brazilian patients. The c.908T>C variant in *FANCG*, on the other hand, had never been reported in Brazilian patients. The molecular study of FA patients is extremely important to better elucidate the etiopathogenesis of the disease helping directly in the creation of new therapeutic methods

Key words: Fanconi anemia, FANCA, Pathogenic variant

Introduction

Fanconi anemia (FA) is a genetically based disease arising from mutations in genes involved in the DNA repair mechanism. This failure in the repair system leads to spontaneous chromosomal fragility, which is the main characteristic used for diagnosis. The gold standard for the diagnosis of the disease is the chromosomal fragility test, where DNA damage is induced through exposure to alkylating agents such as Diepoxybutane (DEB) and Mitomycin C (MMC), thus causing an increase in the chromosomal fragility present in patients with FA [1].

The main clinical laboratory symptoms in FA are short stature, presence of café au lait spots, protruding ears, skeletal changes, renal agenesis, deafness, cytopenia(s) and macrocytosis in peripheral blood, bone marrow hypoplasia, high HbF [2]. The characteristics in FA are very heterogeneous and often common to several other diseases, making the clinical characterization of patients often difficult to perform. The differential diagnosis with diseases that course with skeletal malformations or even the concomitance of the two pathologies such as VACTERL-H should always be performed [3].

The pathogenesis of FA is related to the abnormality of at least one of the 22 *FANC*'s genes (*FANCA-FANCV*), whose protein products play an important role in maintaining the integrity of the genome through DNA repair in cases of mutations. FA can be caused by biallelic mutations in genes, heterozygosity in the *FANCB* gene or by dominant negative mutation in the *RAD51* gene [4]. The genetic heterogeneity associated with FA makes molecular diagnosis laborious and costly in addition to the high number of associated genes, many unique disease-causing mutations have been reported in all FA genes [5].

Population studies with FA are still scarce in Brazil. To date, we do not have an epidemiological data on the disease in the country. The most recent study by Pilonetto *et al.* (2017)^[6] carried out mutation research in the *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* genes in 255 patients, 68 out of them from the Northeast, where 22 new mutations were identified. In the Northeast, bone marrow cytogenetic follow-up studies to assess disease evolution have revealed new disease-associated chromosomal alterations [7].

Materials and methods

This study was carried out with six pediatric patients (0 - 18 years old) diagnosed with Fanconi Anemia treated at the pediatric oncohematology outpatient clinic of the

Oswaldo Cruz University Hospital (HUOC), Recife/Pernambuco. For mutation analysis, state-of-the-art sequencing with expanded capture Trusight One (Illumina) was performed on the Nextseq 500 equipment with base space analysis method and variant interpreter (Illumina) using GRCh37 /hg19 as the reference genome with a clinical panel. containing the 33 genes: ATM, ATR, BLM, BRCA1, BRCA2, BRP1, CENPJ, CEP152, CEP63, COX4I1, DNA2, ERCC4, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, NBN , NF1, NIN, PALB2, RAD51, RAD51C, RBBP8, RBM8A, SLX4, UBE2T, XRCC2.

Results were searched and compared in the following public consultation databases: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>, The Genome Aggregation Database (gnomAD), <https://gnomad.broadinstitute.org>, Brazilian Online Mutation Archive (ABraOM), <https://abraom.ib.usp.br/>, Recommendations from the Human Genome Variation Society (HGVS), <https://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html>, and Public archive of interpretations of clinically relevant variants (ClinVar), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

Results and discussion

In this study, six pediatric patients with FA were analyzed based on clinical characteristics and by the MMC chromosomal fragility test. Ages ranged between 8 and 16 years (mean 10.8 years), three were male and three were female. Five (83.3%) were children of consanguineous marriages and all came from the state of Pernambuco, three of them (50%) came from the agreste region, two (33.4%) from the sertão and one (16.6%) from the metropolitan region of Recife.

Of the six patients studied, four of them had mutations in the *FANCA* gene, and two had mutations in the *FANCG* gene. In *FANCA* two homozygous mutations, c.2535_2536delCT and c.3788_3790delTCT, and two heterozygous mutations, c.4011-2A>C and c.1475A>G. In *FANCG*, one in homozygosity, c.1077-2A>G, and two in heterozygosity, c.1077-2A>G and c.908T>C. The classifications of these variants followed the recommendations of the American College of Medical Genetics-ACMG ^[8] and are shown in table 1.

Of the total number of variants found, we highlight three rare mutations found in FA patients from Pernambuco (Northeast Brazil). A mutation in the *FANCA* gene in intronic

region 40 (c.4011-2A>C) not yet described in the literature, another mutation in the *FANCG* gene exon 07 (c.908T>C) never described in Brazilian patients, and a rare mutation in *FANCG* exon 16 (c.1475A>G) described in only one Brazilian patient to date [9].

Mutation analysis studies in populations with FA show that about 90% of patients have a higher frequency of mutations in the *FANCA* (65%), *FANCC* (15%) and *FANCG* (10%) genes, respectively [10]. However, in the study carried out by Pillioneto *et al.* (2017)^[6] showed that in Brazil the frequency of mutations in *FANCG* (23%) is higher than *FANCC*. In this study, the patients analyzed presented mutations in *FANCA* and *FANCG*, corroborating the literature.

FANCA is the gene with the highest frequency of mutations reported in patients with FA. In this study, four patients (66.6%) had *FANCA* mutations (c.3788_3790delTCT; c.2535_2536delCT; c.1475A>G and c.4011-2A>C). Of these, two (33.3%) had the c.3788_3790delTCT variant in homozygosity. It is estimated that in the European population about 25% of patients with FA have this mutation [9]. However, according to studies carried out by Levran *et al.* (2005)^[11] and Pillioneto *et al.* (2017)^[6] this frequency is even higher in the Brazilian population, being present in about 30% of Brazilian patients with FA and having its highest incidence in the southern region of the country, which can be explained by the higher incidence of European descent in this region.

The second variant found in this study was c.2535_2536delCT which is described in less than 0.001% of patients with FA, thus being considered a very rare mutation as reported by Pillioneto *et al.* (2017)^[6], in Brazilian patients from the Northeast region. The third variant found in this study was c.1475A>G which is considered to be extremely rare which still does not have an allele frequency in population databases for public consultation (gnomAD, AbraOM). The first report was made by Levran *et al.* (1997)^[9] being classified as a pathogenic genetic variant. This is the second report of this variant in a Brazilian patient and the first report of this mutation in a patient from the Northeast region of Brazil. The fourth variant observed was c.4011-2A>C located in a canonical splicing acceptor site which has not yet been identified in population studies according to public consultation databases (gnomAD, AbraOM). It was also not described in the literature or placed in the clinically relevant variants database (Clinvar). However the variant was classified as pathogenic according to the recommendations of the American College of Medical Genetics-ACMG (Table 2).

Mutations in acceptor splicing sites (ASS) can lead to a change in the open reading

frame which can lead to a decrease in the level of specific messenger RNA and thus a deprivation of the protein level that can result in aberrant and / or nonfunctional cellular metabolism [12]. Mutations in the canonical splicing sequences usually lead to a single exon skipping, in this situation, several distinct transcripts can be generated, resulting in mRNA isoforms.

A meta-analysis study on splicing mutations (478 mutations in 38 selected genes) indicated that donor splicing site mutations were more prevalent than splicing acceptor site variants (ratio 1.5:1) [13]. Therefore, the new reported variant (c.4011-2A>C/ref. GRCh38/Hg38: chr16:89,739,291 T>G) is located in an ASS site on the border between intron 40 and exon 41, causing an alteration crucial part of ASS, a highly conserved region, in which the typical sequence “AG” is changed to “CG”, thus likely obliterating splicing and causing exon 41 not to be transcribed and then translated. In addition to obliterating intron 40 - exon 41 ASS, and consequently skipping transcription of the entire exon 41 (~54 amino acids) and shortening the overall transcript(s), this mutation will also be responsible for a frameshift downstream, which will have an even greater impact on the resulting protein. The introduced frameshift can be explained by the fact that exon 41 contains 161 nucleotides, which is not an exact multiple of 3 and will therefore shift the reading frame to the next exon (42), hence the expected amino acid sequences and the introduction of an early stop codon (depending on the isoform evaluated), generating a non-functional FANCA protein.

The FANCA protein is a crucial element in the core complex of the FA repair pathway, when the main core is not functional, the formation and activation of the ID2 complex (FANCD2 and FANCI) through ubiquitination also does not occur, causing the repair pathway to collapse [14]. It is also important to note that this reported mutation also maps to a 3'UTR of a *Zinc Finger protein* gene (ZNF276, ENSG00000158805.12), which is transcribed in the opposite direction (positive strand) to the *FANCA* gene.

FANCG is the third most frequently mutated gene, representing about 10% of the reported cases of FA worldwide. In Brazil, a frequency of mutations in this gene is observed in approximately 23% of patients with FA. [15]. In this work, we report two patients with mutations in *FANCG*, specifically the variants c.1077-2A>G and c.908T>C. The c.1077-2A>G variant is located in a canonical splicing acceptor site and has an allele frequency below 0.001% in the public consultation population databases (gnomAD, AbraOM), and is also a rare variant. The first report was performed by Demuth *et al.* (2000)^[16], in a patient of European origin and it was later reported in Brazilian patients by Pilloneto *et al.* (2017)^[6].

This variant was classified as pathogenic according to the recommendations of the American College of Medical Genetics-ACMG. The second variant identified, c.908T>C, was reported for the first time by Auerbach *et al.* (2003)^[17] in an individual of Hispanic ethnicity. The allele frequency of this variant is also below 0.001% in the public consultation population databases (gnomAD, AbraOM). However, there is controversy regarding the classification of this variant, it was deposited in the database of variants with clinical cleavage relevance (ID571355) as pathogenic and as a variant with uncertain significance. In this work, it was classified as possibly pathogenic, according to the recommendations of the American College of Medical Genetics-ACMG. It is important to note that this variant had not been previously reported in Brazilian patients (Table 2).

Conclusion

The analysis of the mutational profile of FA patients in the state of Pernambuco reported for the first time the c.908T>C variant and the second report of the c.1475A>G variant in Brazilian patients, in addition to a new mutation in the *FANCA* gene, c. 4011-2A>C(ref.GRCh38/Hg38:chr16:89,739,291T>G), associated with the disease. The functional impact of this mutation appears to be of great relevance and should be complemented by new experimental analyses including functional genomics and transcriptomic / RNA sequencing. In addition, in silico analysis on individual transcriptional isoforms and predictive modeling to evaluate the resulting proteins are also required. This study shows the importance of new research techniques linked to diagnosis, such as gene sequencing to unravel the genomic alterations of patients with FA serving to correlate with the clinical diversity of the disease, and as a potential for therapeutic innovations and it contributes to updating the genetic profile of the disease in the Brazilian population.

Declarations

Funding

The present work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001

Conflict of Interest

The authors declare that no conflict of interest could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

Authors Contributions

MLRRB: data curation, investigation, formal analysis, writing-original draft. TJMS: data curation, project administration, resources, writingreview and editing. JLJ: Methodology, software. NS: data curation, project administration, resources, writing review and editing. All authors read and approved the final version.

Referências

1. Auerbach AD (1993) Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane(DEB) test. Exp Hematol 21:731.<https://doi.org/10.1002%2F0471142905.hg0807s85>
2. Pinto AN, Coutinho MB, Costa E, Fernandes R, Soares T, Almeida, Sousa (2016) Otologic and audiology findings in children with Fanconi anemia. Acta Otorrinolaringol Gallega 9:89-97.<https://doi.org/10.1002/pbc.26155>
3. Alter BP, Giri N (2016) Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi Anemia According to PHENOS: VACTERL-H, PHENOS, and Fanconi Anemia. Am J Med Genet Part A170:1520–1524. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37637>
4. Peake JD, Noguchi E (2022) Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair. Hum Genet 21. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02462-9>
5. Steinberg-Shemer O, Goldberg TA, Yacobovich J, Levin C, Koren A, Revel-Vilk S, Ben-Ami T, Kuperman AA, Zemer VS, Toren A *et al.* (2020) characterization and genotype-phenotype correlation of patients with Fanconi anemia in a multi-ethnic population. Haematologica 105:1825-1834.<https://doi.org/10.3324/haematol.2019.222877>

6. Pilonetto DV, Pereira NF, Bonfim CMS, Ribeiro LL, Bitencourt MA, Kerkhoven L, Floor K, Ameziane N, Joenje H, Gille JJP *et al* (2017) A strategy for molecular diagnostics of Fanconi anemia in Brazilian patients. *Mol Genet Genomic Med* 9:360-372. <https://doi.org/10.1002/mgg3.293>

7. Borges ML, Capela de Matos RR, Amaral BD, Soares-Ventura EM, Leite EP, Silva MO, Cornélio MT, Silva ML, Liehr T, Marques-Salles TDJ (2017) Molecular Cytogenetic Approach to Characterize Novel and Cryptic Chromosome Abnormalities in Childhood Myeloid Malignancies of Fanconi Anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 39:e85-e91 <https://doi.org/10.1097/mpb.0000000000000720>

8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E *et al.* (2015) ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

9. Levran O, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, Auerbach AD (1997) Sequence variation in the Fanconi Anemia gene FAA. *Proc + Natl Acad SciUSA* 94:13051-13056. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13051>

10. Jasmine DP, Noguchi E (2022) Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair. *Hum Genet* 21. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02462-9>

11. Levran O, Diotti R, Pujara K, Batish SD, Hanenberg H, Auerbach AD (2005) Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat* 25:142-149. <https://doi.org/10.1002/humu.20125>

12. Abramowicz A, Gos M (2018) Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genetics* 59:253–268. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0444-7>
 13. Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, Cooper DN (2007) Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat* 28:150–158. <https://doi.org/10.1002/humu.20400>
 14. Rennie ML, Lemonidis K, Arkinson C, Chaugule VK, Clarke M, Streetley J, Spagnolo L & Walden H (2020) Differential functions of FANCI and FANCD2 ubiquitination stabilize ID2 complex on DNA. *EMBO Rep* 21:e50133. <https://doi.org/10.15252/embr.202050133>
 15. Magdalena N, Pilonetto DV, Bitencourt MA, Pereira NF, Ribeiro RC, Jeng M, Pasquini R (2005) Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the FANCA 3788-3790del mutation. *Brazilian J Med Biol Res* 38:669-673.
 16. Demuth I, Wlodarski M, Tipping AJ, Morgan NV, De Winter JP, Thiel M, Gräsl S, Schindler D, D'andrea AD, Altay C, *et al.* (2000) Spectrum of mutations in the Fanconi anemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Europ J Hum Genetics* 8:861-868. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200552>
-
17. Auerbach AD, Greenbaum J, Pujara K, Batish SD, Bitencourt MA, Kokemohr I, Schneider H, Lobitzc S, Pasquini R, Giampietro PF *et al* (2003) INTERNATIONAL FANCONI ANEMIA REGISTRY. Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat* 21:158-168. <https://doi.org/10.1002/humu.10166>
-

TABLES

Table 1. Mutations found in patients with Fanconi anemia

Patient	Consanguineous	Mutation 1	Mutation 2	Allele
FA1	Yes	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	Homozygous
FA2	Yes	c.1077-2A>G	c.908T>C	Heterozygous
FA3	No	c.4011-2A>C	c.1475A>G	Heterozygous
FA4	Yes	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	Homozygous
FA5	Yes	c.3788_3790delTCT	c.3788_3790delTCT	Homozygous
FA6	Yes	c.3788_3790delTCT	c.3788_3790delTCT	Homozygous

Table 2. Identification of the variants found

Location	Mutation	Effect	Type of mutation	Reports in Brazil/Northeast	Reference
FANCA					
ex27	c.2535_2526delCT	p.Cys846Glnfs*20	<i>frameshift</i> ⁽¹⁾	6/2 Pilonetto <i>et al.</i> (2017)	Levrán <i>et al.</i> (1997)
i40	c.4011-2A>C	ND	<i>Aceptor de splicing</i>	NR	Nova mutação
ex16	c.1475A>G	p.His492Arg	<i>missense</i> ⁽²⁾	1/-	Levrán <i>et al.</i> (1997)
ex38	c.3788_3790delTCT	p.Phe1263del	<i>In frame</i> ⁽³⁾	67/9 Pilonetto <i>et al.</i> (2017)	Levrán <i>et al.</i> (1997)
FANCG					
i8	c.1077-2A>G	<i>Splice</i>	<i>Aceptor de splicing</i>	28/8 Pilonetto <i>et al.</i> (2017)	Demuth <i>et al.</i> (2000)
ex07	c.908T>C	p.Leu303Pro	<i>missense</i> ⁽²⁾	NR	Auerbach <i>et al.</i> (2003)

ND: Not determined; NR : not reported

(1) *Framshift*: change in reading frame that may result in different gene product or no product.

(2) *Missense*: missense mutation (encodes a different amino acid)

(3) *in Frame*: amino acid deletion followed by insertion that does not change the reading frame, but leads to the synthesis of a different product

4 DISCUSSÃO GERAL

Diante dos resultados expostos podemos observar que os dados epidemiológicos a respeito da anemia de Fanconi no Brasil ainda são muito escassos, assim como, os centros que realizam o diagnóstico citogenético da doença através do SUS, o que acarreta que a doença seja subdiagnosticada. O perfil clínico da doença no estado de Pernambuco não diferiu do perfil previamente descrito em literatura, no qual inclui baixa estatura, manchas café com leite, alterações esqueléticas, alterações hematológicas e infecções recorrentes. (PILLONETO *et al.*, 2017) Apesar da pequena casuística foi observado presença de anomalias menos frequentes como agenesia renal e rins em ferradura.

A implantação do teste diagnóstico de fragilidade cromossômica no estado de PE, em 2018 veio para agilizar o diagnóstico de 16 pacientes com AF, assim como fazer o acompanhamento das famílias dos mesmos. Este número diagnóstico corresponde a uma média de 4,5 diagnósticos por ano. Dado este que mostra o quanto a doença vinha sendo subdiagnosticada, visto que a taxa de diagnóstico relatada na literatura da doença é de 3,5 casos / ano na região nordeste (compostapor nove estados) (PILLONETO *et al.*, 2017).

Em relação a idade de diagnóstico da doença, um estudo anterior observou que a idade média ao diagnóstico da doença no estado de PE era de 13 anos (dado não publicado), mas após a implantação do teste de fragilidade com a MMC, a média de idade ao diagnóstico caiu para 8,5 anos. O diagnóstico precoce proporciona um tratamento direcionado, aumentando assim a qualidade de vida do paciente.

Nesse estudo observamos que 87,5% dos pacientes eram provenientes da região de agreste e sertão do estado, e 62,5% eram filhos de pais consanguíneos.

A consanguinidade é um costume cultural bastante presente nas regiões do agreste e sertão de Pernambuco, onde muitas vezes o aconselhamento genético não é realizado devido ao precário ao sistema de saúde. Sendo principalmente importante nestas regiões a divulgação da doença visando o diagnóstico precoce e aconselhamento genético a essas famílias. O alto número

de consanguinidade também tem sido observado em outros países em desenvolvimento que também apontam a AF como uma doença subdiagnosticada e que precisa de uma atenção especial não só para o paciente, mas para toda a família (SIDDIQUI *et al.*, 2020).

A anemia de Fanconi é uma doença caracterizada por falência medular com predisposição de cerca de 500X para malignidade hematológicas, sendo assim, a análise citogenética da medula óssea um importante método de acompanhamento da doença, visando identificar alterações cromossômicas, permitindo a detecção precoce de evolução para SMD e/ou LMA. Neste estudo foi encontrado um paciente com trissomia do cromossomo 21 adquirida (FA11-47,XY,+21) que sabidamente está envolvida em casos de leucemias agudas e SMD em evolução clonal. Diversos genes encontrados no cromossomo 21 estão envolvidos da leucemogênese, como os genes *GATA1*, *GATA2* E *GATA3* e o gene *RUNX1* que tem papel importante na hematopoiese (Byrd *et al.*, 2011).

Mutações genéticas relacionadas a AF foram relatadas em 21 genes, as mais frequentes no Brasil foram encontradas nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*, respectivamente. De acordo com Pilonetto *et al.* (2017) a mutação c.3788_3790delTCT no *FANCA* foi a mais frequentemente encontrada na região Nordeste, seguida pela IVS8+2A>G no *FANCG* e c.456+4A>T no *FANCC*. A análise molecular em seis pacientes desse estudo mostrou que o gene mais frequentemente afetado foi o *FANCA*, seguido pelo *FANCG*, como relatado na literatura. No gene *FANCA* as mutações observadas foram: c.2535_2536delCT, c.3788_3790delTCT, c.4011-2A>C e c.1475A>G. De grande interesse para literatura o encontro das mutações 1475A>G, ainda não descrita na região nordeste do Brasil, e a mutação c.4011-2A>C sem relatos na literatura. Em relação ao gene *FANCG* foram encontradas as mutações c.1077-2A>G e c.908T>C. A mutação 908T>C foi encontrada apenas uma vez em pacientes AF brasileiros, descrita por Levran *et al.* (1997). Estes dados mostram a importância dos estudos moleculares dos pacientes AF do Brasil, devido a miscigenação étnica da população brasileira, além de que possivelmente esses estudos tragam casos inéditos que acrescentem dados novos à literatura existente.

A partir da definição do perfil mutacional dos pacientes do estado de Pernambuco será possível criar um painel de triagem genético regional para

auxiliando diagnóstico precoce.

Como doença rara, a AF deve ter atenção especial pelo SUS, com diagnóstico precoce através do teste de fragilidade cromossômica pela MMC, associada ao teste molecular e acompanhamento da doença através da citogenética da medula óssea. A implantação desse fluxo diagnóstico irá proporcionar o diagnóstico precoce e um eficaz aconselhamento genético familiar, resultando em um tratamento mais específico e uma melhor qualidade de vida ao paciente e sua família.

Por outro lado, os casos de AF contribuirão para literatura com estudos mais detalhados sobre as características clínicas, epidemiologia e dados moleculares sobre a doença. Estimulando pesquisas para descoberta de novos métodos diagnósticos e de tratamentos, visando torná-la menos subdiagnosticada e proporcionando melhoria da sobrevida no Brasil, especialmente na região Nordeste.

5 CONCLUSÕES

1. Na AF, três foram os sintomas mais frequentes: anormalidades hematológicas, alterações da coloração da pele e anormalidades esqueléticas. Apontando para um perfil clínico similar ao perfil clássico da doença.
2. O diagnóstico da AF usando o teste de fragilidade cromossômica com a MMC em Pernambuco, mostrou que anemia de Fanconi apresenta uma frequência maior do que a estimada na região Nordeste. E mostrou a importância deste teste para rede SUS.
3. Os estudos citogenéticos na MO para investigar anormalidades cromossômicas que causam risco de evolução clonal e/ou transformação leucêmica, como o paciente AF11 com trissomia adquirida 21 (47,XY,+21) é de extrema importância. Pois, relato dessas anormalidades cromossômicas indicarão transplante de MO precoce para evitar a leucemização, cujo prognóstico é muito desfavorável.
4. A análise mutacional permitiu a identificação de uma nova mutação relacionada com a doença e com grande potencial deletério na proteína (c.4011-2A>C). E relatou a presença de outras duas mutações raras (1475A>G, 908T>C). Mostrando a importância de se realizar o diagnóstico molecular desses pacientes e da implantação dessa metodologia no SUS do estado de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- Aftab, Saima I, Saba K; Muhammad I, NADIR A, Hussain J, Khaliq S, Shagufta; and Shahida M. Analysis of FANCC gene mutations (IVS4+4A>T, del322G, and R548X) in patients with Fanconi anemia in Pakistan. **Turk. J. Med. Sci.**, 47:391-398,2017.
- Albers CA, Paul DS, Schulze H, Freson K, Stephens JC, Smethurst PA, Jolley JD, Cvejic A, Mk, Bertone P, *et al.* Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. **Nat Genet**, 44:435–439, 2012
- Alcón P, Shakeel S, Chen ZA, Rappsilber J, Patel KJ, Passmore LA. FANCD2-FANCI is a clamp stabilized on DNA by monoubiquitination of FANCD2 during DNA repair. **Nat Struct Mol Biol**, 27:240–248, 2020.
- Ali BH, Olfa M, Sahar E, Faten T, Wiem A, Fethi M, *et al.* FANCA Gene Mutations in North African Fanconi Anemia Patients. **Frontiers in Genetics**, 12:1-12, 2021.
- Alter BP. Arm anomalies and bone marrow failure may go hand in hand. **J Hand Surg Am**, 17: 566-571, 1992
- Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA, Uchida T, Velagaleti GV, Elghetany MT. Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. **Cancer Genet Cytogenet**, 117:125-131, 2000
- Alter B.P, Giri N. Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi Anemia According to PHENOS: VACTERL-H, PHENOS, and Fanconi Anemia. **Am. J. Med. Genet. Part A**, 170:1520–1524, 2016.
- Alter BP, Rosenberg PS. VACTERL-H Association and Fanconi anemia. **Mol Syndromol**, 4:87-93, 2013
- Alves AFNR. Alterações tireoidianas e outras alterações endócrinas em crianças e adolescentes com anemia de fanconi. Curitiba. Monografia [Especialização em endocrinologia pediátrica] - Universidade Federal do Paraná, 2016.
- Amaral A, De Lima S, Silva L, Lemos-Pinto M, Lucena L, Marques-Salles T, Silva E, Magnata S. A new methodology for diagnosis of fanconi anemia based on biological dosimetry. **Archives in Biosciences & Health**, 1:189-200, 2019
- Asur RS, Kimble DC, Lach FP, Jung M, Donovan FX, Kamat A, Noonan RJ, Thomas JW, Park M, Chines P, Vlachos A, Auerbach AD, Smogorzewska A, Chandrasekharappa SC. Somatic mosaicism of an intragenic FANCB duplication in both fibroblast and peripheral blood cells observed in a Fanconi anemia patient leads to milder phenotype. **Mol Genet Genomic Med**, 6:77–91, 2018
- Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry. Relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. **Blood** 73:391-6, 1989

Auerbach AD, Adler B, Chaganti RS. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. **Pediatrics**, 67:128-35,1981.

Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. **Exp Hematol**, 21:731-3,1993

Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. **Mutat Res**, 668(1-2):4-10,2009. Bagby G. Recent advances in understanding hematopoiesis in Fanconi Anemia. **F1000Research** 7:105, 2018

Balta G, de Winter JP, Kayserili H, Pronk JC, Joenje H. Fanconi anemia A due to a novel frameshift mutation in hotspot motifs: lack of FANCA protein. **Hum Mutat**,15:578,2000

Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. **J Med Genet** 42:737-48,2005.

Berger R, Bussel A, Schenmetzler C. Cytogenetic studies in four cases of Fanconi's anemia. **Nouv Rev Fr Hematol**, 15:539-50,1975

Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegue E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. **Cell Stem Cell**, 8:16–29,2011

Bloom GE, Warner S, Gerald PS, Diamond LK. Chromosome Abnormalities in Constitutional Aplastic Anemia. **N Engl J Med**, 274:8-14,1966.

Bonfim C, Nichele S, Loth G, Funke VAM, Nabhan SK, Pillonetto DV, Lima ACM, Pasquini R. Transplantation for Fanconi anaemia: lessons learned from Brazil. **Lancet Haematol**, 9:e228–e236,2022

Borges ML, Capela de Matos RR, Amaral BD, Soares-Ventura EM, Leite EP, Silva MO, *et al.* Molecular Cytogenetic Approach to Characterize Novel and Cryptic Chromosome Abnormalities in Childhood Myeloid Malignancies of Fanconi Anemia. **J Pediatr Hematol Oncol**,39:e85-91,2017

Bottega R, Nicchia E, Cappelli E, Ravera S, Rocco D, Faleschini M, Corsolini F, Pierri F, Calvillo M, Russo G. Hypomorphic FANCA mutations correlate with mild mitochondrial and clinical phenotype in Fanconi anemia. **Haematologica**,103(3):417-426,2018.

Botto LD, Khoury MJ, Mastroiacovo P, Castilla EE, Moore CA, Skjaerven R, *et al.* The spectrum of congenital anomalies of the VATER association: an international study. **Am J Med Genet**, 71:8-15,1997.

Brégnard C, Guerra J, Déjardin S, Passalacqua F, Benkirane M, Laguet N.

Upregulated LINE-1 Activity in the Fanconi Anemia Cancer Susceptibility Syndrome Leads to Spontaneous Pro-inflammatory Cytokine Production. **Ebio Medicine**,8:184-194,2016.

Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. **Blood**, 84:1650-5,1994.

Calado RT, Clé DV. Treatment of inherited bone marrow failure syndromes beyond transplantation. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)**, 1: 96-101,2017. Cantres-Velez JA, Blaize JL, Vierra DA, Boisvert RA, Garzon JL, Piraino B, Tan W, Deans AJ, Howlett NG. Cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation of FANCD2 promotes mitotic fidelity. **Mol Cell Biol**, 41:e0023421,2021.

Cappelli E, Ravera S, Vaccaro D, Cuccarolo P, Bartolucci M, Panfoli, Dufour C, Degan P. Mitochondrial respiratory complex I defects in Fanconi anemia. **Trends. Mol. Med**,19: 513–514,2013.

Carapito R, Konantz M, Paillard C, Miao Z, Pichot A, Leduc MS, Yang Y, Bergstrom KL, Mahoney DH, Shardy DL, *et al.* Mutations in signal recognition particle SRP54 cause syndromic neutropenia with Shwachman-Diamond-like features. **J Clin Invest**, 127:4090– 4103,2017.

Casado JA, Valeri A, Sanchez-Domínguez R, Vela P, López A, Navarro S, Alberquilla O, Hanenberg H, Pujol R, Segovia JC, *et al.* Upregulation of NKG2D ligands impairs hematopoietic stem cell function in Fanconi anemia. **J Clin Invest**, 132:e142842,2022.

Castella M, Pujol R, Callén E, Ramírez MJ, Casado JA, Talavera M, Ferro T, Muñoz A, Sevilla J, Madero L, *et al.* Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. **J Med Genet**, 48:242-50,2011.

Castella M, Pujol R, Callén E, Trujillo JP, Casado JA, Gille H, Lach FP, Auerbach AD, Schindler D, Benítez J, *et al.* Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. **Blood**, 117:3759-69,2011.

Català A, S. Ali S, Cuvelier GDE, Steele MG, Klaassen RJ, Fernandez CV, Pastore YD, Abish, S, Rayar M, Jardine L, Breakey VR, *et al.* **Br J of Haematol**, 189:976– 981,2020.

Ceccaldi R, *et al.* Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Stem Cell**, 11(1):36–49,2012

Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 17:337-49,2016.

Cheung RS, Taniguchi T. Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers. **Int J Hematol**,106:335-344,2017.

Chrzanowska KH, Gregorek, H, Dembowska-Bagińska B. Kalina MA, Digweed M.Nijmegen breakage syndrome (NBS). **Orphanet J Rare Dis**, 7:1-19,2012.

Columbaro M, Ravera S, Capanni C, Panfoli I, Cuccarolo P, Stroppiana G, Degan P, Capelli E.Treatment of FANCA Cells with Resveratrol and N-Acetylcysteine: A Comparative Study. **PloS One**, 9: e104857,2014.

Dacie J V, Gilpin A. Refractory anaemia (Fanconi type). Its incidence in three members of one family, with in one case a relationship to chronic haemolytic anaemia with nocturnal haemoglobinuria (Marchiafava-Micheli disease or "nocturnal haemoglobinuria"). **Arch Dis Child**, 9:155-62,1994.

Datta A, Brosh RM Jr. Holding All the Cards-How Fanconi Anemia Proteins Deal with Replication Stress and Preserve Genomic Stability. **Genes (Basel)**, 10:170,2019.

Deans AJ, West SC.DNA interstrand crosslink repair and cancer. **Nat Rev Cancer**, 11:467-80,2011.

Dhanraj S, Matveev A, Li H, Lauhasurayotin S, Jardine L, Cada M, Zlateska B, Taylor C, Zhou J, Mendonza-Londo R. Biallelic mutations in DNAJC21 cause Shwachman-Diamond syndrome. **Blood**,129:1557– 1562,2017.

Dilshad J, Maruf AH,Mainul H. Diamond–Blackfan anemia with mutation in *RPS19*:A case report and an overview of published pieces of literature.**J Pharm Bioallied Sci**, 12: 163–170,2020.

Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Beauvils S, Bellanger F, Mahlaoui N, LambilliotteA, AladjidiN, Bertrand Y, Mialo V, *et al*. Classification of and risk factorsfor hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. **Haematologica**, 97: 1312–1319,2012.

Dosik H, Hsu LY, Todaro GJ, Lee SL, Hirschhorn K, Selirio ES, Alter AA. Leukemia in Fanconi's Anemia: Cytogenetic and Tumor Virus Susceptibility Studies. **Blood**, 36: 341-352,1970.

Dubois EL, Guitton-Sert L, Beliveau M, Parmar K, Chagraoui J, Vignard J, Pauty J,Caron MC, Coulombe Y, Buisson R, *et al*. A Fanci knockout mouse model reveals common and distinct functions for FANCI and FANCD2. **Nucleic Acids Res**,47:7532 7547,2019.

Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Béka'ssy AN, Scimè R, PistorioA, Pistoia V.TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. **Blood**,102:2053-9,2003.

Dulmovits BM, Olson TS.Does immune destruction drive all forms of bone

marrow failure?. **J Clin Invest**, 132:e161288,2022.

Dutrillaux B, Fosse AM. Use of BrdU in the study of cell in normal and abnormal subjects. **Ann genet**, 19:95,1976.

Elder DA., D'Alessio DA., Eyal O., Mueller R., Smith FO., Kansra AR., & Rose, SR. Abnormalities in glucose tolerance are common in children with fanconi anemia and associated with impaired insulin secretion. **Pediatr Blood Cancer**, 51:256– 260,2008.

Elmore E, Swift M. Growth of cultured cells from patients with Fanconi anemia. **J Cell Physiol**, 87:229-33,1975.

Fanconi Anemia Research Fund. Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. 4 ed. **Fanconi Anemia Research Fund**, Oregon:421,2014.

Fanconi G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's Anemia (F.A). **Sem. Hematol**, 4:233-40,1967.

Fajardo NB, Taraviras S, Lygerou Z. Fanconi anemia proteins and genome fragility: unraveling replication defects for cancer therapy. **Trends iCancer**, 8:467-481,2022

Filipović J, Joksić G, Vujić D, Joksi I, Mrasek K, Weise A, Liehr T. First molecular-cytogenetic characterization of Fanconi anemia fragile sites in primary lymphocytes of FA-D2 patients in different stages of the disease. **Molecular Cytogenetics**, 9:1-10,2016

Frontbrune FS, Soulier J, Latour RP. Fanconi anemia. In: Abutalib SA, Hari P. Clinical Manual of Blood and Bone Marrow Transplantation. **Wiley Blackwell**, 23:255-63,2017.

Galeano L, Guevara G. Alteraciones cromosómicas estructurales inducidas por bioflavonoides de la dieta en linfocitos de anemia de Fanconi. **Rev. Cienc. Salud**, 5: 26-36,2007

Garaycoechea JI, Patel KJ. Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia?. **Blood**, 123: 26–34,2013.

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. **Mol Cell**, 7:249-62,2001.

Garriga S, Rosby WH. The incidence of leukemia in families of patients with hypoplasia of the marrow. **Blood**, 14:1008-14,1959.

Geng L, Huntoon CJ, Karnitz LM. RAD18-mediated ubiquitination of PCNA activates the Fanconi anemia DNA repair network. **J Cell Biol**, 191:249-57,2010.

Gennery AR, Slatter MA, Bhattacharya A, Barge D, Haigh S, O'driscoll M,

Coleman R, Abinun M, Flood TJ, Cant AJ, *et al.* The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia. **Clin Immunol**, 113:214-219, 2004.

Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA. Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. **J Clin Endocrinol Metab**, 92:2624–2631, 2007.

Guardiola P, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, Marsh JC, Ball SE, Locatelli F, Vermynen C, Skinner R, *et al.* Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Blood**, 95:422-9, 2000.

Gueiderikh A, Maczkowiak-Charitois F, Rosselli F. A new frontier in Fanconi anemia: From DNA repair to ribosome biogenesis. **Blood Rev**, 52:100904, 2022.

Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, *et al.* Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. **Blood**, 122:3206-9, 2013.

Hirano S, Yamamoto K, Ishiai M, Yamazoe M, Seki M, Matsushita N, Ohzeki M, Yamashita YM, Arakawa H, Buerstedde JM, *et al.* Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. **EMBO**, 24:418-427, 2005.

Huret JL. Fanconi anaemia. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol France**, 2:308-10, 2002.

Huret JL, Tanzer J, Guilhot F, Frocraïn-Herchkovitch C, Savage JR. Karyotype evolution in the bone marrow of a patient with Fanconi anemia: breakpoints in clonal anomalies of this disease. **Cytogenet Cell Genet**, 48:224-7, 1988.

Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. **Nature**, 290:142-143, 1981.

Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. **Nat Rev Genet**, 2:446-57, 2001.

Kelly PF, Radtke S, von Kalle C, Balcik B, Bohn K, Mueller R, Schuesler T, Haren M, Reeves L, Cancelas JA, *et al.* Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. **Mol Ther**, 15:211-219, 2007.

Kim JM, Kee Y, Gurtan A. Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconianemia core complex by FANCM/FAAP24. **Blood**, 111:5215-22, 2008.

Knies K, Inano S, Ramírez MJ, Ishiai M, Surrallés J, Takata M, Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFWD3 cause Fanconi anemia. **J Clin Invest**, 127:3013–27, 2017.

Korgaonkar S, Ghosh K, Vundinti BR (2010) Clinical, genetic and cytogenetic study of Fanconi anemia in an Indian population. **Hematology**, 15:58-62,2010.

Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**, 101:1249-1256,2003.

Kwee ML, Poll EHA., van de Kamp JJP, Koning H, Eriksson AW, Joenje . Unusual response to bifunctional alkylating agents in a case of Fanconi anaemia. **Hum Genet**, 64:384–387,1983.

Langevin F, Crossan GP, Rosado IV, Arends MJ, Patel KJ. FANCD2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. **Nature**, 475:53-8,2011.

Lemonidis K, Arkinson C, Rennie ML, Walden H. Mechanism, specificity, and function of FANCD2-FANCI ubiquitination and deubiquitination. **FEBS. J**, 1-19,2021.

Lévy JM, Stoll C, Korn R. A case of acute leukemia in a girl with Fanconi's anemia. Review of the literature. **Nouv Rev Fr Hematol**, 14:713-20,1974.

Li N, Wang J, Wallace SS, Chen J, Zhou J, D'Andrea AD. Cooperation of the NEIL3 and Fanconi anemia/BRCA pathways in interstrand crosslink repair. **Nucleic Acids Res**, 48:3014–3028,2020.

Liu Y, Ballman K, Li D, Khan S, Derr-Yellin E, Shou W, et al. Impaired function of Fanconi anemia type C-deficient macrophages. **J Leukoc Biol**, 91:333-40,2012.

Liu W, Palovcak A, Li F, Zafar A, Yuan F, Zhang Y. Fanconi anemia pathway as a prospective target for cancer intervention. **Cell & Bioscience**, 10:1-14,2020.

McManus JF, Nguyen N-YN, Davey RA, MacLean HE, Pomilio G, McCormack MP, Chiu WS, Wei AH, Zajac JD, Curtis DJ. Androgens stimulate erythropoiesis through the DNA-binding activity of the androgen receptor in nonhematopoietic cells. **Eur J Haematol**, 0:1–8,2020.

Mankad A, Taniguchi T, Cox B, Akkari Y, Rathbun RK, Lucas L, Bagby G, Olson S, D'Andrea AD, and Grompe M. Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia. **Blood**, 107: 3084–3090,2006.

Mamrak NE, Shimamura A, Howlett NG. Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. **Blood Rev**, 31:93-99,2017.

Miglierina R, Le Coniat M, Berger R. A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow cytometry. **Anal Cell Pathol**, 3:111-8,1991.

Moisés O, Fiesco-Roa, Neelam Giri, Lisa J. McReynolds, Ana F. Best, Blanche P. Alter. Genotype-phenotype associations in Fanconi anemia: A literature review. **Blood Rev**, 37:100589,2019.

Moreno, O.M., Paredes, A.C., Suarez-Obando, F., & Rojas, A. An update on Fanconi anemia: Clinical, cytogenetic and molecular approaches (Review). **Biomed. Rep.**,15: 74,2021.

Myers KC, Sauter S, Zhang X, Bleesing JJ, Davies SM, Wells SI, *et al.* Impaired immune function in children and adults with Fanconi anemia. **Pediatr Blood Cancer**,64:e26599,2017.

Niedzwiedz W, Mosedale G, Johnson M, Ong CY, Pace P, Patel KJ. The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. **Mol Cell**, 15: 607-620,2004.

Nilson L R (1960) Chronic pancytopenia with multiple congenital abnormalities (Fanconi's anaemia). *Acta Paediatr* 49:518-29.

Nowel PC, Bessa E. Prognostic significance of single chromosome abnormalities in preleukemic states. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 42:1-7
Nowzari H, Jorgensen MG, Ta TT, Contreras A, Slots J (2001) Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. **J Periodontol**,72:1601-6,1989.

Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, Winter J.P. Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. **Anemia**,2012:1-9,2012.

Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, Muramatsu H, Okuno Y, Higasa K, Shimada M, Takeshima H, Hanada K, Hirano T, *et al.* Digenic mutations in *ALDH2* and *ADH5* impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. **Sci Adv**, 6:eabd7197,2020.

Pilonetto D V, Pereira N F, Bonfim C MS, Ribeiro L L, Bitencourt MA, Kerkhoven L, *et al.* A strategy for molecular diagnostics of Fanconi anemia in Brazilian patients. **Mol. Genet. Genomic Med**, 5: 360–372,2017.

Pinto AN, Coutinho MB, Costa E, Fernandes R, Soares T, Almeida and Sousa C. Otologic and audiological findings in children with Fanconi anemia. **Acta Otorrinolaringol Gallega**, 9:89-97,2016.

Pollard JA, Furutani E, Liu S, Esrick E, Cohen LE, Bledsoe J, Liu CW, Lu W, Haro MJR, Surrallés J, *et al.* Metformin for treatment of cytopenias in children and young adults with Fanconi anemia. **Blood Advances**, 6:3803-3811,2022.

Ponte F, Sousa R, Fernandes A, Gonçalves C, Barbot J, Carvalho F, Porto B. Improvement of genetic stability in lymphocytes from Fanconi anemia patients through the combined effect of α -lipoic acid and N-acetylcysteine. **Orphanet J. Rare Dis**, 7:28,2012.

Poole SR, Smith AC, Hays T, McGavran L, Auerbach AD. Monozygotic twin girls with congenital malformations resembling fanconi anemia. **Am J Med Genet**, 42:780-4,1992.

Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R, Nibourel O, Pondarre C, Pages MP, *et*

al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. **Blood**, 117:e161-e170, 2011.

Rão VB, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K. Differentiation of Nijmegen breakage syndrome from Fanconi anemia. **Genet. Mol. Res**, 6: 622-626, 2007.

Ravera S, Dufour C, Degan P, Cappelli E. Fanconi anemia: from DNA repair to metabolism. **Eur J Hum Genet**, 26: 475–476, 2018.

Rennie ML, Lemonidis K, Arkinson C, Chaugule VK, Clarke M, Streetley J, Spagnolo L & Walden H. Differential functions of FANCI and FANCD2 ubiquitination stabilize ID2 complex on DNA. **EMBO Rep**, 21:e50133, 2020.

Repczynska A, Julga K, Skalska-Sadowska J, Kacprzak MM, Kubiak AB, Lazarczyk E, Loska D, Drozniewska M, Czerska K, Wachowiak J. Next-generation sequencing reveals novel variants and large deletion in *FANCA* gene in Polish family with Fanconi anemia. **Orphanet J Rare Dis**, 17:282, 2022.

Richardson CD, Kazane KR, Feng SJ, Zelin E, Bray NL, Schäfer AJ, *et al.* CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. **Nat Genet**, 50:1132-9, 2018.

Rose SR, Myers KC, Rutter MM, Mueller R, Khoury JC, Mehta PA, *et al.* Endocrine phenotype of children and adults with Fanconi anemia. **Pediatr Blood Cancer**, 59:690-6, 2012.

Ruppitsch W, Meisslitzer C, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane. **FEBS Lett**, 422:99-102, 1998.

Santos PAD. Síndromes de falência medular congênitas: da fisiopatologia à clínica. Coimbra. Dissertação [Mestrado em Hematologia] - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2017.

Schroeder TM, German J. Bloom's syndrome and Fanconi's anemia: demonstration of two distinctive patterns of chromosome disruption and rearrangement. **Humangenetic**, 25:299-306, 1974.

Schroeder TM, Anschütz F, Knopp A. Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. **Humangenetic** 1:194-196, 1964.

Shahid M, Azfaralariiff A, Zubair A, Abdulkareem AN, Khalili N, Law D, Firasat S, Fazry S. In silico study of missense variants of *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* genes reveals high risk deleterious alleles predisposing to Fanconi anemia pathogenesis. **Gene**, 812:146104, 2022.

Shen Y, Lee YH, Panneerselvam J, Zhang J, Loo LW, Fei P. Mutated Fanconi anemia pathway in non-Fanconi anemia cancers. **Oncotarget**, 6:20396-

403,2015.

Shimamura A, Oca RM, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, D'Andrea AD. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. **Blood**, 100: 4649-4654,2002.

Shimamura, A. Clinical approach to marrow failure. **Hematology**, 2009:329–337,2009.

Siddiqui F, Ansari S, Agha A, Nusrat N, Munzir S, Shan S, Hanifa A, Farzana T Sr, Taj M, Borhany M, Hussain Z, Nadeem M, Shamsi T. Chromosomal Breakage in Fanconi Anemia and Consanguineous Marriages: A Social Dilemma for Developing Countries. **Cureus**, 14:e10440,2020.

Stepensky P, Chacón-Flores M, Kim KH, Abuzaitoun O, Bautista-Santos A, Simanovsky N, *et al.* Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome. **J. Med. Genet**, 54:558– 566,2017.

Sugita K, Taki T, Hayashi Y, Shimaoka H, Kumazaki H, Inoue H.; Konno Y, Taniwaki M, Kurosawa H, Eguchi M. MLL-CBP fusion transcript in a therapy-related acute myeloid leukemia with the t(11;16)(q23;p13) which developed in acute lymphoblastic leukemia patient with Fanconi anemia. **Genes Chromosom Cancer**, 27:264-9,2000.

Sumpter R Jr, Sirasanagandla S, Fernández ÁF, Wei Y, Dong X, *et al.* Fanconi Anemia Proteins Function in Mitophagy and Immunity. **Cell**, 1654:867-81,2016.

Susan R. Rose, Mi-Ok Kim, Leslie Korbee, Kimberly A. Wilson, M. Douglas Ris, Ori Eyal, Rosa Sherafat-Kazemzadeh, Sureka Bollepalli, Richard Harris, Michael R. Jeng, *et al.* Oxandrolone for the treatment of bone marrow failure in Fanconi anemia. **Pediatr Blood Cancer**, 61:11–19,2014.

Suzuki S, Racine RR, Manalo NA, *et al.* Impairment of fetal hematopoietic stem cell function in the absence of Fancd2. **Exp Hematol**, 48: 79–86,2017.

TAKAYO U; Yoshiyuk T; Hajime H. Genetic Study of Fanconi Anemia in Infancy Revealed *FANCI* Mutations and Defective *ALDH2* Variant: A Case Report. **J. Pediatr. Hematol. Oncol**, 44:e438-e441,2022.

Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. **Blood**, 107:4223-33,2006.

Teresa BG, Rodríguez A, Frías S. Estudio multidisciplinario del paciente con anemia de Fanconi. **Acta Pediatr Mex**, 37:54-9,2016.

Uppuluri R, Vellaichamy V, Ramanan SM, Meena S, Varla H, Ramakrishnan B, Jayakumar Revathi I. Haploidentical Stem Cell Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide in Fanconi Anemia: Improving Outcomes with

Improved Supportive Care in India. **Biol Blood Marrow Transplant**, 26:2292-2298,2020.

Van de Vrugt HJ, Harmsen T, Riepsaame J, Alexantya G, van Mil SE, Franco L, *et al.* Effective CRISPR/Cas9-mediated correction of a Fanconi anemia defect by error-prone end joining or templated repair. **Sci Rep**,9:768,2019.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. **JAMA**, 285:3130-3,2001.

Wang S, Wang R, Peralta C, Yaseen A, Pavletich NP. Structure of the FA core ubiquitin ligase closing the ID clamp on DNA. **Nat Struct Mol Biol**,28:300-309,2021.

Wang Y, Zhou W, Alter BP, Wang T, Spellman SR, Haagenson M, Gadalla SM, *et al.* Chromosomal Aberrations and Survival after Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplant in Patients with Fanconi Anemia. **Biol Blood Marrow Transplant**, 24: 2003–2008,2018.

Williams RS, Williams JS, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. **Biochem Cell Biol**,85:509–520,2007.

Wu ZH. Phenotypes and genotypes of the chromosomal instability syndromes. **Transl Pediatr**, 5:79-83,2016.

Young NS, Alter BP. Aplastic anemia acquired and inherited. **WB Saunders Company**,1:275-324,1994.

Zakrzewskis S, Sperling K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. **Hum. Genet**, 56:81-4,1980.

Zhang QS, Tang W, Deater M, Phan N, Marcogliese AN, Muhsen HL, Dhalimy AL, Major A. Metformin improves defective hematopoiesis and delays tumor formation in Fanconi anemia mice. **Blood**, 128: 2774-2784,2016.

Zen PRG, Moraes FN, Rosa RFB, Graziadio C, Paskulin GA. Clinical characteristics of patients with Fanconi anemia. **Rev Paul Pediatr**, 29:392-9,2011.

Zhen W, Evans MK, Haggerty CM, Bohr VA. Deficient gene specific repair of cisplatin-induced lesions in Xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia cell lines. **Carcinogenesis**, 14:919-24,1993.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER SUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DA ANEMIA DE FANCONI EM PERNAMBUCO: ASPECTOS CLÍNICOS E BIOMOLECULARES

Pesquisador: Terezinha de Jesus Marques Salles

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 73905817.1.1001.5192

Instituição Proponente: Complexo Hospital HUOC/PROCAPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 25 de Março de 2019

Assinado por:
Magaly Bushatsky
(Coordenador(a))

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO
PACIENTE/PORTADOR DE ANEMIA DE FANCONI****ESCLARECIMENTOS AO PARTICIPANTE DA
PESQUISA**

Venho por meio deste convidá-lo a participar do projeto de pesquisa “Caracterização da Anemia de Fanconi: Aspectos clínicos e biomoleculares”. Este estudo pretende descrever o perfil clínico laboratorial dos pacientes com anemia de Fanconi no Estado de Pernambuco e fixar a técnica de mitomicina C. Este teste laboratorial avalia a fragilidade cromossômica necessária ao diagnóstico destes pacientes.

A assinatura deste termo de consentimento permitirá a participação do seu filho(a) nesta pesquisa, através de:

- a. Acesso ao prontuário médico para retirar dados clínicos e laboratoriais;
- b. Amostra sangue periférico que serão colhidos durante procedimento rotineiro de diagnóstico.

Para que o Sr(a) possa autorizar a participação do seu filho(a) neste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO:

O estudo será feito através do sangue periférico, as amostras serão obtidas por flebotomia. Será utilizada a mesma amostra coletada para o diagnóstico e acompanhamento clínico dos pacientes. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico.

As amostras de sangue periférico que restarem serão armazenadas em Biorrepositório até a vigência do projeto. Após este período o material será descartado conforme normas estabelecidas pela Resolução 441/11 CNS/MS.

RISCOS

O risco existente neste trabalho será o mesmo existente que são inerentes ao procedimento de coleta de material biológico (sangue periférico) do paciente, não serão realizados nenhum procedimento além daquele usado na rotina para o estabelecimento do diagnóstico da doença do seu filho. A obtenção dessas amostras por flebotomia será realizada durante os procedimentos de rotina, independente da realização do estudo. Complicações muito raramente poderão surgir durante este procedimento da coleta de sangue periférico, que são: hematoma no local da punção, e infecção local. Sendo do médico da instituição, a responsabilidade de tratar até resolução do problema médico.

BENEFÍCIOS

O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com base nos resultados deste estudo, outras pessoas portadoras de Anemia de Fanconi possam ser diagnosticadas com maior rapidez e terem mais tempo para realização do tratamento.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará do seu filho, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - HUOC e pela 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 Sr. (a) ou seu filho(a) não será identificado em nenhuma publicação.

CUSTOS

A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhuma forma de pagamento, caso dê sua autorização. O Sr. (a) ou seu filho(a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a participação. Todos os cuidados assim como os tratamentos ministrados a seu filho(a) serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no estudo.

Não existirão custos para a realização da pesquisa.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que o Sr.(a) saiba que a participação neste estudo é completamente voluntária e que pode recusar a participar ou interromper participação do seu 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.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com os responsáveis pelo estudo: Dra Terezinha de Jesus Marques Salles telefone: (081) 94517243; Prof^a MSc. Maria Teresa Marquim Nogueira Cornélio (081) 88364669, e Maria Luiza Rocha da Rosa Borges (081)99009696; ou pelo telefone do Laboratório de Citogenética do CEONHPE/Hospital Universitário Oswaldo Cruz (081-21011536 - Ramal 113). Se o Sr(a) tiver perguntas com relação aos direitos do seu filho(a) como participante desta pesquisa, também pode procurar o Comitê de Ética e pesquisa em seres Humanos (CEP)-Complexo hospitalar HUOC/PROCAPE, localizado no pavilhão Ovídio Montenegro- 1º andar- Rua Arnóbio Marques,310- Santo Amaro - 50100- 130-Recife-PE.

_____ / ____ / ____ (Assinatura do

_____ (Nome do Paciente – letra

pelo Paciente) (Assinatura do responsável

ano dia mês

(Nome do responsável pelo Paciente – letra de forma)

_____/_____/____ (Assinatura de Teste)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ / ____ / ____ (Assinatura)

ANEXO C - CARTA DE ACEITE REVISTA ABCS HEALTH SCIENCES



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o manuscrito intitulado "**Síndrome Hemofagocítica em paciente com anemia de Fanconi e associação VACTERL**" autoria de Maria Luiza Rocha da Rosa Borges, Victor Coentro Torreiro de Moraes, João Lucas Cruz Souza, Edinalva Pereira Leite, Neide Santos, Terezinha de Jesus Marques-Salles, foi aceito para publicação no periódico *ABCS Health Sciences* (ISSN 2318-4965).

Santo André, 01/07/2021

Ricardo Souto

Editor Científico
ABCS Health Sciences
Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde

ANEXO D - Carta de aceite da revista HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY

View Letter

Close

Date: Nov 16, 2022
To: "terezinha de Jesus marques-salles" terezinha.salles20@gmail.com
cc: ferreira@unicamp.br
From: "BJHH" secretaria@rbhh.org
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: HTCT-D-22-00032R1
 Title: CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF CYTOGENETIC TEST OF MMC IN PERNAMBUCO, STATE, BRAZIL
 Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Dear Dr., marques-salles,

I am pleased to inform you that your paper "CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF CYTOGENETIC TEST OF MMC IN PERNAMBUCO, STATE, BRAZIL" has been accepted for publication in Hematology, Transfusion and Cell Therapy.

Below are comments from the editor and reviewers.

We appreciate and value your contribution to Hematology, Transfusion and Cell Therapy. We regularly invite authors of recently published manuscript to participate in the peer review process. If you were not already part of the journal's reviewer pool, you have now been added to it. We look forward to your continued participation in our journal, and we hope you will consider us again for future submissions.

Yours sincerely,

Fernando F. Costa, PhD, MD
 Editor-in-Chief
 Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Comments from the editors and reviewers:

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/htct/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

MARIA LUIZA ROCHA DA ROSA BORGES

**ANEMIA DE FANCONI EM PERNAMBUCO:
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA**

RECIFE

2022

MARIA LUIZA ROCHA DA ROSA BORGES

**ANEMIA DE FANCONI EM PERNAMBUCO:
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de
Doutora em Genética.

Orientador: Profa Dra Neide Santos

Coorientador: Dra Terezinha de Jesus Marques Salles

RECIFE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Rosa Borges, Maria Luiza da
Anemia de Fanconi em Pernambuco: caracterização clínica e genética / Maria Luiza da Rosa Borges – 2022.

110 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Coorientadora: Terezinha de Jesus Marques Salles

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2022.
Inclui referências e anexos.

1. Anemia 2. Mitomicina C 3. Citogenética I. Santos, Neide (orient.)
II. Salles, Terezinha de Jesus Marques (coorient.) III. Título

616.152

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -022

MARIA LUIZA ROCHA DA ROSA BORGES

**ANEMIA DE FANCONI EM PERNAMBUCO:
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Genética. Área de concentração: Genética.

Aprovado em: 13/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Neide Santos (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr Roberto Rodrigues Capela de Matos

Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Dra. Teresa de Souza Fernandes Seixas

Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Dra Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Antes de agradecer gostaria de dedicar este trabalho a minha avó, Geninha da Rosa Borges, que deixou o plano físico durante esse processo, mas sempre foi uma grande apoiadora da minha vida acadêmica. Assim como gostaria de dedicar as minhas filhas caninas, Annie, Ellie e Dora, que também não estão mais entre nós, mas sem elas eu com certeza não teria conseguido passar pela pandemia e seguir meu sonho.

Agradeço a Profa Neide por ter aceitado o desafio de me orientar e por ter feito esse papel maravilhosamente bem. Mostrando que orientador pode se tornarnão só um exemplo, mas também uma amiga.

Agradeço demais a Dra Terezinha que sempre foi uma mãe científica para mim, está comigo desde a iniciação científica, sempre acreditou e confiou em mim. Espero agora poder contribuir profissionalmente com ela, além de levar a diante seus aprendizados.

Agradeço a toda equipe do laboratório de citogenética do HUOC pelo apoioconcedido durante esses quatro anos.

ESPECIAIS

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por me ensinarem a amar os estudos e por me proporcionarem, com muita luta e esforço, todo o alicerce para que a conquista deste sonho fosse possível;

A toda minha família pelo apoio de sempre;

À João Lucas que além de amigo se tornou colega de trabalho, me ajudou ativamente no desenvolvimento da pesquisa, além de todo apoio emocional duranteesses 4 anos;

A minha esposa, Alessandra Lemos, que sempre me ajudou nas traduções, apoiou e incentivou a sempre prosseguir e amadurecer tanto quanto pessoa, comoprofissional.

RESUMO

Anemia de Fanconi (AF) é uma doença rara, autossômica recessiva caracterizada por fragilidade cromossômica decorrente do defeito no sistema de reparo do DNA. A clínica da doença é heterogênea variando de pacientes assintomáticos até fenótipos mais graves que envolvem alterações na pele, baixa estatura, alterações esqueléticas e falência medular. O diagnóstico é realizado a partir do teste de fragilidade cromossômica usando agentes alquilantes como mitomicina C (MMC) e/ou diepoxibutano (DEB) ou, ainda pela identificação de mutações nos genes *FANCS*. No Brasil não existem dados epidemiológicos a respeito da doença e poucos centros realizam o teste diagnóstico de fragilidade cromossômica, que até o momento era ausente nos centros da região Nordeste. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi diagnosticar através da MMC e traçar o perfil clínico e genético dos genes *FANCS* dos pacientes pediátricos com AF do estado de Pernambuco. No período de 2018 a março de 2022, foram estudados 16 de 100 pacientes suspeitos para AF. Dentre os pacientes AF foi observado uma pequena prevalência no sexo feminino (55%), e as principais alterações clínicas foram manchas café com leite (60%) e anormalidades esqueléticas (53%). A análise de citogenética da medula óssea realizada em oito pacientes AF, mostrou em caso a trissomia clonal do cromossomo 21. O estudo molecular realizado em 6 pacientes mostrou o acometimento do gene *FANCA* em 66,6% apresentando as seguintes mutações: c.2535_2526delCT, c.4011-2A>C, c.1475A>G e c.3788_3790delTCT. O outro gene acometido foi o *FANCG* (33%) apresentando as mutações: c.1077-2A>G e c.908T>C. A partir dos dados obtidos, foi possível traçar um perfil clínico, citogenético e molecular preliminar dos pacientes do estado de Pernambuco, favorecendo com os dados epidemiológicos para a região Nordeste. A anemia de Fanconi é uma doença subdiagnosticada no Brasil e a implantação do teste diagnóstico em PE proporcionou um diagnóstico precoce, e consequentemente um melhor acompanhamento aos pacientes, garantindo um melhor tratamento e qualidade de vida.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi; Mitomicina C; Citogenética.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare autosomal recessive disease characterized by chromosomal fragility resulting from a defect in the DNA repair system. The clinical profile of the disease is heterogeneous, ranging from asymptomatic patients to more severe phenotypes involving skin alteration, short stature, skeletal abnormalities and bone marrow failure. The diagnosis is made with the chromosomal fragility test using alkylating agents such as mitomycin C (MMC) and/or diepoxybutane (DEB), or even by the identification of mutations in the FANCS genes. In Brazil, there are no epidemiological data on the disease and few centers perform the diagnostic test for chromosomal fragility, which was absent in centers in the Northeast region. Thus, the objective of this work was to diagnose by MMC and to trace the clinical and genetic profile of the FANCS genes of pediatric patients with FA in the state of Pernambuco. From 2018 to March 2022, 16 out of 100 patients suspected of FA were studied. Among FA patients, a small prevalence was observed in females (55%), and the main clinical features were café au lait spots (60%) and skeletal abnormalities (53%). The bone marrow cytogenetic analysis performed in eight FA patients showed clonal trisomy of chromosome 21. Molecular study in 6 patients showed the involvement of the FANCA gene in 66.6% with the following mutations: c.2535_2526delCT, c.4011-2A>C, c.1475A>G and c.3788_3790delTCT. Other gene affected was FANCG (33%) with mutations: c.1077-2A>G and c.908T>C. With data obtained, it was possible to draw a preliminary clinical, cytogenetic and molecular profile of patients in the state of Pernambuco, improving the epidemiological data for the Northeast region. Fanconi anemia is an underdiagnosed disease in Brazil and the implementation of the MMC test in PE provided an early diagnosis, and consequently a better follow-up to patients, ensuring better treatment and quality of life.

Keywords: Fanconi anemia; Mitomycin C; cytogenetics.

LISTA DE FIGURAS

TESE

Figura 1- Principais achados clínicos na Anemia de Fanconi.....	18
Figura 2- Mecanismo de ação NKG2D-L/NKG2D/CD8+ em resposta ao estresse oxidativo causado pelo dano de DNA.....	22
Figura 3- Vias de reparo das ICL's através da via das proteínas FANC's.....	25
Figura 4- Tipos de mutações.	30
Figura 5- Esquema exemplificando mutação em intron.....	31
Figura 6- Metáfases apresentando fragilidade cromossômica.....	33
Figura 7- Alterações cromossômicas frequentes em AF	36
Figura 8- Fluxo de diagnóstico para AF.....	37
Figura 9- Variantes cromossômicas observadas em pacientes AF+.....	38

ARTIGO 1- HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN A PATIENT WITH FANCONI ANEMIA AND VACTERL ASSOCIATION

Figure 1- A) MMC test showing chromosomal variants (radial figures and chromosome breakage being pointed out) B) Bone marrow karyotype without abnormalities (46, XY) C) Clinical features of the patient: Macrocephaly and absence of Fanconi's face. D) X-ray of the right hand showing thumb hypoplasia. E) X-ray showing hemivertebra (D12).	56
--	----

ARTIGO 2- CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF MITOMYCIN C CYTOGENETIC TEST IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL

Figure 1- Presentation of the clinical symptoms of FA. a) Hyperpigmentation on the face; b) Hypoplasia of the thumb; c) skeletal malformation in the feet.	74
Figure 2- Cytogenetic data of patient FA11. a) Karyotype showing 47,XY,+21 b) FISH showing +21.	75

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1- Grau de comprometimento medular em pacientes AF.....	20
Tabela 2- Genes diretamente relacionados na etiopatogenia da AF.....	24
Tabela 3- Composição do painel de triagem para AF da população brasileira.	39

ARTIGO 1-HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN A PATIENT WITH FANCONI ANEMIA AND VACTERL ASSOCIATION

Table 1- Result of chromosomal fragility test by MMC.....	57
Table 2- Clinical manifestations described in concomitant FA and VACTERL.	58

ARTIGO 2- CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF MITOMYCIN C CYTOGENETIC TEST IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL

Table 1- Standard values of the MMC test.....	76
Table 2- Results of the fragility test by MMC.....	76
Table 3- Clinical and demographic data of patients with FA	77

ARTIGO 3- FANCONI ANEMIA PATIENTS FROM PERNAMBUCO, BRAZIL: A NEW FOUNDER PATHOGENIC VARIANT IN *FANCA*

Table 1- Mutations found in patients with Fanconi anemia.....	88
Table 2- Identification of the variants found	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
AF	Anemia de Fanconi
ATP	Adenosina trifosfato
BRCA1	Breast Cancer Suscetibility Gene 1
CCHMC	Cincinnati children's hospital medical center
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CFS	Sitíos Fragéis Comuns
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
DEB	Diepoxibutano
DEL	Deleção
DER	Derivativo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAJC21	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C21
DUP	Duplicação
EFL1	Elongation Factor Like GTPase 1
FAAP	Fanconi anemia associated protein
FACCC	Fanconi Anemia comprehensive care center
FANCA	Grupo de complementação A
FANCB	Grupo de complementação B
FANCC	Grupo de complementação C
FANCD1	Grupo de complementação D1
FANCD2	Grupo de complementação D2
FANCE	Grupo de complementação E
FANCF	Grupo de complementação F
FANCG	Grupo de complementação G
FANCH	Grupo de complementação H
FANCI	Grupo de complementação I
FANCJ	Grupo de complementação J
FANCL	Grupo de complementação L
FANCM	Grupo de complementação M
FANCN	Grupo de complementação N
FANCO	Grupo de complementação O
FANCP	Grupo de complementação P

FANCO	Grupo de complementação R
FANCR	
FANCS	Grupo de complementação S
FANCT	Grupo de complementação T
GM-CSF	O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN- γ	Interferon Gama
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ICLS	Crosslink entre fitas de DNA
IL	Interleucina
INV	Inversão
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia mieloide Aguda
Mar	Marcador
MLPA	Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação
MMC	Mitomomicina C
MO	Medula óssea
MRE11	Meiotic recombination 11
NBS1	Nibrina
NER	Reparo por excisão de nucleotídeo
NK	Natural Killer
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RBM8A	RNA Binding Motif 8 ^a
RI	Radiação Ionizante
RPS19	Proteína ribossomal S19
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SD	Síndrome de Down
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SRP54	Signal Recognition Particle 54
SUS	Sistema Único de Saúde
TAR	Trombocitopenia e agenesia de rádio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VACTERL	Anormalidade vertebral, anal, cardíaca, traqueal, esofágica, renal e dos membros
WGS	Sequenciamento completo do genoma
WES	Sequenciamento completo do exoma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2Objetivos Específicos.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 HISTÓRICO DA ANEMIA DE FANCONI.....	16
2.2 CLÍNICA E EPIDEMIOLOGIA	17
2.3 MANIFESTAÇÕES HEMATOLOGICAS.....	19
2.4 IMUNOLOGIA.....	20
2.5 ETIOPATOGENIA	23
2.5.1 Perfil Mutacional da Anemia de Fanconi.....	29
2.6 ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NA AF.....	32
2.6.1 Fragilidade cromossômica.....	32
2.6.2 Alterações citogenéticas na MO.....	34
2.7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	37
2.7.1 Teste citogenético de fragilidade cromossômica.....	37
2.7.2 Teste de biologia molecular.....	39
2.7.3 Detecção da monoubiquitização.....	40
2.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	41
2.9 TRATAMENTO DE AF.....	43
3 ARTIGOS	
3.1 ARTIGO 1- HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN A PATIENT WITH FANCONI ANEMIA AND VACTERL ASSOCIATION.....	46
3.2 ARTIGO 2- CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF MITOMYCIN C CYTOGENETIC TEST IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL.....	59

3.3 ARTIGO 3: FANCONI ANEMIA PATIENTS FROM PERNAMBUCO, BRAZIL: A NEW FOUNDER PATHOGENIC VARIANT IN FANCA.....	78
4 DISCUSSÃO GERAL.....	90
5 CONCLUSÕES.....	93
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
· Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisaenvolvendo Seres Humanos	105
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE).....	106
ANEXO C - Carta de aceite revista ABCS HEALTH SCIENCES.....	119
ANEXO D - Carta de aceite da revista HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY	110

1 INTRODUÇÃO

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença hereditária, rara, com padrão autossômico recessivo, caracterizada por defeito no sistema de reparo no DNA. As principais apresentações clínicas consistem em presença de manchas café com leite na pele, alterações esqueléticas (em especial hipoplasia do polegar), face triangular e alterações hematológicas decorrentes da falência medular. Muitas vezes o diagnóstico é difícil de ser realizado, pois os achados clínicos se confundem com outras doenças genéticas e hematológicas, havendo necessidade de testes específicos. O diagnóstico da AF requer avaliação clínica e laboratorial, teste de fragilidade cromossômica, e estudos moleculares dos genes envolvidos no desenvolvimento na doença. Para confirmação do diagnóstico é necessário pelo menos dois desses métodos.

No Brasil, os estudos sobre a doença são escassos e apenas três centros localizados nas regiões sudeste e sul realizam o teste de fragilidade cromossômica para o diagnóstico da AF. Na região nordeste, até o momento não existia centro que realizasse o teste de fragilidade cromossômica, apesar de haver quatro centros de referência hematológica em Pernambuco que recebem pacientes com suspeitas de AF, que muitas vezes não eram confirmadas por falta do teste diagnóstico específico para doença. A limitação na realização dos testes citogenéticos e de biologia molecular para AF pelo SUS (Sistema Único de Saúde), torna a doença cada vez mais subdiagnosticada e pouco conhecida.

Assim, foi imprescindível a realização desse estudo pois estabeleceu o perfil de apresentação da doença no estado, após a implementação do teste de fragilidade cromossômica pela MMC pelo sistema único de saúde (SUS), além de possibilitar realização dos testes moleculares para buscar variantes genéticas características da região. Desse modo, este é um estudo pioneiro que vai contribuir para um diagnóstico precoce e oferecer um maior suporte para esses pacientes e melhor direcionamento e acompanhamento terapêutico, proporcionando uma maior e melhor qualidade de vida.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Descrever os aspectos clínicos e genéticos dos pacientes pediátricos portadores de AF do estado de Pernambuco.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Descrever as características clínicas e laboratoriais dos pacientes;
2. Realizar o teste de fragilidade cromossômica com mitomicina C no sangue periférico dos pacientes suspeitos de AF
3. Definir o perfil citogenético na medula óssea ao diagnóstico dos pacientes com AF pediátricos;
4. Pesquisar a presença de variantes regionais nos genes *FANC-A*, *FANC-C* e

FANC-G nos portadores de AF.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2 Histórico da Anemia de Fanconi

Em 1927, Guido Fanconi, pediatra suíço, descreveu um caso familiar de anemiagrave com macrocitose e pancitopenia envolvendo três irmãos, cujas apresentações clínicas eram microcefalia e hiperpigmentação da pele, os quais vieram a óbito entre os 5 e 7 anos de idade. Em 1931, Naegeli associou a anemia aplásica familiar com malformação congênita ao termo AF. Quarenta anos após a primeira descrição da AF, Fanconi publicou as características clínicas associadas à doença (FANCONI, 1967; AUERBACH *et al.*, 1989).

Garrida e Crosby (1959) levantaram a possibilidade das leucemias agudas serem um dos principais agravantes da AF, com a confirmação de uma maior predisposição desses pacientes a neoplasias descrita por Levy *et al.* (1974). A presença de quebras cromossômicas espontâneas foi descrita por Shroeder (1964), que 12 anos depois estabeleceu o padrão de herança autossômico recessivo da doença. Em 1982, a partir de estudos de células somáticas híbridas foi descrita uma heterogeneidade genética dos pacientes com, pelo menos, dois grupos de complementação (ZAKRZEWSKI; SPERLING, 1982).

O teste citogenético de fragilidade cromossômica para diagnóstico da AF foi desenvolvido por Auerbach *et al.* (1981), que utilizou a droga diepoxibutano (DEB), sendo ainda hoje considerado o padrão ouro. Mas Oostra *et al.* (2012) desenvolveram um protocolo similar utilizando mitomicina C (MMC) e possibilitou a detecção dos pacientes mosaicos. A análise cromossômica na medula óssea possibilitou avaliar a evolução cariótica nos pacientes com AF, sendo as primeiras alterações descritas as dos cromossomos 1 e 7 por Huret *et al.* (1988).

Os estudos moleculares permitiram a caracterização dos genes envolvidos na patogênese da doença e atualmente já foram descritos pelo menos 22 genes associados a doença, permitindo assim maiores esclarecimentos sobre o sistema de reparo do DNA para *cross-links* entre

fitas de DNA (ICLs) (SHARID et al., 2022).

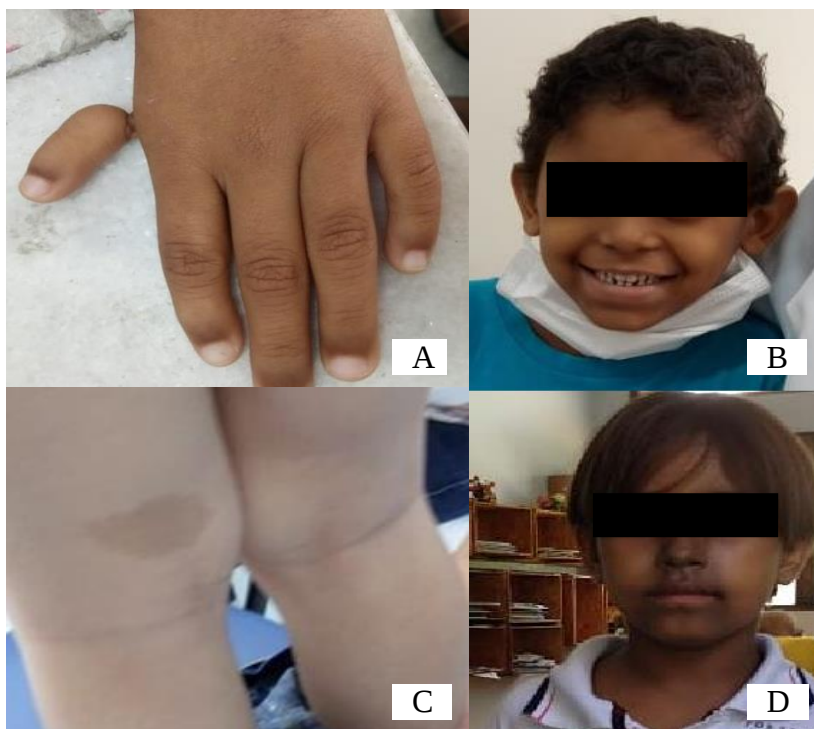
2.3 Clínica e epidemiologia

A AF é caracterizada por uma tríade composta por defeitos congênitos, falência medular progressiva e predisposição neoplásica. É uma doença de herança autossômica recessiva na grande maioria dos casos, com exceção do subtipo B que apresenta herança dominante ligada ao X (SANTOS, 2017).

O quadro clínico clássico de AF inclui pancitopenia, alterações da pigmentação cutânea (manchas café au lait), malformações esqueléticas, baixa estatura (TERESA et al., 2016) (Figura 1). Todavia, estudos realizados em pacientes com AF apontaram a presença de outros sintomas menos recorrentes como apresentações clínicas da doença: agenesia renal, microcefalia, alterações endócrinas, osteoporose, perda de audição e má formação da orelha. A AF é considerada a principal síndrome hereditária de falência medular associada à perda de audição (PINTO et al., 2016). Apesar dos achados clínicos característicos da doença, cerca de 30% dos pacientes não apresentam nenhuma característica fenotípica, sendo diagnosticado apenas após a detecção de irmãos com características clínicas (GIRI et al., 2007; ELDER et al., 2008).

Um estudo realizado na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR, de 2006 a 2015, revelou que 70 – 80 % dos pacientes portadores de AF no Brasil apresentam pelo menos uma alteração endócrina. A baixa estatura é alteração mais comum e está relacionada a insuficiência do hormônio de crescimento decorrente do hipogonadismo, mas também se destacam dislipidemias e hipovitaminose D. O fenótipo endócrino da doença ainda pode incluir intolerância à glicose, resistência à insulina e hipertireoidismo (ALVES, 2016; ROSE et al., 2012).

Figura 1. Principais achados clínicos na Anemia de Fanconi. A) Displasia de polegar. B) Implantação baixa das orelhas e orelhas em abano. C) mancha-café-com-leite. D) Hiperpigmentação de pele. Fonte: O autor.



Fonte: O autor (2022)

A anemia de Fanconi tem incidência de aproximadamente 1/200.000 – 400.000, com uma maior incidência em grupos populacionais, como os judeus asquenazes (1:30.000) e os Africânderes (1:22.000). A frequência estimada de portadores é de 1/300 em europeus e americanos, mesmo a doença sendo rara (CASTELLA *et al.*, 2011).

No Brasil poucos dados epidemiológicos que mostram a incidência da doença são encontrados, apenas um estudo realizado por Pilonetto *et al.* (2017), com 255 pacientes oriundos de todas as regiões do Brasil, mostrou que 66 (25,88%) dos casos eram originados da região nordeste. A prevalência da doença entre os sexos é contraditória, não existindo um consenso (NOWZARI *et al.*, 2001; KUTLER *et al.*, 2003). A expectativa de vida tem melhorado com um diagnóstico precoce e tratamentos multidisciplinares, incluindo o transplante de medula óssea. Atualmente a expectativa de vida de um paciente com AF é de 33 anos (MAMRAK *et al.*, 2017).

2.4 Manifestações hematológicas

Pacientes com AF geralmente desenvolvem algum grau de falência medular, resultando na deficiência de células hematológicas ou na produção de células anormais. As disfunções medulares em AF variam de discreta e assintomática citopenia à severa anemia aplástica. Os pacientes com AF apresentam um risco aumentado (500x) de evolução para síndrome mielodisplásica (SMD) e/ ou leucemia mieloide aguda (LMA). Todavia, a ausência de falha medular não exclui o diagnóstico da doença (ALTER *et al.*, 2000).

Em geral, o primeiro achado hematológico é a macrocitose, seguida de trombocitopenia e anemia (KUTLER *et al.*, 2003). Além disso, pacientes AF apresentam maior predisposição ao desenvolvimento de tumores sólidos de cabeça e pescoço, na idade adulta, sendo o genótipo FANCD1 o mais suscetível com uma probabilidade acumulativa de 97% aos 14 anos (MYERS *et al.*, 2017). Em relação ao período de surgimento dos primeiros sintomas hematológicos não há um consenso, há autores que defendem o surgimento destes na primeira década de vida e outros que indicam o seu surgimento em qualquer momento, desde o nascimento até a fase adulta (ALTER, 1992; AUERBACH, 1994; KUTLER *et al.*, 2003).

O processo que torna a medula óssea (MO) progressivamente hipoplásica foi caracterizado em três graus de comprometimento (Tabela 1) (BUTTURINI *et al.*, 1994; GUARDIOLA *et al.*, 2000). Com a instabilidade cromossômica sendo responsável por ocasionar a falência progressiva da MO, além de tornar os pacientes predispostos a neoplasias, especialmente leucemias e síndrome mielodisplásica (HURET, 2002).

Tabela 1. Grau de comprometimento medular em pacientes AF.

Graus de Comprometimento	Característica	Critérios
Grau I	Sem falha medular	Plaquetas acima de 100.000/ μ L, neutrófilos acima de 1000/ μ L; hemoglobina acima de 10 g/dL
Grau II	Falha medular inicial	Pelo menos um dos critérios: plaquetas entre 100.000/ μ L e 20.000/ μ L; neutrófilos entre 1.000/ μ L e 500/ μ L; hemoglobina menor que 10g/dl; sem necessidade de transfusões ou até 20 transfusões
Grau III	Falha medular avançada	Pelo menos um dos critérios: plaquetas abaixo de 20.000/ μ L; neutrófilos abaixo de 500/ μ L ou necessidade de mais de 20 transfusões de hemácias e/ou plaquetas

Fonte: Adaptado de GUARDIOLA *et al.* (2010)

2.5 Imunologia

A deficiência imune é bastante frequente em pacientes portadores de AF. Um estudo de coorte realizado com pacientes do *Fanconi Anemia Comprehensive Care Center* (FACCC) no *Cincinnati Children's Hospital*

Medical Center (CCHMC) mostrou uma diminuição do número e função de células B e natural killer (NK). O estudo observou também mudanças quantitativas em células T CD4⁺, além de anormalidades funcionais de células T, demonstrada por resposta antigênica e função CTL reduzidas (MYERS *et al.*, 2017).

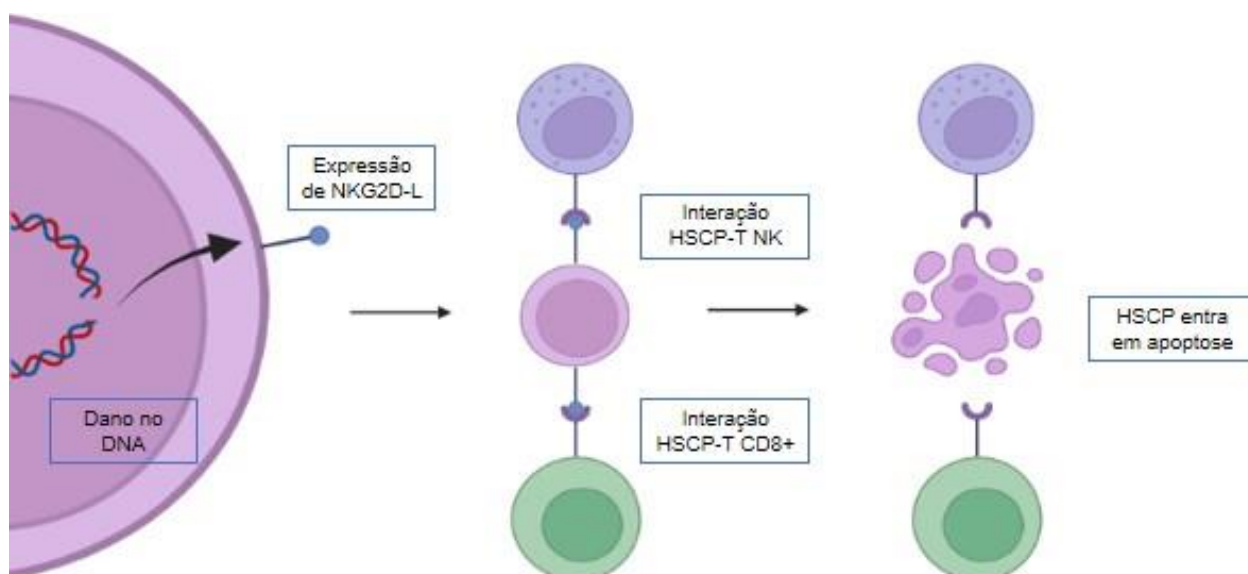
A resposta imune, dependente de p53, é uma das principais vias de resposta ao estresse e ao dano no DNA e está relacionada com envelhecimento hematopoiético e manutenção das células tronco hematopoiética e células progenitoras (HSPC), portanto o desequilíbrio neste mecanismo pode levar a instabilidade genômica, falência progressiva da medula óssea e neoplasias hematológicas (BLANPAIN *et al.*, 2011). Ceccaldi *et al.* (2012) analisaram os níveis de p53/p21 em pacientes AF e relataram que diminuição nos níveis de expressão da p53 permite a replicação das células com instabilidade genômica, sugerindo que defeito no mecanismo de ativação da p53, decorrente de danos celulares, não reparados, pode ser uma via de sinalização comum para as doenças de falência medular.

Casado *et al.* (2022) testaram a hipótese de que células tronco hematopoiéticas e células progenitoras expressam moléculas de estresse oxidativo associando ao dano no DNA, um exemplo desta molécula é o ligante D2 das células natural killer (NKG2D-L) que quando integrado ao seu receptor (NKG2D) ativa células T NK e CD8⁺ citotóxicas. E confirmou que o aumento de células HSCP expressando o NKG2D-L é inversamente proporcional ao número de CD34⁺ na MO. Mostrando que o aumento de células NKGD2⁺ pode causar depleção progressiva das células HSPC de pacientes AF (Figura 2). Sendo assim, as células NK podem ser uma causa a jusante da falência medular observada em AF (DULMOVIST; OLSO, 2022).

Outras alterações imunológicas encontradas nesses pacientes são os elevados níveis de citocinas pró inflamatórias. Dufour *et al.* (2003) relataram *in vitro* o aumento de níveis de TNF- α , IFN- γ em células AF, além de observar que outros moduladores negativos da hematopoiese como MIP-1 e ligante não sofrem alteração dos seus níveis. Em contraponto, baixa produção de interleucinas (IL), incluindo IL1, IL2 e IL6, assim como GM-CSF

também foram observadas em AF (MYERS *et al.*, 2017).

Figura 2. Mecanismo de ação NKG2D-L/NKG2D/CD8+ em resposta ao estresse oxidativo causado pelo dano de DNA.



Fonte: O autor (2022)

Experimentos realizados com camundongos com anemia de Fanconi do subtipo FANCC mostraram além da resposta inflamatória anormal, uma diminuição na produção de monócitos/macrófagos. Também foi possível observar uma redução na mobilidade, adesão aos tecidos e função fagocítica dessas células, as quais os autores atribuíram à desestruturação de seu citoesqueleto (LIU *et al.*, 2012).

Com os avanços do tratamento e melhoria dos achados hematológicos, as infecções surgem como principal complicação clínica, decorrente da imunodeficiência ocasionada pela doença. Sendo as infecções bacterianas e fúngicas as principais causas de morte, principalmente quando essas infecções são decorrentes de neutropênias, pois geralmente, são pouco toleradas e de difícil tratamento (ZEN *et al.*, 2011).

2.6 Etiopatogenia

A etiopatogenia da AF é baseada na formação de *cross-link* entre fitas de DNA (ICLs) que pode ter causas exógenas, pela ação de drogas clastogênicas e a radiação ionizante, ou causa endógenas, pela presença de estresse oxidativo e formação de aldeídos, provenientes de alimentos ou do metabolismo celular (JOENJE *et al.*, 1981; LANGEVIN *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2019). As ICLs levam a pontos de bloqueio da transcrição e da replicação, causando deleções e quebras, que consequentemente podem ocasionar uma diminuição no número de células, por apoptose, daquelas que não conseguiram efetuar o reparo corretamente, ou mesmo causarem neoplasias (DEANS; WEST, 2011).

O processo de reparo das ICLs é complexo, sendo realizado durante as fases S e G2 do ciclo celular, e inclui a ação cooperativa das vias de reparo do DNA: das proteínas AF, do reparo por excisão, recombinação homologa e síntese translesão (NIEDZWIEDZ *et al.*, 2004; HIRANO *et al.*, 2005). Sendo assim, cerca de 62 genes atuam no reparo das ICLs e de forma direta ou indireta, mutações nesses genes podem estar relacionados com a falha de reparo no DNA. Existem 22 genes diretamente relacionados com a anemia de Fanconi, sendo denominados *FANCs* (Tabela 2) (Moreno *et al.*, 2021).

O produto desses genes são proteínas que atuam diretamente no mecanismo de reparo do DNA, desde a fase de reconhecimento da lesão, até o processo de reparo final. Algumas destas proteínas também atuam como sinalizadores de resposta imune (LIU *et al.*, 2020). A tabela 2 apresenta os 22 genes envolvidos diretamente na etiologia da AF e sua localização cromossômica.

Tabela 2. Genes envolvidos diretamente na etiopatologia de AF

Abreviatura	Localização cromossômica
<i>FANCA</i>	16q24.3
<i>FANCB</i>	Xp22.31
<i>FANCC</i>	9q22.3
<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12.13
<i>FANCD2</i>	3p25.3
<i>FANCE</i>	6p21.22
<i>FANCF</i>	11p15
<i>FANCG</i>	9p13
<i>FANCI</i>	15q26.1
<i>FANCJ/BRIP1</i>	17q23.2
<i>FANCL</i>	2p16.1
<i>FANCM</i>	14q21.3
<i>FANCN/PALB2</i>	16p12
<i>FANCO/RAD51C</i>	17q23
<i>FANCP/SLX4</i>	16p13.3
<i>FANCQ/ERCC4</i>	16p13.12
<i>FANCR/RAD51</i>	15q15.1
<i>FANCS/BRCA1</i>	17q21.31
<i>FANCT/UBE2T</i>	1q32.1
<i>FANCU/XRCC2</i>	7q36.1
<i>FANCV/REV7</i>	1p36.22
<i>FANCW/RFWD3</i>	16q23.1

Fonte: adaptado de Santos (2017).

O processo de reparo inicia com o reconhecimento da lesão pela FANCM, que associada a *Fanconi anemia-associated protein 24* (FAAP24) e as proteínas de dobrade histona FAAP16 (MHF1) e FAAP10 (MHF2), se ligam à ICL e funciona como um ponto de ancoragem do complexo principal AF. O complexo principal AF é formado por 14 proteínas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FAAP100, FAAP10, FAAP16, FAAP20 e FAAP24) e realiza a monoubiquitinação das proteínas FANCD2 e FANCI (ID2 complex) através da sua subunidade ubiquitinaligase FANCL e a enzima ubiquitina-conjugante UBE2T (FANCT) (Figura3).

antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), monoubiquitinado pela enzima RAD18, promove o recrutamento da FANCD2 e a ativação da FANCL (GENG *et al.*, 2010; CHEUNG;TANIGUCHI, 2017). O FANCI tem papel crucial nesse complexo, atuando como uma helicase no processo de reparo de dano de fita dupla do DNA (DATTA e BROSH, 2019).

Pacientes que apresentam alteração na proteína FANCD2 possuem o complexo principal AF normal e funcional, porém não conseguem localizar a ICL. Enquanto defeitos na proteína FANCD2 impedem que a proteína FANCD2 se ligue corretamente na fita lesionada, e consequentemente que o complexo principal AF seja recrutado para correção da ICL (KIM *et al.*, 2008). É importante salientar que o principal caminho para reparo das ICL'S através da enzima NEIL3, que age de maneira rápida e direcionada. Quando essa via não consegue reparar o dano, é inativada para que a via FA/FANCD2 possa ser ativada. Quando esse dano é causado pela MMC, observa-se que a via NEIL3 atua de maneira dependente da via FA/FANCD2 (LI *et al.*, 2020).

Na via FA/FANCD2 a monoubiquitinação da proteína FANCD2 leva a sua relocação de um compartimento nuclear difuso a um local contendo a proteína BRCA1(FANCS) em uma via comum de reparo. Ao final do reparo a proteína pode ser desubiquitinada e reaproveitada (GARCIA-HIGUERA *et al.*, 2001). A maneira como a ubiquitinação e desubiquitinação de FANCD2/FANCI realmente contribui para o reparo das ICL'S e da manutenção da estabilidade do genoma ainda é pouco entendida. Mas Alcon *et al* (2020) mostraram que o complexo ID2 funciona como um grampo que é preso no DNA através da ubiquitina, gerando assim interfaces distintas para recrutar outros fatores de reparo de DNA. Mas salientou que para o processo de reparo de DNA ser completo e eficaz é necessário que ocorra a desubiquitinação do ID2, caso contrário o complexo ID2 fica bloqueado na fita, gerando uma sinalização incorreta de sítios lesados que devem sofrer reparo por incisão de base ou pode se tornar um obstáculo para as helicases que agem na replicação e transcrição do DNA.

O processo independente de ubiquitinação de FANCI e FANCD2 é bastante interligado, pois a ubiquitinação de FANCI protege a ubiquitina do FANCD2 da ação de USP1 – UAF1 que atuam como proteases específicas da ubiquitina (RENNIE *et al.*, 2020). Assim como a ubiquitinação de FANCD2 é

necessária para a iniciação e manutenção das atividades de FANCI (LEMONIDIS *et al.*, 2021).

As funções de reparo do complexo AF não se limitam apenas às ICLs. A exemplo, a técnica de edição de genoma CRISPR-Cas9 em células humanas envolve a quebra seletiva de dupla cadeia de DNA que requer reparo da fita, para o qual é necessário a incorporação de DNA endógeno via reparo de modelo de cadeia simples. Esse reparo no DNA é mediado pela via AF, logo, sem o conhecimento da funcionalidade da via de reparo do DNA mediado pelas proteínas FANCS pesquisas nessa área não seriam possíveis (RICHARDSON *et al.*, 2018).

Além das funções no reparo das ICLs, as proteínas FANCC também desempenham funções fora do Complexo AF que contribuem para patogenicidade molecular. Estas funções estão relacionadas com resposta inflamatório, estresse oxidativo, produção de aldeídos endógenos, mitofagia e desenvolvimento hematopoietico (BAGBY, 2018). Experimentos desenvolvidos por Sumpter *et al.* (2016) demonstraram que a proteína FANCC tem atividade citoplasmática seletiva na autofagia, e dessa forma, no controle de organelas. Os autores notaram ainda que a proteína tem importante atividade na virofagia, funcionando como marcador de nucleocapsídeo, o que pode explicar uma maior suscetibilidade de pacientes FANCC⁻ a infecções. Além disso, o estudo mostrou que as proteínas FANCA, FANCL, FANCF, FANCD2 e BRCA1 e 2 desempenham um papel importante na atividade autofágica seletiva. Assim como, atuam também como moduladores de sinalização de resposta a citocinas.

Pacientes AF⁺ tendem a ser hipersensíveis a certas citocinas como TNF- α e INF- γ e sua superprodução pode ser um fator de causa endógena de dano ao DNA (GARAYCOECHEA; PATEL, 2013). Brégnard *et al.* (2016) mostraram também que a ausência da proteína FANCP leva ao aumento da transcrição e retro transposição de DNA imunogênico, que em seguida é transportado para o citoplasma e ativa a via cGAS-STING induzindo a superprodução de proteínas pró-inflamatórias.

Dubois *et al.* (2019) analisaram a FANCI em camundongos em diversos processos que são expressos fenotipicamente nos pacientes AF, como por exemplo, a falência medular, deficiência no desenvolvimento e a

presença de alterações esqueléticas. Os autores observaram que a proteína FANCI está presente na embriogênese e quando ausente ou não funcional acarreta retardo no desenvolvimento e alterações esqueléticas, além de diminuir a capacidade de reconstruir o sistema hematopoiético. Os autores relataram também que o complexo formado pela interação de FANCI e RAD51 atua diretamente no processo de recombinação meiótica.

Oka et al. (2020) relataram que mutações no gene *ALDH2* (localizado no cromossomo 12q24.12), responsável pela enzima acetaldeído desidrogenase 2, combinado com mutações no gene *ADH5* (localizado no cromossomo 4q23), responsável pela enzima álcool desidrogenase 5, está relacionado a redução da capacidade de diferenciação da célula hematopoiéticas (progenitora e derivadas), sugerindo assim que a deficiência no processo de desintoxicação de aldeídos causa um grande número de anormalidades hematopoiéticas. Estudo realizado por Takayo et al. (2022) corrobora com essa hipótese ao relatar um paciente com variante *ALDH2* que desenvolveu falência medular precoce.

A relação da AF com o câncer foi reafirmada quando Shen et al. (2015) mostraram que alterações genéticas nos genes AF aparecem em grande quantidade em células cancerígenas de pacientes AF negativo. Além disso, a super ativação da via AF leva a perda da atividade supressora de tumor, e conseqüentemente à carcinogênese. Partindo do pressuposto que a instabilidade genômica e desregulação do ciclo celular estão diretamente associados a desenvolvimento de células cancerígenas, e que os pacientes com AF possuem tanto instabilidade genômica como ciclo celular anormal, o estudo realizado por Liu et al. (2020) investigou a via reparo do DNA dos genes *FANCs* como potencial alvo terapêutico para o câncer, principalmente na fase inicial.

Os primeiros estudos realizados demonstraram que células AF apresentam uma fase G2/M mais lenta que células normais, e que essa lentidão era provocada pela falha da célula em tentar reparar o DNA (ELMORE; SWIFT, 1975; DUTRILLAUX; FOSSE, 1976). Porém, no trabalho realizado em 2012 apontou que, devido a superativação das proteínas p21 e p53 que normalmente cooperam junto com a proteína FANCG e FANCD2

para supressão de tumor, apresentam um atraso na fase G1/G0 do ciclo celular. Essa ativação exacerbada da proteína p53, face aos danos no DNA, também leva a depleção das células tronco hematopoiéticas dos pacientes AF, e que esse quadro se inicia ainda na fase embrionária, no momento de formação do *pool* de células hematopoiéticas progenitoras (CECCALDI *et al.*, 2012).

Outro estudo recente descreveu um novo mecanismo regulador, específico do ciclo celular, da proteína FANCD2 que garante a fidelidade mitótica. Neste mecanismo foi identificada uma CDK reguladora fosforilada (S592) próxima ao local de monoubiquitinação de FANCD2. A fosforilação S592 mediada por CDK promove a monoubiquitinação na fase S do ciclo celular e esse processo é requerido para garantir a conclusão de maneira eficiente da replicação e da estabilidade cromossômica (CANTRES-VELEZ *et al.*, 2021). A ubiquitinação do complexo ID2 parece ser o ponto central do mecanismo de reparo ao dano no DNA, e além de ser a principal via para reparos DSB, também está envolvido no reparo das ICL'S e reparo por excisão de base (REB) (SUSUKI *et al.*, 2017).

2.6.1 Perfil mutacional da Anemia de Fanconi

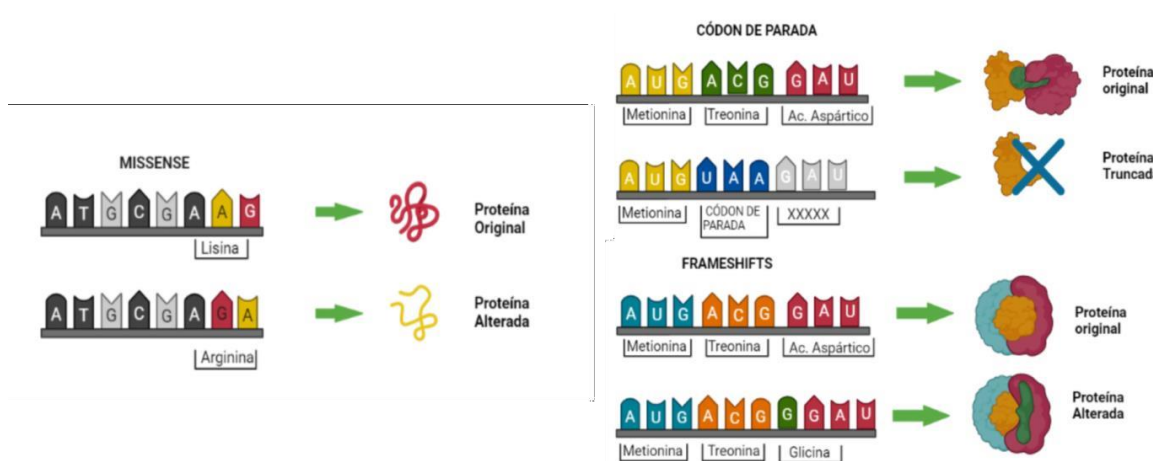
A anemia de Fanconi apesar de possuir 22 genes relacionados a sua etiopatogenia, possui cerca de 90% das mutações relatadas em apenas três genes: *FANCA* (65%), *FANCC* (20%) e *FANCG* (10%). Estes genes produzem produtos proteicos que atuam principalmente como parte do complexo principal da via FA/FANCD2 (FARJADO *et al.*, 2022).

O perfil das mutações encontradas incluem: as que geram produtos proteicos diferentes (*missense* e deleções *in-frame*), as que impedem a formação da proteína funcional (*frameshifts*, códon de parada e grandes deleções) e as que afetam o *splicing* (mutações em aceptores de *splicing*). As mutações *missense* são caracterizadas por uma troca de base nitrogenada, gerando assim um aminoácido diferente. Enquanto a *frameshifts* acontece uma inserção ou deleção de base nitrogenada em números não múltiplos de três, acarretando alteração na matriz de leitura que pode resultar em produto gênico diferente ou ausência de produto.

Mutação do tipo códon de parada antecipa o aparecimento do códon de parada, gerando assim uma proteína truncada (Figura 4). Recentemente, mutações em 12 genes que atuam na biogênese ribossomal foram encontradas em pacientes AF, sendo está, atualmente considerada uma ribossomopatia (GUEIDERIKH et al., 2022).

O gene *FANCA* está localizado no cromossomo 16q24.3, possui 43 éxons e gera uma proteína com 1455 aminoácidos. Já foram identificadas 666 variantes neste gene (ALI et al., 2021). Dentre as 666 variantes são observadas mutações de todos os tipos. Grande parte de mutações *missenses* em *FANCA* causa alteração funcional na proteína, fazendo com que não ocorra a dimerização da *FANCA*, ocasionando a montagem de um complexo principal AF simétrico duplo que se prevê ser inativo (CASTELLA et al., 2011; WANG et al., 2021). Sharid et al. (2022) fizeram análises *in silico* de mutações *missenses* nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*, relatando 16 variantes no *FANCA*, seis no *FANCC* e uma variante no *FANCG* que foram consideradas altamente deletérias. Bottega et al. (2018) analisaram o efeito das mutações *missenses* na atividade mitocondrial e concluíram que a proteína *FANCA* alterada tem uma influência negativa na eficácia da mitofagia acarretando acúmulo de mitocôndrias alteradas.

Figura 4. Tipos de mutações. Mutação tipo Missense onde ocorre a troca na ordem de um nucleotídeo, formando assim uma proteína alterada. Mutação tipo códon de parada ocorre quando um nucleotídeo é trocado por outro e ocorre a formação de um códon de parada precoce, tendo como resultado uma proteína truncada. Mutação tipo Frameshifts é caracterizada pela inserção de um novo nucleotídeo, alterando assim a matriz de leitura e ocasionando uma proteína alterada.



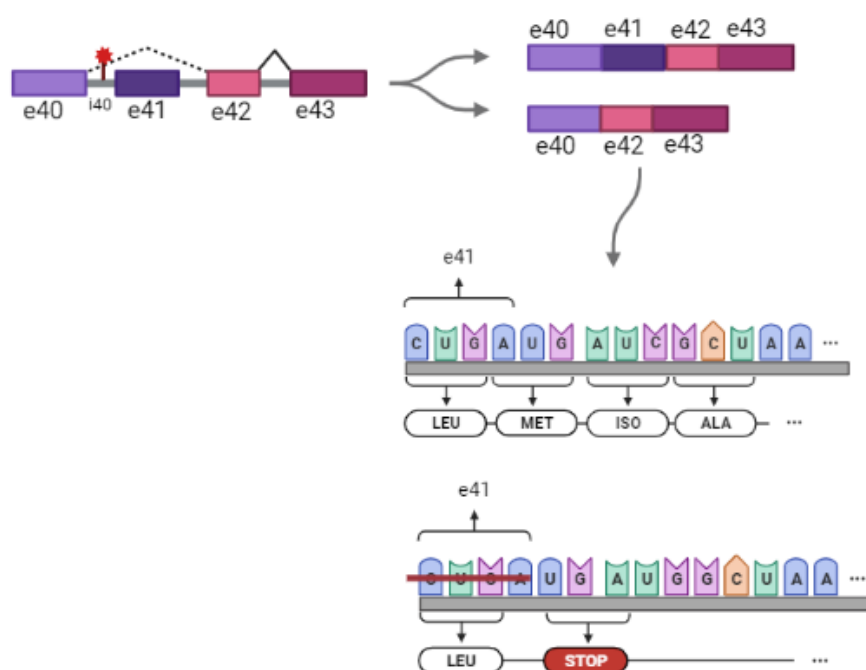
Fonte: O auto(2022)

Diferente das mutações *missenses*, as mutações do tipo *frameshift* acarretam a ausência de produção da proteína FANCA (Balta *et al.*, 2000). Os autores relataram a mutação 3639delT, onde ocorre a deleção de uma timina na posição 3639 do éxon

37. Mutações que alteram o *splicing* vêm sendo cada vez mais relatadas em introns e associadas a variantes patogênicas causadoras de AF, muitas delas acarretam a falta de leitura do éxon seguinte, mudando assim toda a matriz de leitura na tradução (BARALLE, 2005; REPCZYNSKA *et al.*, 2022).(Figura 5)

O gene *FANCG* está localizado no cromossomo 9p13, possui 14 éxons e gera um produto proteico com 622 aminoácidos. Atualmente 77 variantes são relatadas e dentre as variantes são encontradas mutações de todos os tipos. Mutações em sítios aceptores de *splicing* também vêm sendo cada vez mais relatadas (REYES *et al.*, 2022). Assim como a proteína FANCA, a proteína FANCG faz parte do core principal de atuação da via AF, e a presença de mutações no gene *FANCG* tendem a gerar uma proteína truncada em 80% dos casos (DEMUTH *et al.*, 2000).

Figura 5. Esquema exemplificando mutação em intron que causa a não leitura de um éxon, acarretando alteração no *splicing*.



Fonte: O autor (2022)

O gene *FANCC* é localizado no cromossomo 9p22.35, possui 25 éxons e produz uma proteína com 558 aminoácidos. Até o momento, 377 variantes foram relatadas, e destas, 23 têm efeitos benignos, 36 possuem efeitos patogênicos e o restante possui efeito incerto. O gene *FANCC* possui mutações de todos os tipos relatada. A mutação IVS4+4A>T em *FANCC* é associada a um fenótipo mais severo de AF quando em homozigose, e a um fenótipo mais leve quando em heterozigose. (AFTAB *et al.*, 2017).

2.7 ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NA AF

2.7.1 Fragilidade Cromossômica

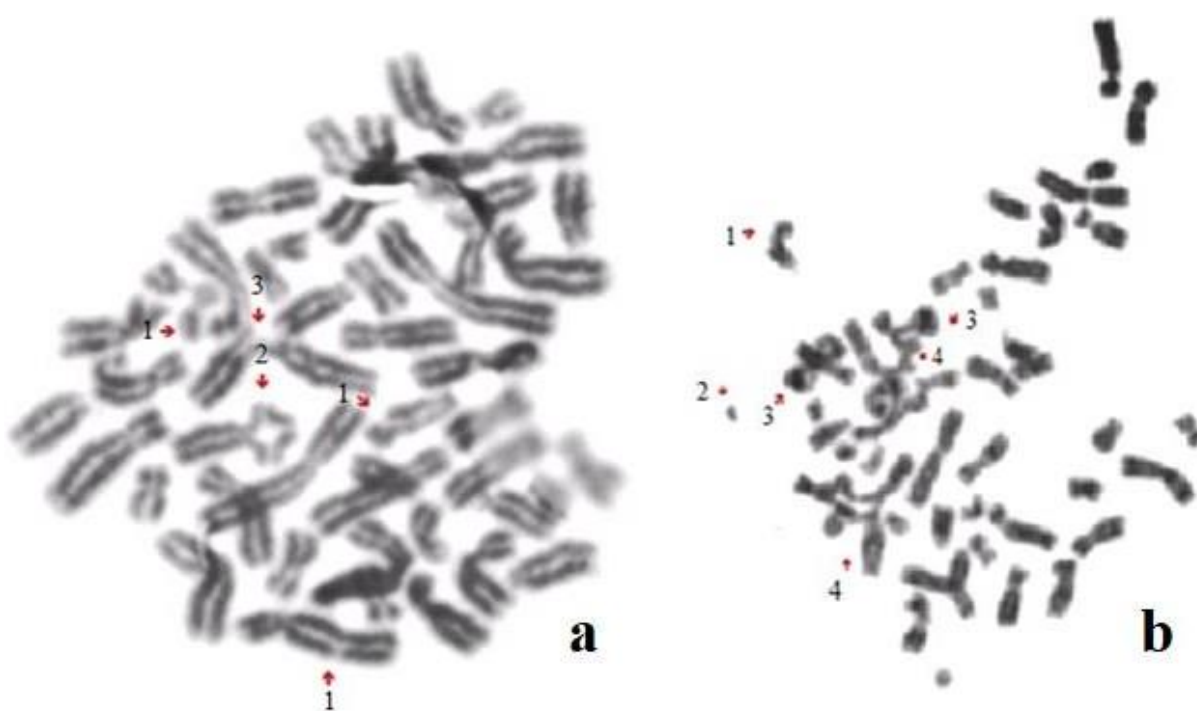
As primeiras alterações citogenéticas de AF foram descritas por Schroeder *et al.* (1964), onde foi observado a presença de quebras, de falhas de cromátides, de cromossomos, e presença de fragmentos cromossômicos, que ocorriam espontaneamente, confirmando a instabilidade cromossômica da doença (Figura 5). Mais tarde, os mesmos autores realizaram um estudo comparativo entre AF e Síndrome de Bloom, ambas síndromes de fragilidade cromossômica, com apresentações citogenéticas espontâneas sutilmente diferentes (SCHROEDER *et al.*, 1974). Mas a anemia de Fanconi, devido a maior dificuldade de reparo das ICLs apresentavam uma maior quantidade de figuras radiais e trocas de cromátides nível $\geq V$ (envolvendo um número maior de cromossomos não homólogos).

A fragilidade cromossômica característica da doença é altamente associada ao nível de saturação de oxigênio (JOENJE *et al.*, 1981). Ponte *et al.* (2012) relataram que células AF+ tratadas com ácido lipóico e N-acetilcisteína, ambos antioxidantes, apresentaram uma drástica diminuição na fragilidade cromossômica. No ano seguinte, Cappelli *et al.* (2013), mostraram a presença de defeitos na função respiratória da mitocôndria, levando a baixa produção de

adenosina trifosfato (ATP) e aumento do estresse oxidativo da célula. Devido a esses estudos, Ravera *et al.* (2018) sugeriram que a fragilidade cromossômica dos pacientes portadores de AF se deve ao alto nível de estresse oxidativo nas células, associada a deficiência do sistema de reparo de DNA provocada pela doença.

Aproximadamente 30% das células hematológicas conseguem reverter essa fragilidade, levando a apresentação da doença como um mosaico no tecido hematopoiético, com algumas células apresentando variantes cromossômicas e outras normais (KWEE *et al.*, 1983). Este mecanismo representa uma dificuldade nas técnicas diagnósticas que utilizam agentes alquilantes no sangue periférico, podendo levar a identificação de falsos negativos. Por conta disso, é indicado que casos com clínica compatível a AF e teste de fragilidade realizado em sangue periférico negativo, repitam o teste de fragilidade em células de fibroblastos, onde não ocorre reversão (OOSTRA *et al.*, 2012).

Figura 5. Metáfases apresentando fragilidade cromossômica. Em (a) Quebras (1), Figura quadrirradial (2) e Rearranjo (3); e em (b) Quebra (1), Fragmento (2), Cromossomos em anel (3) e Rearranjo (4).



Um caso de gêmeas monozigóticas para a mutação no gene *FANCA* foi descrita por Mankad *et al.* (2006), as quais não apresentaram comprometimento medular até os 28 anos devido à capacidade de reversão dessas alterações. Os autores chamaram o mosaicismo de terapia gênica natural, e apontou o caso como comprovação de possibilidade de terapia gênica na doença.

A fragilidade cromossômica também parece ser afetada por bioflavonoides. Partindo do pressuposto que bioflavonoides são inibidores naturais da enzima topoisomerase II, Galeano e Guevara (2007) testaram cinco flavonoides (baicaleína, miricetina, quercetina, fisetina e kaenferol) e dois isoflavonoides (genisteína e genistina) como agentes estimulantes da fragilidade cromossômica em células de paciente AF, onde foi relatado que as culturas que receberam os bioflavonoides obtiveram um aumento considerável no número de variantes cromossômicas (62% genisteína; 56% genistina; 55% Fisetina e 46% Kaenferol) quando comparado ao controle.

O estudo realizado por Filipović *et al.* (2016), envolvendo análises molecular e citogenética de células de pacientes com AF em diferentes estágios da doença, demonstrou que os pontos de quebra mais comuns estão relacionados aos sítios frágeis comuns (CFS) dos cromossomos, e que sua distribuição está ligada ao grau de severidade da doença. Além disso, foi demonstrado que a maior susceptibilidade dessas células de formarem figuras radiais e rearranjos está relacionada ao aumento do encurtamento dos telômeros, que aumentam com a progressão da doença.

2.7.2 Alterações Citogenéticas na Medula Óssea

Os primeiros estudos citogenéticos realizados na medula óssea de pacientes AF não encontraram alterações cromossômicas (BLOOM *et al.*, 1966; DOSIK *et al.*, 1970, SCHROEDER *et al.*, 1974). Enquanto estudos realizados em pacientes com quadro hematológico mais grave e em evolução para neoplasias hematológicas, frequentemente apresentam alterações cromossômicas, mas curiosamente essas alterações não

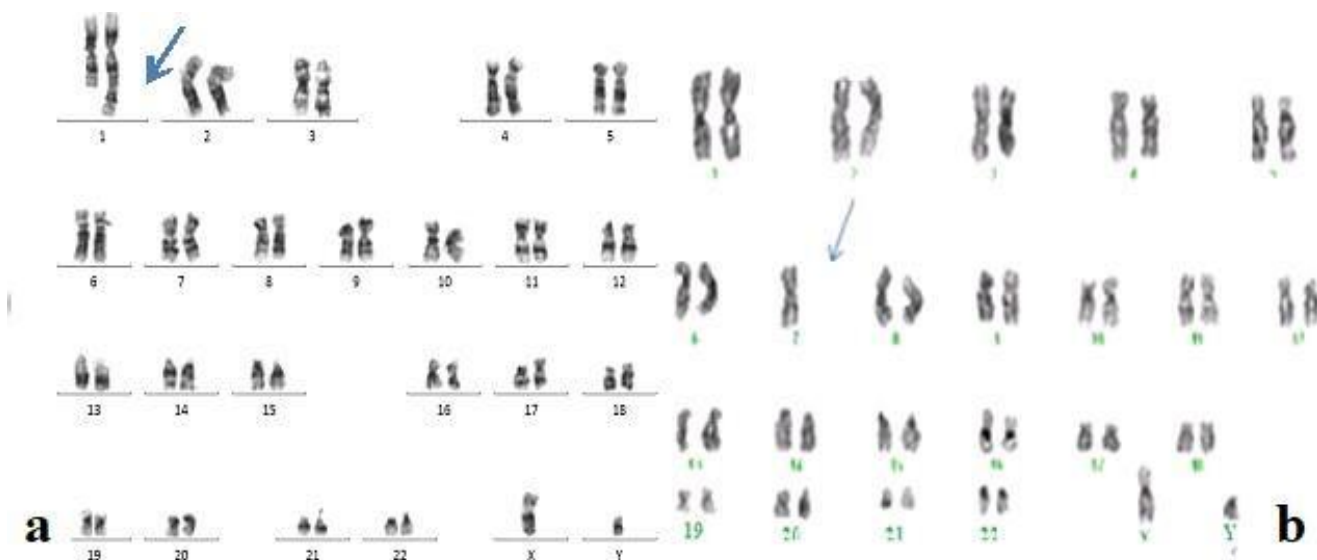
ocorrem envolvendo regiões dos oncogenes específicos (genes FANCs) (AUERBACH, 1992)

Os pacientes AF possuem elevado risco de desenvolver malignidades hematológicas, principalmente SMD e LMA, esta evolução da doença muitas vezes pode ser percebida através da análise do cariótipo da MO, pois estes pacientes em evolução tendem a apresentarem alterações cromossômicas clonais (NOWELL; BESA, 1989). Diversos estudos em pacientes leucêmicos ou com SMD secundária a AF descreveram alterações cromossômicas clonais sinalizando a evolução da doença, cujo prognóstico é desfavorável ao paciente. Huret *et al.* (1988) ao realizarem uma avaliação de evolução cariotípica em uma paciente AF com leucemia, perceberam a presença de alterações clonais recorrentes, sendo as mais comuns a monossomia do cromossomo 7(-7), duplicações e deleções em 1q e 3q. Alguns clones têm comportamentos incertos com desaparecimento, surgimento e evolução ao longo do tempo. Também analisando pacientes AF que evoluíram para SMD e LMA, Korgaonkar *et al.* (2010) relataram 5 pacientes indianos com cariótipos alterados que envolviam dup(1q), -7 e +10.

Em um estudo com 57 pacientes AF em evolução para SMD/LMA, Quentin *et al.* (2011) observaram que os principais cromossomos envolvidos foram os 1, 3 e 7, mas também relataram alterações no cromossomo 21, inclusive alteração críptica envolvendo o gene *RUNX1*(21q22). Berger *et al.* (1975) também relataram um paciente AF com trissomia livre do cromossomo 21. Enquanto Veiga (2009) relatou dois pacientes apresentando monossomia do cromossomo 21.

Alterações citogenéticas em 73 pacientes AF após transplante de MO foi descrito por Wang *et al.* (2018). Desses, 16 apresentaram alterações, sendo as mais comuns duplicações no braço longo dos cromossomos 1 e 3, e deleções, ou monossomia envolvendo o cromossomo 7. Nesses estudos, os pacientes com alterações no cromossomo 3 apresentaram pior prognóstico em relação aos outros pacientes estudados. A figura 6 mostra as alterações frequentes observadas em pacientes AF.

Figura 7 Alterações cromossômicas frequentes em AF. a) Cariótipo 46,XY,der(1)dup(1q12~1q43); b) Monossomia do cromossomo 7 (46,XY,-7).



Fonte: O autor (2022)

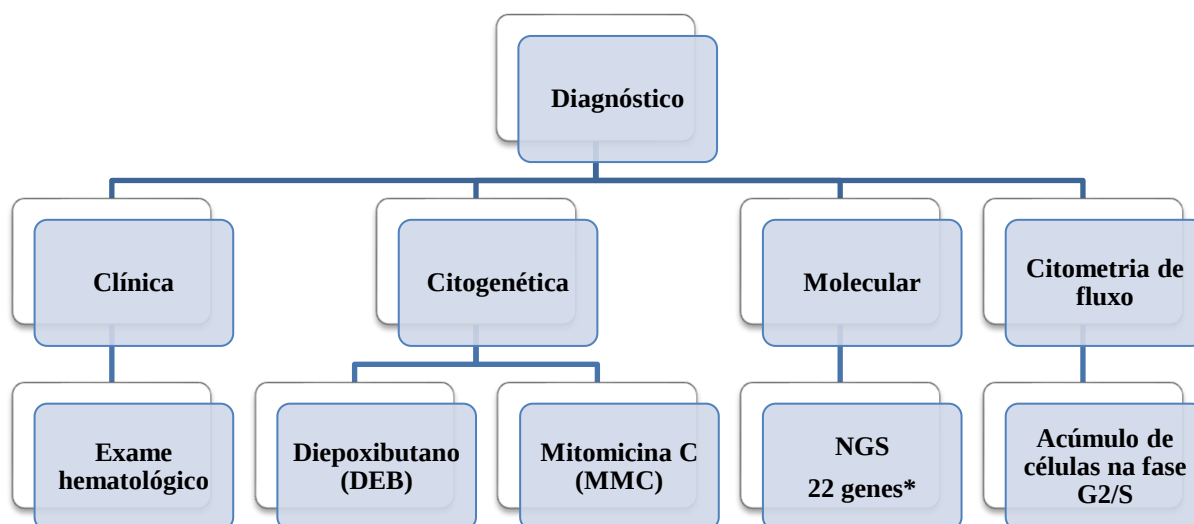
Outras alterações, menos frequentes, também são relatadas em pacientes em evolução. Sugita *et al.* (2000) relataram a t(11;16)(q23;p13) em um paciente que evoluiu para LLA. Borges *et al.* (2017) descreveram três novas alterações cariotípicas na evolução da AF: der(1)t(1;3)(p35.2;p22.3-p23); der(11)t(11;21)(q25;q21),del(11)(q14q23);e der(2)t(2;20)(q13.1;q13.1q13.2),del(5)(q12.3q13.3),der(13)t(13;17)(q34;q21.2),der(17)(:q11.1>q21),der(20)t(17;20)(q11.1;q13.1-q13.2). Todas as alterações envolviam cromossomos relacionados à evolução leucêmica. Contudo as regiões cromossômicas dos 22 genes *FANC's* foram raramente envolvidas.

Pollard *et al.* (2022) estudaram 14 casos AF, onde 12 tiveram cariótipo normal e dois tiveram cariótipos alterados. Nestes dois últimos havia um paciente com clone estável: 46,XY,dup(12)(q15q13)[5], alteração essa incomumente observada na AF e o outro paciente possuía evolução biclonal com os clone 46,XY,del(20)(q11.2q13.1)[3] e 46,XY,del(7)(q22)[4]. O paciente que apresentou o clone em evolução era dependente de transfusão.

2.8 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico de AF é complexo pelo fato de ser uma doença com sintomas heterogêneos e comuns a diversas outras doenças genéticas. Portanto, dois ou mais métodos para confirmação da doença devem ser realizados. Os principais métodos são: citogenética, biologia molecular e citometria de fluxo. Esses métodos devem sempre ser associados com a clínica do paciente para confirmação do diagnóstico (Figura 7) (AUERBACH, 2009).

Figura 8. Fluxo de diagnóstico para AF.



Fonte: O autor (2022)

2.8.1 Teste Citogenético de Fragilidade Cromossômica

O teste citogenético de fragilidade cromossômica é baseado na principal função do complexo FA-BRCA que é atuar no reparo das ICLs. Desta forma as células dos pacientes com AF são hipersensíveis á agentes indutores de danos ICL's, como os alquilantes. Esta sensibilidade é a base do diagnóstico citogenético da AF, e a exemplo desses agentes clastogênicos, temos o Diepoxibutano (DEB) e a Mitomicina C (MMC) (AUERBACH, 1993; OOSTRA *et al.*, 2012).

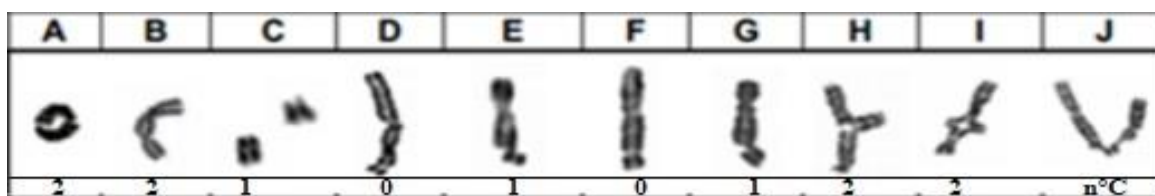
O principal agente utilizado é o DEB, considerado o padrão ouro para o diagnóstico da AF, porém este composto é altamente cancerígeno e

volátil, requerendo equipamentos de segurança mais complexos para o seu manuseio. Além disso, em contato com a água ele perde lentamente sua atividade, com um tempo de meia vida de aproximadamente 4 dias. Um composto químico alternativo para o teste de fragilidade cromossômica é a MMC, que apesar de algumas limitações como necessidade de precisão na concentração utilizada para não gerar resultados falsos positivos e a possibilidade de formação de monoaductos. Entretanto, é menos tóxica e menos volátil que o DEB, tem um maior tempo de meia vida e apresenta desempenho semelhante. Além disso, o teste utilizando a MMC tem a capacidade de diagnosticar mosaicos, o que é impossibilitado com o uso do DEB (OOSTRA *et al.*, 2012). Um método recentemente publicado utiliza a análise citogenética, através da radiação ionizante (RI) como agente clastogênico da fragilidade cromossômica, sendo assim um teste complementar (AMARAL *et al.*, 2019).

Na análise do teste de fragilidade cromossômica com agente alquilantes (DEB ou MMC) adicionados ao meio de cultura contendo o material biológico do paciente, após a cultura *in vitro*, são obtidas metáfases para avaliar o índice de fragilidade cromossômica e a porcentagem de células com fragilidade. Este índice é calculado através da presença de variantes cromossômicas que tendem aparecer em portadores AF (OOSTRA *et al.*, 2012).

Para o cálculo deste índice, valores são atribuídos a cada variante encontrada. As principais são: figuras quadri e trirradiais (2 pontos), quebras de cromossomos (1 ponto), fragmentos (1 ponto), rearranjos (é contado o número de centrômeros envolvidos), cromossomo em anel (2 pontos) e cromossomos dicêntricos (2 pontos). Falhas de cromátide e cromossomos não são computadas por serem frequentes em culturas controle induzidas com agentes alquilantes (Figura 8) (OOSTRA *et al.*, 2012).

Figura 9. Variantes cromossômicas observadas em pacientes AF+ com sua respectiva pontuação. A) cromossomo em anel B) dicêntrico C) Fragmentos D) falha de cromátide E) quebra de cromossomo F) falha de cromossomo G) quebra de cromátide H) figura trirradial I) figura quadriradial J) rearranjo.



Fonte: Adaptado de Auerbach,(1989)

2.8.1 Teste de Biologia Molecular

Os testes diagnósticos por biologia molecular têm como objetivo pesquisar pormutações e podem ser realizados por diversas metodologias, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação multiplex de sondas dependente de Ligação (MLPA) ou sequenciamento de nova geração (NGS). Na AF as técnicas de PCR e MLPA são metodologias que não permitem a análise simultânea e completa de todos os 22 genes atualmente relacionados com a doença. Mas nem sempre se faz necessário a análise de todos os genes, pois cerca de 60 a 70% das mutações são observadas no gene *FANCA*, sendo destas 15 a 40% compostas por grandes deleções (PILONETTO *et al.*, 2017).

Através destes dois métodos Pilonetto *et al.* (2017) identificaram que a mutação mais frequentemente encontrada nos portadores de AF na população brasileira era ac.3788_3790delCTC do *FANCA* (27,1%), seguida pela c.1077-2A>G do *FANCG* (11%), esses autores desenvolveram um *screen* de triagem que abrange as mutações mais frequentes em três principais genes (Tabela 3). Cerca de 85% dos casos são resolvidos após investigação dos genes *FANCA*, *FANCC*, *FANCG*, *FANCE*, *FANCF* e *FANCB* (GILLE *et al.*, 2012).

Tabela 3. Composição do painel de triagem para AF da população brasileira.

Gene	Mutações
<i>FANCA</i>	c.3788_3790delTCT
	c.2535_2536delCT
	c.987_990delTCAC
	c.2853-19_2853-1del19
	c.1115_1118delTTGG
<i>FANCC</i>	c.65G>A
	c.456+4 A>T
	c.1393 C>T
<i>FANCG</i>	c.1077-2A>G

Fonte: Pilonetto, et al.,2017

Sendo assim, painéis de triagem com as alterações mais frequentes nos genes mais recorrentes têm sido realizados para o diagnóstico através da técnica de MLPA (CHEUNG; TANIGUCHI, 2017; KNIES *et al.*, 2017). Quando o paciente apresenta clínica sugestiva e teste de fragilidade positivo, nenhuma mutação é encontrada pelo painel de triagem. Nesses casos é recomendado a realização do sequenciamento completo do genoma (WGS) ou sequenciamento do exoma (WES), a fim de buscar por mutações em genes menos frequentes ou mutações ainda não conhecidas. Através do sequenciamento destes genes, Pilonetto *et al.* (2017) identificaram 22 novas mutações nos genes *FANCA*, *FANCC* E *FANCG* da população brasileira através do sequenciamento destes genes.

2.8.2 Detecção da monoubiquitização de FANCD2

Um método complementar para o diagnóstico da AF foi desenvolvido por Shimamura *et al.* (2002), baseado na detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2. A ausência da isoforma monoubiquitinada da proteína FANCD2 (FANCD2L) em decorrência de alterações nas proteínas formadoras do complexo principal da AF (FANCA, B, C, E, F, G, L e M) ou na própria proteína FANCD2, também leva a uma falha no mecanismo de reparo do DNA. Contudo, este método só se torna eficaz quando mutações ocorrem em genes que produzem proteínas que estão envolvidas nos processos anteriores a ubiquitinação, reconhecimento do dano (FANCM), formação do complexo principal (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FAAP100, FAAP10, FAAP16, FAAP20 e FAAP24) e processo inicial de ubiquitinação (FANCL E FANCI). Caso ocorra mutação a jusante do complexo de monoubiquitinação, este método não se torna efetivo para o diagnóstico (PILONETTO *et al.*, 2017).

2.9 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A anemia de Fanconi possui sintomas muito heterogêneos e semelhantes a diversas outras doenças genéticas. Seja de falha medular como anemia Diamond-blackfan, síndrome Shwachman-Diamond e síndrome de TAR, como também doenças de fragilidade cromossômica espontânea como Síndrome de Bloom, Neijmegen, Ataxia telangiectasia, entre outras ou ainda doenças de malformações congênita como VACTER (JOENJE; PATEL, 2001).

As doenças de falência medular possuem sintomas clínicos e hematológicos muito semelhantes, como risco aumentado ao desenvolvimento de SMD ou LMA, infecções recorrentes, hipoplasia medular e pigmentação anormais na pele, sendo necessário sempre a realização de exames específicos para definição da doença (DONADIEU *et al.*, 2012). No caso da AF o teste citogenético de fragilidade cromossômica é o principal aliado no diagnóstico diferencial, uma vez que anemia Diamond-blackfan, síndrome Shwachman-diamond e síndrome de TAR não apresentam fragilidade cromossômica (SHIMAMURA, 2009).

Para a confirmação do diagnóstico entre elas é necessário a pesquisa por mutação nos genes correspondentes a doença. Na anemia Diamond-blackfan mutações são observadas nos genes *RP's*, sendo o mais comumente afetado, o *RPS19*, que está presente em 25% dos casos e possui mais de 80 mutações identificadas e relacionadas com a doença. Outros genes *RP's* responsáveis por cercade 43% dos casos são os *RPS24*, *RPS17*, *RPL35A*, *RPL5*, *RPL11* e *RPS7* (DILSHADJAHAN *et al.*, 2020).

Na síndrome Shwachman-Diamond deve-se pesquisar variantes patogênicas bialélicas nos genes *DNAJC21*, *EFL1*, *SBDS* ou variante patogênica em heterozigose no gene *SRP54* (CARAPITO *et al.*, 2017; DHANRAJ *et al.*, 2017; STEPENSKY *et al.*, 2017). Enquanto na síndrome de TAR o gene relacionado com a doença é o *RBM8A*, podendo ser observado microdeleções ou alelos hipomórficos (c.-21G>A e 67+32G>C) (ALBERS *et al.*, 2012).

Dentre as síndromes de fragilidade cromossômica, a principal

característica em comum é a etiologia baseada em falhas no sistema de reparo de DNA. Sendo falha de reparo por excisão de nucleotídeo (NER) na síndrome de Bloom, falha no sistema de reparo de dano dupla fita no caso da Ataxia telangiectasia e na síndrome de Nejimegen, e o sistema de reparo de ICL's na anemia de Fanconi (WU, 2016). Por terem a mesma base etiológica, muitos sintomas são comuns, mas a síndrome de Nejimegen é a que mais se sobrepõe em sintomas com a AF (GENNERY *et al.*, 2004). A síndrome de Nejimegen é uma doença autossômica recessiva e apresenta sintomas comuns a AF, à exceção da hipoplasia medular, tem anormalidades de pigmentação de pele, retardo no crescimento, face de “passarinho”, microcefalia, predisposição ao câncer, infecções recorrentes e imunodeficiência (CHRZANOWSKA *et al.*, 2012). Apresenta também fragilidade cromossômica espontânea derivada de mutação no gene *NBS1*, um membro do complexo MRN (*MRE11*, *RAD50*, e *NBS1*) que atua no processo de sinalização de reparo de quebra dupla fita do DNA, sendo mais sensível a danos causados por radiação ionizantes (RI) (WILLIAMS *et al.*, 2007). Logo, para o diagnóstico da síndrome de Nejimegen é recomendado o teste de fragilidade cromossômica usando RI, mas também através de teste com MMC.

A diferença entre resultados de MMC de pacientes AF e síndrome de Nejimegen se dá pelo menor índice de fragilidade quando comparado com paciente AF. Além do tipo de variante cromossômica observada, sendo mais frequentes quebras e fragmentos na síndrome de Nejimegen e figuras radiais em AF (RÃO *et al.*, 2007).

A síndrome VACTERL é uma doença de diagnóstico clínico, caracterizada por malformações congênitas decorrentes de anormalidades estruturais do mesoderma embrionário, cuja etiologia é desconhecida e cada letra corresponde a uma anormalidade clínica. O diagnóstico se dá pela ocorrência simultânea de, pelo menos, três das seguintes malformações congênitas: vertebrais (vértebras ausentes, hemivértebras, vértebras “borboleta”, fendas e fusões vertebrais), costelas (costelas ausentes, costelas supranumerárias, fusões e divisão), de membros, cardíacas, renais, anorretais e fistula traqueoesofágica. Diversos estudos relataram pacientes com AF e associação VACTERL, um percentual de 5%-

12% dos pacientes com AF podem ser classificados como tendo a associação VACTERL (ALTER; ROSENBERG, 2013; MOISÉS *et al.*, 2019). Dessa forma, caberá ao geneticista observar esses pacientes na infância para considerar o diagnóstico de AF, através do teste de fragilidade cromossômica, considerar o aconselhamento genético para a família e encaminhar para o hematologista pediátrico para acompanhamento (ALTER; GIRI, 2016).

2.10 TRATAMENTO

O tratamento da AF consiste em tratar os sintomas, decorrentes da severa citopenia, característica da doença, até o paciente encontrar um doador compatível para o HSCT. Este tratamento inclui o uso de corticoides, como prednisolona, andrógenos sintéticos com efeito anabolizante como oximetolona e oxandrolona, e derivados de esteroides como o danazol. O uso de andrógenos sintéticos em doenças de falência medular visa à recuperação hematológica do paciente e seu mecanismo de ação na eritropoiese vem sendo estudado (McMANUS *et al.*, 2020).

O tratamento com oximetolona foi mais utilizado com uma melhor resposta, mas os severos efeitos colaterais que incluem hepatotoxicidade e virilização fez com que fosse descontinuado (CALADO; CLÉ, 2017). Outro esteroide anabolizante com potencial de uso, é a oxandrolona que apesar da elevada hepatotoxicidade, apresenta baixo índice de virilização e irritabilidade gástrica (SUSAN *et al.*, 2016). O danazol é um esteroide, com efeito, antigonadotrópico que vem ganhando espaço, sendo bastante utilizado porque mostrou uma resposta semelhante ao oximetolona e uma diminuição dos efeitos colaterais, principalmente a virilização, sendo assim, mais indicado para mulheres (CATALÀ *et al.*, 2020).

Recentemente, o uso terapêutico utilizando outras drogas não andrógenas como a metformina vem apresentando bons resultados na recuperação do quadro hematológico, acarretando aumento nos neutrófilos, plaquetas e hemácias em pacientes AF não diabéticos (POLLARD *et al.*, 2022). Este resultado foi acrescido ao retardo na formação de tumor observados em estudos realizados em ratos *Fancd2*^{-/-}

(ZANG; TANG, 2016).

Terapêuticas alternativas para recuperação da falência medular estão em estudo. Casado *et al.* (2022) testaram, em camundongos AF, bloqueadores de anticorpo anti-NKG2D e observaram efeito protetor na linhagem de eritrócitos. Hira *et al.* (2013) também relataram que drogas antagonistas de ALDH2, como alda-1, tem efeito protetor contra a falência medular de pacientes AF.

O transplante alogênico de medula óssea ainda é a única alternativa curativa para pacientes AF+. Porém, essa metodologia enfrenta problemas, devido à sensibilidade das células dessas pessoas a agentes alquilantes e radiação. Dessa forma, esses pacientes devem passar por um regime de condicionamento adaptado no pré HSCT (BONFIM *et al.*, 2022).

No Brasil, o primeiro transplante foi realizado em 1983 no Centro de Transplante de MO da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Atualmente, este centro é referência no tratamento e transplante de pacientes AF e desenvolveram um protocolo adaptado para seus pacientes. Dentre as adaptações, a dosagem de ciclofosfamida foi reduzida e a fludarabina não é administrada (BONFIM *et al.*, 2022).

Os riscos que devem ser avaliados no pós transplante de medula óssea (TMO) nos pacientes AF, incluem a doença versus hospedeiro (GVHD), suscetibilidade a tumores sólidos (Fanconi Anemia Research Fund, 2014; FRONTBRUNE *et al.*, 2017) e o risco aumentado a infecções. Além da chance de 50% de retorno da doença mesmo após transplante de medula óssea (UPPULURI *et al.*, 2020).

Frente à grande dificuldade em encontrar doadores compatíveis, estudos de diagnóstico genético pré-implantação, no qual o embrião fruto de uma inseminação artificial, tem seu genoma estudado para doenças genéticas antes de sua implantação no útero, o que permite associar a avaliação pré-natal de uma possível criança com AF ao estudo HLA do embrião. Dessa forma, é possível produzir embriões AF negativo com potencial para doar medula óssea para um irmão já diagnosticado com a doença (VERLINSKY *et al.*, 2001).

Com o avanço recente da técnica de edição de DNA CRISPR,

alguns grupos têm se destacado o seu uso para tratamento da AF. O estudo realizado por Vrugt *et al.* (2019) conseguiu reverter com sucesso fibroblastos e células tronco embrionárias *FANCF* mutadas em células normais. Por questões éticas, o estudo ainda é limitado a experimentos *in vitro*, mas abre espaço para estudos com o objetivo de desenvolvimento da técnica de forma terapêutica.

3. ARTIGO

3.1 ARTIGO I

HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME IN A PATIENT WITH FANCONI ANEMIA AND VACTERL ASSOCIATION

Maria Luiza Rocha da Rosa Borges^{1,2}, Victor Coentro Torreiro de Moraes³, João Lucas Cruz Souza^{1,4}, Edinalva Pereira Leite¹, Neide Santos², Terezinha de Jesus Marques-Salles¹

¹*Centro de Oncohematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) - Recife (PE), Brasil.*

²*Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Recife (PE), Brasil.*

³*Departamento de Pediatria, Hospital Infantil Maria Lucinda (HIML) - Recife (PE), Brasil.*

⁴*Laboratório de Imunogenética, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Recife (PE), Brasil.*

Autor para correspondência: Maria Luiza Rocha da Rosa Borges - Laboratório de Citogenética do Centro de Oncohematologia Pediátrica, Hospital Oswaldo Cruz - Rua Arnóbio Marques, nº 310 - Santo Amaro – CEP: 50100-130 – Recife (PE), Brasil - Email: marialuiza.rosaborges@hotmail.com

**ARTIGO ACEITO NO PERIÓDICO ABCS HEALTH SCIENCES - F.I = 0.6;
QUALIS UNIFICADO: A3 (Anexo C)**

Relato de Caso (MS 2021-021)

ABSTRACT

Introduction: Hemophagocytic syndrome results from hyperactivity of histiocytes and lymphocytes, triggered by infections, mainly viral by cytomegalovirus, Epstein-Barr and herpes. Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease with heterogeneous symptoms common to other diseases such as VACTERL, a disease of unknown etiology in which there are several congenital malformations. The concomitance of Fanconi and VACTERL anemia occurs in 5 to 30% of FA patients. **Report:** A 14-month-old male infant was admitted to investigate fever, hepatosplenomegaly, and granulopenia. The patient was diagnosed with hemophagocytic syndrome due to hyperferritinemia, bone marrow hemophagocytosis, transaminase elevation, decreased fibrinogen, and cytomegalovirus (CMV) infection confirmed by serology and PCR. The test with mitomycin C (MMC) showed chromosomal fragility. The patient was diagnosed with a VACTERL/FA association for having a clinic and a test compatible with both FA and VACTERL. **Conclusion:** The VACTERL/FA association is seldom described, but is present in pediatric medical practice. This study presented the main clinical-laboratory aspects and reviewed the main aspects of the concurrence of this pathology.

Keywords: lymphohistiocytosis; hemophagocytic; Fanconi anemia; congenital abnormalities; cytogenetics; chromosome fragility.

RESUMO

Introdução: A síndrome hemofagocítica decorre da hiperatividade de histiócitos e linfócitos e é desencadeada por infecções, principalmente virais por citomegalovírus, Epstein-barr e herpes. A anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara com sintomas heterogêneos em comum a outras doenças como a associação VACTERL, uma doença de etiologia desconhecida na qual existe diversas mal formações congênitas. A concomitância da anemia de Fanconi e VACTERL é descrita em 5 a 30% dos pacientes AF. **Relato:** Lactente de 14 meses, sexo masculino, admitido para investigar um quadro de febre, hepatoesplenomegalia e granulopenia. Os exames laboratoriais mostraram a hiperferritemia, elevação da transaminases, medula óssea com hemofagocitose, sorologia e PCR positivos para citomegalovírus (CMV). O paciente foi diagnosticado com síndrome hemofagocítica por citomegalovírus. Como havia também hipoplasia do polegar esquerdo, presença de hemivértebra, agenesia renal e teste positivo de fragilidades cromossômicas com mitomicina C (MMC), o paciente foi diagnosticado com associação VACTERL/AF. **Conclusão:** O citomegalovírus quando infecta pacientes com problemas de imunidade como AF, apresenta risco de desencadear a síndrome hemofagocítica. A associação VACTERL/AF é pouco descrita, mas presente na prática médica da pediatria. Esse estudo descreveu os principais aspectos clínicos-laboratoriais e revisou os aspectos fundamentais descritos sobre a concomitância dessas patologias.

Palavras-chave: linfo-histiocitose hemofagocítica; anemia de Fanconi; anormalidades congênitas; citogenética; fragilidade cromossômica.

INTRODUCTION

Hemophagocytic syndrome (HS) is a rare but potentially fatal disease that arises from the hyperactivity of histiocytes and lymphocytes. It can be present primarily or secondarily. The primary form is due to mutations in autosomal recessive genes that encode proteins related to the process of cytotoxic granule exocytosis during programmed natural killer (NK) cell death. Secondary hemophagocytic syndrome (acquired SHS) can arise from various conditions such as immunodeficiencies, rheumatologic diseases, malignancies, and infections. The most frequent infection is the virus of the herpes family, but bacterial, fungal, and parasitic pathogens can also trigger the disease^{1,2}.

Fanconi anemia (FA) is a rare disease with a heterogeneous clinical and genetic profile. The main signs and symptoms described in the disease arise from congenital bone abnormalities and bone marrow failure that may lead to a picture of aplastic anemia. These patients have a high risk of mortality from malignancies such as myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, and solid tumors^{3,4}. The etiopathogenesis of the disease results from mutations in genes involved in DNA repair and mostly presents an autosomal recessive profile, but an X-linked profile can be observed when the *FANCB* gene is affected, or more rarely an autosomal dominant profile when the *FANCR* gene is affected^{5,6}.

VACTERL associations are congenital malformations resulting from structural abnormalities of the embryonic mesoderm, whose etiology is unknown and each letter corresponds to a clinical abnormality. The diagnosis is made by the simultaneous occurrence of at least three of the following congenital malformations: vertebrae (absent vertebrae, hemivertebrae, butterfly vertebrae, vertebral fissures, and fusions), ribs (absent ribs, supernumerary ribs, fusions, and division), limbs, heart, kidneys, anorectal and tracheoesophageal fistula^{7,8}.

This study describes a patient diagnosed with SHS by cytomegalovirus (CMV) who presented with congenital skeletal abnormalities of the vertebrae, thumb hypoplasia, unilateral renal agenesis,

absence of microcephaly, and Fanconi face, characteristic of the disease. The chromosomal fragility test with mitomycin C (MMC) showed positivity, characterizing the diagnosis of Fanconi anemia associated with VACTERL.

REPORT

A 14-month-old male infant from Recife, Brazil was taken to the pediatric emergency room due to a cough associated with daily fever and hypoxia for 7 days; in the last 24 hours, he had three emetic episodes. On admission, the patient was afebrile, cyanotic, tachycardic, and tachydyspneic (respiratory rate 42 breaths per minute, saturation 96%). On respiratory auscultation, he had diffuse rales and expiratory wheezing. Laboratory tests showed: Hemoglobin: 11.7 g/dL; Hematocrit: 28.7%; White cell count: $26.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Segmented 82%; Eosinophils 0%; Basophils 0%; Lymphocytes 14%; Atypical lymphocytes 0%; Monocytes 3%); Platelets: $450 \times 10^3/\mu\text{L}$. Abdominal ultrasound revealed the absence of the left kidney and hepatosplenomegaly. Chest X-ray showed perihilar condensation on the right, the presence of a hemivertebra (D12), and scoliosis on the right. The patient was treated with cefepime but persisted with daily fever, there was diffuse exanthema and palpable lymph nodes in cervical and inguinal chains. CMV serology revealed positive IgM and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for CMV detected 4,960 viral copies. Other viral serologies and cultures for fungi and bacteria were negative. Laboratory tests showed ferritin 17.759 ng/mL, transaminases (AST 185 U/L and ALT 110 U/L), LDH 913 U/L and fibrinogen 494 mg/dL. The patient was diagnosed with cytomegalovirus (CMV) associated SHS and treated with ganciclovir and intravenous dexamethasone. Due to the associated bone deformities, he was transferred to the Pediatric Oncology Center for follow-up and investigation of chromosomal fragility syndrome which was confirmed by testing with MMC (Table 1 and Figure 1a), the conventional bone marrow cytogenetic study showed normal karyotype (46,XY) (Figure 1b). The patient was diagnosed with SHS secondary to CMV and FA. During outpatient follow-up, it was observed that the patient did not have a face typical of FA, had renal agenesis, a renal alteration rarely described in

FA, and other skeletal abnormalities, such as hemivertebrae, were not consistent with FA, thus the hypothesis of VACTERL association was considered, following the necessary criteria shown in table 2. The patient is being followed up as an outpatient with granulopenia and remains stable, with no need for therapy. However, the human leukocyte antigen (HLA) system of the patient and genitors was requested, as well as the registration in the REREME.

This study was submitted to the Research Ethics Committee with CAAE approval number 73905817.1.1001.5192.

DISCUSSION

Patients with FA have a high risk of infectious processes that is due to abnormalities of adhesion, migration, phagocytosis, recruitment, and mobilization of inflammatory monocytes⁹ especially if associated with granulopenia, caused by bone marrow failure. This case reports a patient with a CMV infectious process associated with HS confirmed through clinical and laboratory data who was successfully treated with ganciclovir and dexametasona. Due to the abnormality of the right thumb (Figure 1c), the patient was also investigated for chromosomal fragility testing by MMC and

confirmed as FA. However, the patient did not have the café-au-lait spots and Fanconi face that is characteristic of the disease; instead, he had mild to moderate macrocephaly (Figure 1d), hemivertebrae (Figure 1e), and scoliosis, both on the right, and renal agenesis, unusual findings in patients with FA.

FA is a rare autosomal recessive disease with heterogeneous manifestations. This diversity makes diagnosis difficult, due to the many differential diagnoses. The main features of FA are skeletal abnormalities (Table 1) that may occur in other frailty syndromes, such as Rothmund-Thompson syndrome and its variants¹⁰, but also other pathologies such as VACTERL or VACTERL-H association, a disease estimated in 1/40,000 live births¹¹.

The patient described in this paper evolved with granulopenia, and so far no pancytopenia, which is characteristic of the disease in a later stage (7-8 years), has appeared. This could be due to hemophagocytosis, but as it appeared months after the SHS, it made us assume that the granulopenia is a consequence of medullary hypoplasia due to the chromosomal instability syndrome and not the SHS. Besides presenting other symptoms of FA, such as thumb hypoplasia and chromosomal fragility test with a high number of breaks, and how, the patient had no microcephaly, typical triangular facies, and no skin pigmentation changes, frequent findings in FA. On the other hand, the patient had renal agenesis and other skeletal abnormalities such as hemivertebrae and marked scoliosis on the right and frequent changes in VACTERL association. The patient was diagnosed with VACTERL/FA association, which is described in 5% of these cases. Rothmund-Thompson syndrome and variants were ruled out since the patient had no skin alterations and had chromosomal fragility, findings not found in this pathology¹⁰.

Evidence for the link between FA and VACTERL was first demonstrated by Porteous et al.¹², by analyzing two unrelated male patients who had features of both diseases and had chromosomal breaks in the MMC test. In agreement with the finding of Porteous, Giampietro et al.¹³ demonstrated a high correlation between the presence of the VACTERL association and FA, by restudying 376 patients with FA, in which 37 (10%) presented at least three manifestations of VACTERL. After this finding, chromosomal fragility testing should always be performed in both VACTERL-H and VACTERL patients who present with radial and thumb changes, skin changes, growth retardation, microcephaly, and microphthalmia¹⁴.

Similar to the case described in this report, Botto et al.¹⁵ found that carriers of FA and VACTERL-H have a higher frequency of limb abnormalities (preferably in the radius and/or thumb) and vertebral abnormalities (e.g., scoliosis), and a few cases had anal atresia, and none with FA had a tracheoesophageal fistula. While, Alter e Rosenberg⁷ studied 2245 patients with FA and found that 118 had FA and VACTERL

association, 90% of these patients had renal defects and skeletal alterations of the limbs (mainly radius and fingers).

Thus, the patient in this report was diagnosed with FA/VACTERL association and is stable in outpatient follow-up. At the moment, he is suffering from mild granulopenia (1,400 granulocytes). Patients with FA/VACTERL have greater involvement of the *FANCD1* gene, as well as shorter survival and a higher and earlier incidence of cancer compared to FA patients⁷.

Since at least 5% of patients with FA can be classified as having the VACTERL association, it is up to the geneticist to observe these patients in childhood to consider the diagnosis of FA, through the chromosomal fragility test, consider genetic counseling for the family and refer them to the pediatric hematologist for follow-up. In this way, it will be possible to know the real incidence of this association.

REFERENCES

1. Zen PRG, Moraes FN, Rosa FRM, Graziadio C, Paskulin GA. Características clínicas de pacientes com anemia de Fanconi. *Rev Paul Pediatr.* 2011;29(3):392-9
2. Dufour C. How I manage patients with Fanconi anemia. *Br J Haematol.* 2017;178(1):32-47.
3. Schneider M, Chandler K, Tischkowitz M, Meyer S. Fanconianaemia: genetics, molecular biology, and cancer-implications for clinical management in children and adults. *Clin Genet.* 2014;88(1):13-24.
4. Soulier J. Fanconi anemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2
5. Deng W, Zhao M, Liu Y, Cao L, Yang M. Fanconi anemia in twins with neutropenia: a case report. *Oncol Lett.* 2018;16(4):5325-30.
6. Fiesco-Roa MO, Giri N, McReynolds LJ, Best AF, Alter BP. Genotype-phenotype associations in Fanconi anemia: a literature review. *Blood Rev.* 2019;37:100589.
7. Alter BP, Rosenberg PS. VACTERL-H Association and Fanconi anemia. *Mol Syndromol.* 2013;4(1-2):87-93.
8. Solomon BD, Baker LA, Bear KA, Cunningham BK, Giampietro PF, Hadigan C, et al. An Approach to the Identification of Anomalies and Etiologies in Neonates with Identified or Suspected VACTERL (Vertebral Defects, Anal Atresia, Tracheo-Esophageal Fistula with Esophageal Atresia, Cardiac Anomalies, Renal Anomalies, and Limb Anomalies) *Assoc J Pediatric.* 2014;164(1):451-7.
9. Liu Y, Ballman K, Li D, Khan S, Derr-Yellin E, Shou W, et al. Impaired function of Fanconi anemia type C-deficient macrophages. *J Leukoc Biol.* 2012;91(2):333-40.

10. Guerrero-González GA, Martínez-Cabriales SA, Hernández-Juárez AA, Lugo-Trampe JJ, Espinoza-González NA, Gómez-Flores M, et al. Rothmund-Thomson Syndrome: A 13-Year Follow-Up. *Case Rep Dermatol.* 2014;6(2):176-9.
11. Alter BP, Giri N. Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi anemia according to PHENOS. *Am J Med Genet.* 2016;170(6):1520-4.
12. Porteous ME, Cross I, Burn J. VACTERL with hydrocephalus: One end of the Fanconi anemia spectrum of anomalies? *Am J Med Genet.* 1992;43(6):1032-4.
13. Giampietro PF, Adler-Brecher B, Verlander PC, Pavlakis SG, Davis JG, Auerbach AD. The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics.* 1993;91(6):1116-20.
14. Faivre L, Portnoï MF, Pals G, Stoppa-Lyonnet D, Le Merrer M, Thauvin-Robinet C, et al. Should chromosome breakage studies be performed in patients with VACTERL association? *Am J Med Genet.* 2005;137A(1):55-8.
15. Botto LD, Khoury MJ, Mastroiacovo P, Castilla EE, Moore CA, Skjaerven R, et al. The spectrum of congenital anomalies of the VATER association: an international study. *Am J Med Genet.* 1997;71(1):8-15.

FIGURE

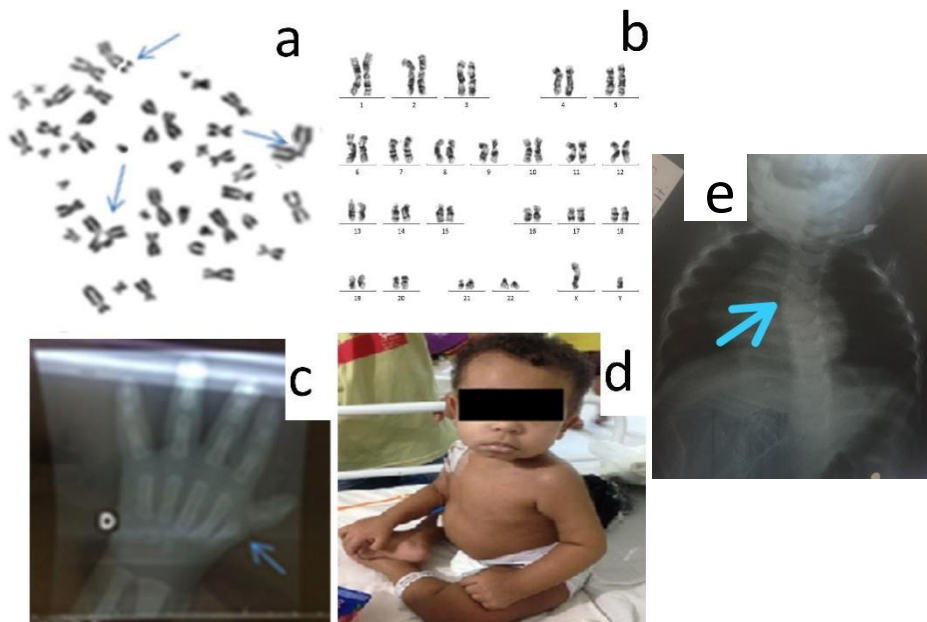


Figure 1: A) MMC test showing chromosomal variants (radial figures and chromosome breakage being pointed out) B) Bone marrow karyotype without abnormalities (46, XY) C) Clinical features of the patient: Macrocephaly and absence of Fanconi's face. D) X-ray of the right hand showing thumb hypoplasia. E) X-ray showing hemivertebra (D12)

TABLE**Table 1:** Result of chromosomal fragility test by MMC.

Culture	General Events	Analyzed events/cells	Anormal events/cells	Anormal cells (%)
Without MMC	4	0.08	1.3	6%
With MMC	48	0.96	1.3	66%

Table 2: Clinical manifestations described in concomitant FA and VACTERL.

Symptoms	%	Patient
VACTERL		
Vertebral anomalies/ribs	60-95%	Present
Hemivertebrae	(80%)	Present
Anal atresia	55-90%	Absent
Tracheoesophageal Fistula	50-80%	Absent
Cardiac alterations	40-80%	Absent
Renal alterations	50-80%	Present
Renal Agenesis	(61%)	Present
Limb skeletal abnormality	40-50%	Present
FANCONI ANEMIA		
Thumb abnormality	35%	Present
Vertebral Anomalies	2%	Present
Flappy Ears	10%	Absent
Cardiac Alterations	6%	Absent
Renal alterations	20%	Present
Renal Agenesis	(5%)	Present
Café au lait stains	40%	Absent
Hematological alterations	90%	Present

3.2 ARTIGO II

CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF MITOMYCIN C CYTOGENETIC TEST IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL

M.D. Maria Luiza Rocha da Rosa Borges ^{1,2}, João Lucas Cruz Souza ²,
Luiz Henrique Rodrigues ², M.D. Maria Teresa Marquim Nogueira Cornélio
², Ana Cláudia dos Anjos ³, Ph.D. Neide Santos ¹, Ph.D. Terezinha de Jesus
Marques Salles ^{2*}

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife,
Pernambuco, Brazil.

² Centro de OncoHematologia Pediátrica, Hospital Universitário
Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brazil.

³ Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

Short title: Profile of Fanconi Anemia in Pernambuco

*Corresponding author: Terezinha de Jesus Marques Salles, Centro de
OncoHematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Rua
Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP:
50.100-130. e-mail:terezinha.jms20@gmail.com

**ARTIGO ACEITO NO PERIODICO HEMATOLOGY, TRANSFUSION
AND CELL THERAPY - F.I = 1,5 ; QUALIS B4 (Anexo D)**

Abstract

Background: Fanconi anemia (FA) is a rare autosomal recessive disease characterized by chromosomal instability and increased predisposition to malignancy. The diagnosis of FA requires clinical evaluation, confirmation of chromosomal fragility, and or analysis of genetic mutations. Therefore, this study aims to identify the clinical profile of patients with FA in the state of Pernambuco, Brazil.

Method: We analyzed 80 individuals referred from the major hematology and bone marrow (BM) transplant centers in the state of Pernambuco, Brazil, between the years 2018 and 2020. The diagnosis of FA was performed using the mitomycin C chromosomal fragility test, clinical data, and classical and molecular cytogenetic analyses.

Results: This study was carried out with 16 patients. Most of these individuals (87.5%) came from the Agreste and Sertão regions of Pernambuco. We observed a slight female prevalence of FA (1.3:1). The primary clinical and laboratory findings were café au lait spots (62.5%) and bone abnormalities (53%, mainly thumb deformities [40%]). We performed BM cytogenetic analysis for eight patients – seven showed no chromosomal abnormalities, and one was karyotype 47,XY,+21[15].

Conclusions: Our results are important to promote public health measures for the early diagnosis of FA, as well as to foster the engagement of a multidisciplinary group in the treatment of this disease.

Keywords: Fanconi Anemia, MMC test, Cytogenetic

Introduction

Fanconi anemia (FA) is a rare autosomal recessive disease characterized by chromosomal instability. The classic clinical profile of this disease is highly variable: 90% of patients have hematological abnormalities; 75% have physical and/or skeletal deformities; 60% have delayed physical development; 25% have Fanconi-like facies; 40% have café au lait spots; 35% have thumb abnormalities (Mehta and Jakub, 2018).

The etiopathogenesis of FA is related to a mutation in 22 genes in charge of DNA repair, as well as 13 genes in charge of ribosome biogenesis (Gueiderikh et al., 2022). The diagnosis of FA is based on clinical and molecular aspects, as well as chromosomal break hypersensitivity testing to alkylating agents such as diepoxybutane (DEB) and mitomycin C (MMC) (Auerbach, 1993). Because of the consequences of spinal cord failure and the increased predisposition to malignancy, early identification of these individuals is essential for their appropriate clinical management.

The median survival of patients with FA in the USA was 19 years between 1981 and 1990. However, with early diagnosis and the introduction of new treatment modalities, survival from 1991 to 2006 increased to 30 years (Taniguchi and D'andrea, 2006). There is no data regarding patient survival in Brazil, but Bonfin et al. (2022) reported an adapted protocol for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This protocol was associated with overall 5-year survival of 83%, good engraftment, and a low incidence of acute graft-versus-host disease at 100th-day post-transplantation.

Patients with FA have a 500-fold increased risk of developing myelodysplastic syndrome (MDS) and/or acute myeloid leukemia (AML) (Tamary et al., 2010). About 80% of patients evolve to MDS and/or AML, and the main indicators of this evolution are chromosomal alterations in

bone marrow (BM) such as -7/del (7q), abnormalities in 3q and 11q, and complex karyotypes (Mehta et al., 2010).

About 1:181 Americans and 1:93 Israelis are affected by FA (Rosenberg et al., 2011). Although FA can affect all races, it is rare in African descendants (1:476.000) (Castella et al., 2011). In Brazil, two important groups in the states of São Paulo (Caputo, 2002; Rodriguez et al., 2005) and Paraná (Veiga, 2009), Brazil, registered 148 and 52 patients with chromosomal breakage, respectively. Two other studies were conducted – one described the clinical profile of 17 patients with FA (Zen et al. 2011), and another that identified mutations in the FANCA, FANCC, and FANCG genes in 255 patients, of whom 68 were from the Northeast region of Brazil (Pilonetto et al., 2017).

The implementation of MMC chromosomal fragility test has supplied the Northeast region of Brazil with an early and rapid diagnosis of FA cases, providing a targeted follow-up and increasing the patient's quality of life. However, there are no studies in loco with epidemiological data, forms of clinical presentation, and cytogenetic profile of FA for this region. Therefore, conducting research on the FA and implementing the MMC chromosomal fragility test in patients of the Unified Health System (Sistema Único de Saúde [SUS]) in Pernambuco is relevant for Brazil, mainly for the Northeast region. Further, it can provide specific regional information concerning the clinical, laboratory, and cytogenetic characteristics of patients with FA.

Material and method

Patient and sample

A prospective study was conducted between the years 2018 and 2020 to investigate the clinical profile of FA. Sixteen individuals (seven males and nine females) participated in this study. These patients were admitted to the outpatient clinic of the Centro de OncoHematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz for evaluation of clinical and family history, physical examination, and laboratory tests. The individuals included were referred from the Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Instituto do Câncer do Agreste, Instituto de Medicina

Integral Professor Fernando Figueira, and Hospital Português – Centro de Transplante de Medula Óssea. Only patients with at least two of the following symptoms were included in the study: hypoplastic or aplastic BM, skeletal abnormalities, café au lait spots, and pancytopenia with an increase in mean corpuscular volume or fetal hemoglobin.

The study protocol was approved by the local research ethics committee (approval number 73905817.1.1001.5192). The guardians of the children were informed about the tests to be performed and authorized participation, as well as the disclosure of findings by signing the informed consent form. Data collection began after the approval of the study.

Mitomycin C chromosomal fragility test

The test protocol was adapted from Oostra et al. (2012). Each patient had 5mL of peripheral venous blood collected in a heparinized syringe. Lymphocyte culture was performed according to the standard PVB culture protocol (Bain, 1996) with the addition of MMC at a concentration of 150 nM at the time of culture medium preparation. A total of 20 μ L of 10^{-3} colcemid (Sigma) were added after 70 hours-culture in a CO₂ incubator. The material was centrifuged and hypotonic shocked with potassium chloride for 15 minutes at 37 °C in a water bath after 72 hours, and then fixed with methanol and acetic acid (3:1). The slides were made and stained with Giemsa (Merck) at 5% for 8 minutes. Twenty-five metaphases from each individual were evaluated, and chromosomal variants such as breaks, fragments, ring chromosomes, radial figures, and rearrangements were analyzed.

A score was assigned for each chromosomal variant in the following way: for each break and fragment, one point; for each ring and radial figure chromosome, two points; for each chromosome involved in the rearrangement, one point. The total points were added up to produce a final score, and patients were classified as suggestive (>40%) or not suggestive of FA (<20%) based on the score, as shown in Table 1.

Bone marrow cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis of BM was performed using 24-hour cultures according to standard protocols (Testa et al. 1995). At least 20 metaphases in each case were analyzed by G-banded according to Seabright (1971) and characterized in compliance with the International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2020).

The cytogenetic analysis could not be performed in all individuals because we did not have medical approval to perform the BM aspiration. Patients undergoing cytogenetic analysis are followed up every six months for medical evaluation.

Fluorescence in situ hybridization

Fluorescent probes were used for the molecular cytogenetic technique, as per Liehr (2017) and the manufacturer's instructions. Analyses were performed in metaphase and or interphase cells using the centromeric probe of cytosolic chromosome 21.

Results

In the present study, 80 individuals were referred for investigation of FA. Among those with a negative test, one patient was diagnosed with TAR syndrome and another with Pearson syndrome. A third patient, who had skeletal abnormalities of the thumb, renal agenesis, hemivertebrae, and a positive MMC chromosomal fragility test, had a final diagnosis of VACTERL/FA association (FA3). The remaining 16 individuals were diagnosed as FA through the MMC chromosomal fragility test, as shown in Table 2. One patient (FA16) presented as a mosaic for FA.

The mean age at diagnosis was 8.5 years (average between symptoms started and diagnosis was 6 months), with a slight female prevalence of FA (56.25%). About 87.5% of patients were from the Agreste and Sertão of the state of Pernambuco, and 62.5% were born to consanguineous parents.

The clinical and laboratory profiles of FA (Table 3) showed that most patients had hematological alterations (80%), particularly medullary failure (87.5%). The hypoplasia of BM was seen in 92.86% and aplasia in 7.14%. Café au lait spots occurred in 62.5% of cases, and 53% of patients had skeletal changes, especially thumb hypoplasia (40%) (Figure 1). Fewer patients had short stature, protruding ears, microcephaly, heart disease, and unilateral renal agenesis.

Cytogenetic studies of BM were performed on 8 of 16 patients. Seven individuals had normal karyotype and one (FA11) had karyotype 46,XY[5]/47,XY,+21[15] (Figure 2). This patient had a phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood lymphocyte culture with normal karyotype (46.XY[5]). The main criteria described for the indication for HSCT include unfavorable cytogenetic changes such as gain or loss of 1q, 3q, and 11q, -7, del7q and +8 and worsening of pancytopenia with the need for transfusions or antibiotic therapy (Bonfim et al., 2022). Thus, at the moment, the remaining patients still did not present criteria for HSCT indication and are in outpatient follow-up.

One patient died of sepsis (FA12) throughout the present study, and two others (FA2 and FA7) are alive after HSCT. The remaining individuals were treated with Danazol, but to date, there has been no complete recovery from the hypoplasia of BM. Furthermore, these patients had side effects such as virilization, hypertrichosis, and incomplete response.

Discussion

The FA is a rare and poorly studied disease in Brazil, and studies involving a clinical approach and cytogenetic and molecular profiles of this disease in the Northeast region are even more scarce. Most of the patients analyzed in previous studies were from the South (state of Paraná) and Southeast (state of São Paulo) regions of Brazil.

Sixteen individuals were diagnosed with FA in the state of Pernambuco over four years – meaning 4.5 cases/year, with a mean age at diagnosis of 8.5 years. From 1995 to 2012, Piloneto et al. (2017) studied 68

cases of FA in the Northeast region of Brazil and observed a rate of 3.4 cases/year. This underreporting observed may be explained by the difficulty of sending samples for MMC chromosomal fragility testing to the South region of Brazil because this test was not available in the Northeast region.

A difference in the age range at diagnosis was observed when comparing our results with the findings of Shimamura and Alter (2010). These authors described that the mean age at diagnosis of FA was 6.5 years, whereas our study showed a mean age of 8 years (minimum of 2 years, maximum of 34 years). This demonstrates a deficit in the early diagnosis of the disease. However, when compared with a previous study in which the mean age was 13 years, it was possible to observe a decrease of 5 years in diagnosis with the start of the MMC chromosomal fragility test in Pernambuco, which provided the patient with better follow-up, treatment, and survival time (personal communication).

There is no consensus with regard to the prevalence of FA between the sexes. Some authors stress that there is an equal distribution (Nowzari et al., 2001; Kutler et al., 2003), whereas others found a higher male prevalence (Sagaseta de Ilurdoz, 2003; Alter, 2005; Mehta and Jakub, 2018). The present study demonstrated a discrete female prevalence of the FA (1:1.3) in the state of Pernambuco, Brazil.

Among the 16 patients with a confirmed diagnosis of FA, 62.5% were born of consanguineous marriages. This demonstrates that consanguinity is a relevant factor for the predisposition of the disease, as well as increases the prevalence of FA in the overall population (Kutler et al., 2003). The high level of consanguinity observed in our state is probably related to the region of origin of these patients because 87.5% of them come from the Agreste and Sertão regions.

The clinical profile of FA identified in the current research was the same as that reported by Santos (2017). According to Santos, approximately 75% of patients with AF present with the principal clinic symptoms pigmentation and café au lait spots on the skin, described in more than 50% of patients, short stature in about 50%, and skeletal anomalies in 30%. Zen et al. (2011) also reported thumb alterations (60%) and café au lait spots

(43%) as the primary alterations, besides renal agenesis. This study reported all these clinical presentations for one patient.

Acquired chromosomal changes are frequent findings in BM karyotypes of patients with FA undergoing clonal evolution to MDS or AML. Rosa Borges et al. (2017) reported four patients with FA undergoing transformation to MDS (three cases) and AML (one case) who showed chromosomal changes in the BM – one recurrent and others as new translocations. Acquired chromosomal changes are the main indication for BM transplantation, and the main changes described are losses and gains in the 1q, 3q, and 11q regions, as well as -7 and +8 (Cioc et al., 2010). However, in this study, only one patient (FA11) showed acquired trisomy 21, which may indicate clonal evolution. Unlike de novo acute leukemias, alterations involving chromosome 21 have been poorly described for FA.

Ayas and Walter (2008) described a case of FA with a complex karyotype in which $\text{dup}(21)(q22) \times 2, +\text{add}(21)(q22)$ was observed. In this duplicated region, the AML1 gene (RUNX1) is present, which is correlated with myeloid neoplasms, suggesting an important role of this gene in characterizing disease progression. Another case of FA with monosomy 21, $(21q22.1-q22.1)$ was reported by Byrd et al. (2011), resulting in monosomy of the RUNX1 gene that is directly related to thrombocytopenia and defect in platelet functionality (Beri-Dexheimer, 2008). Additionally, four other cases of chromosomal alteration involving chromosome 21 in patients with FA have been described by Quentin et al. (2011) – two cases involved in complex

k

aryotypes

46,XX,der(1)t(1;21)(p36;q22).ish(RUNX1+,PRDM16+),der(2)t(2;3)(q37q21),der(16)t(

1;16)(q21;q12)[20] and 46,XY,add(21)(q21)[1] /46,XY,der(7)t(7;21)(q32;q22)[3]; one

case with a deletion 46,XX,del(21)(q22.12); one case with a duplication 46,XX, dup(21)(q22.12-q22.3). All four patients progressed to MDS or AML,

confirming the important role of chromosome 21, particularly the RUNX1 gene (21q.22), in the etiopathogenesis of progression to acute leukemia.

In the present study, patient FA11 with trisomy 21 did not have Down syndrome (stimulated peripheral blood karyotype did not detect +21). The occurrence of acquired trisomy 21 led to overexpression of the RUNX1 oncogene in this patient and possibly a stage of clonal evolution to MDS and or AML. The clinical phenotype of patients with

FA is highly heterogeneous, which makes diagnosis difficult because they present symptoms common to several other pathologies such as VATER/VACTERL, Nejmegen syndrome, Seckel syndrome, thrombocytopenia syndrome, TAR syndrome, Diamond-Blackfan anemia, Pearson syndrome, Bloom syndrome, and ataxia-telangiectasia syndrome (Tischkowitz and Hodgson, 2003). Syndromes such as Nejmegen, Seckel, and Bloom may have chromosomal breaks by DEB and MMC in smaller numbers than in FA cases and may be confused with heterozygous patients. For these cases, the search for a specific genetic mutation is mandatory for an accurate diagnosis (Mehta and Jakub, 2018). Therefore, patients with chromosomal fragility tests non-compatible with FA but who have low fragility index and signs suggestive of other pathologies should always perform differential diagnosis with another chromosomal fragility disease.

Our results have relevance for *Sistema Único de Saúde (SUS)* and help in the early recognition of FA. Therefore, we hope that this study encourages public health measures aimed at early diagnosis, and improving the care and treatment of patients and their families. We highlight the importance of monitoring BM by cytogenetic studies in these patients, aiming at the early identification of possible signs of worsening or disease progression to MDS or AML. The HSCT is an important therapeutic modality for patients with these disease progressions.

Acknowledgments

The authors thank the patients, families, and doctors for the data. We are also grateful for the partial support supplied by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for this study – Finance Code 001.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Alter, BP. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. *Pediatr Transplant*. 2005; 7:81-86.

Auerbach, AD. Fanconi Anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp. Hematol*. 1993; 21(6):731-733.

Ayas M, Walter C. Fanconi Anemia patient with AML1 gene amplification and monosomy 7 in pre-transplant myelodysplasia (MDS) relapsing 7 years after successful allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 42(8): 555–557.

Bain, S.M. Human chromosomes: Manual of basic techniques (2nd edition). *Chromosome Res*. 1996; 4: 80–81

Béri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, et al. Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet*. 2008; 16: 1014–1018.

Bonfim C, Nichele S, Loth G, Funke VAM, Nabhan SK, Pilonetto DV, Lima ACM, Pasquini R. Transplantation for Fanconi anaemia: lessons learned from

Brazil.

Lancet Haematol. 2022; 9(3): e228-e236

Borges MLRR, Matos RR, Amaral BD, et al. Molecular Cytogenetic Approach to Characterize Novel and Cryptic Chromosome Abnormalities in Childhood Myeloid Malignances of Fanconi Anemia. JPediatric Hematol/Oncol. 2017; 39(2): e85-e91.

Byrd RS, Zwerdling T, Moghaddam B, et al. Monosomy 21q22.11-q22.13 presenting as a Fanconi anemia phenotype. Am J Med Genet. 2011; 155(1): 120–125.

Caputo LZ. Implantação da técnica de quebras cromossômicas com Diepoxibutano (DEB) em laboratório de citogenética: um estudo de 148 casos [thesis]. São paulo: Universidade de São Paulo;2002.111p.

Castella M, Pujol R, Callén E, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. J Med Genet. 2011; 48(4): 242- 250.

Cioc AM, Wagner JE, MacMillan ML, et al. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. Am J Clinical Pathol. 2010; 133(1): 92–100.

Gueiderikh A, Maczkowiak-Chartois F, Rosselli F. A new frontier in Fanconi anemia: From DNA repair to ribosome biogenesis. Blood Rev. 2022; 52: 100904.

Hannah Tamary, Daniella Nishri, Joanne Yacobovich, et al. Frequency and natural history of inherited bone marrow failure syndromes: the Israeli Inherited Bone Marrow Failure Registry. Haematologica. 2010; 95(8): 1300-

1307.

ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020) Reprint of: Cytogenetic and Genome Research (2020) Vol. 149, No. 1–2 1st Edition. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (Editors). Karger, Basel, 170pp.

Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003; 101(4): 1249-1256.

Liehr T. Fluorescence in situ Hybridization (FISH) Application Guide. 2ed. Berlin: Springer, 2016; 1: 429-444

Mehta PA, Jakub T. Fanconi anemia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al. (eds). *Gene Reviews*. 2018. University of Washington: Seattle, WA.

Mehta PA., Richard E. Harris, Stella M, et al. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 203(2): 180-186.

Nowzari H, Jorgensen MG, Contreras A, et al. Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. *J Periodontol*. 2001; 72(11): 1601-1606.

Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia*. 2012; 2012:238731.

Pilonetto DV, Pereira NF, Bonfim CMS, et al. A strategy for molecular

diagnostics of Fanconi anemia in Brazilian patients. *Mol Genet Genomic Med*. 2017; 5(4): 360–372.

Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R, et al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 2011; 117(15): e161–e170.

Rodriguez DEA, Lima CSP, Lourenço GJ, et al. Molecular analysis of the most prevalent mutations of the FANCA and FANCC genes in Brazilian patients with Fanconi anaemia. *Genet Mol Biol*. 2005; 28(2): 205-209.

Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet*. 2011; 155(8): 1877–1883.

Sagaseta de Ilurdoz M. Updating Fanconi's anaemia. *An Sist Sanit Navar*. 2003; 26(1):63-78.

Santos PAD. Síndromes de falência medular congênitas: da fisiopatologia à clínica [thesis]. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2017.61p.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971; 30(7731): 971-2.

Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev*. 2010; 24(3): 101–122.

Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood*. 2006; 107(11): 4223-33.

Testa JR; Misawa S, OGREMA N, et al. Chromosomal alterations in acute leukemia patients. Studies with improved culture methods. Cancer research. 1985; 45: 430-434

Tischkowitz MD and Hodgson SV. Fanconi anaemia. J Med Genet. 2003; 40(1): 1-10.

Veiga LBA. Anemia de Fanconi: Análise citogenética [thesis]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2009. 147p.

Zen PRG, Moraes FN, Rosa RFB, et al. Clinical characteristics of patients with Fanconianemia. Rev Paul Pediatr. 2011; 29(3): 392-9.

FIGURES

Figure 1.

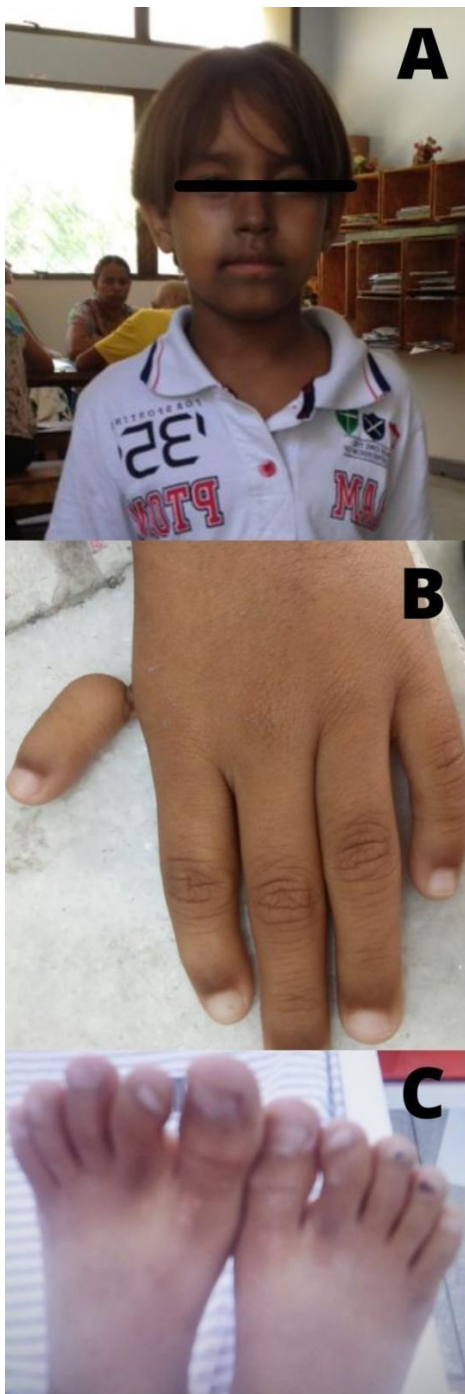
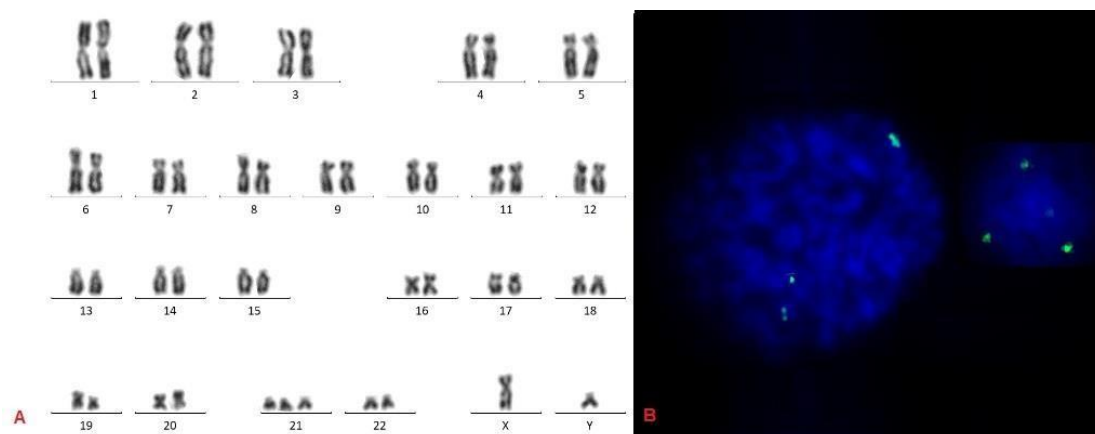


Figure 2.



LEGENDS

FIGURE

Figure 1- Presentation of the clinical symptoms of FA. a) Hyperpigmentation on the face; b) Hypoplasia of the thumb; c) skeletal malformation in the feet.

Figure 2.- Cytogenetic data of patient FA11. a) Karyotype showing 47,XY,+ 21 b) FISH showing +21.

TABLES

Table 1. Standard values of the
MMC test

AF	General Events	Events/cell	Number of cell affected
Negative	≤ 9	$\leq 0,39$	$\leq 20\%$
Mosaic	10 - 14.	0,40 - 0,79	20% - 40%
Positive	> 14	$\geq 0,80$	$> 40\%$

Table 2. Results of the fragility test
by MMC

Cases	General Events	Events/Analyzed cells	Events/Affected cells	Affected cells (%)
FA1	31	1.24	2.38	52%
FA2	62	2.48	3.1	80%
FA3	21	0.86	1.3	66%
FA4	58	5.8	5.8	100%
FA5	32	1.28	2.13	60%
FA6	34	1.36	1.88	72%
FA7	27	1.08	1.8	60%
FA8	65	5.41	6.5	84%
FA9	22	0.88	1.83	48%
FA10	16	1.3	2	67%
FA11	100	5.3	5.5	95%
FA12	20	0.8	1.8	44%
FA13	86	6.61	6.61	100%
FA14	15	0.8	1.5	55%
FA15	15	0.8	1.6	46%
Mosaic				
FA16	10	0,4	1,66	24%

Table 3. Clinical and demographic data of patients with FA

Cases	Sex	Age(years)	CG	Origin	Clinical Symptoms	BM	karyotype	Status
FA1	M	7	Yes	Pesqueira – PE	Café au lait spots, hematological, protruding ear	Hypoplasia	46,XY[20]	Alive
FA2	M	4	Yes	Paranatama – PE	Café au lait spots, skeletal and hematological alteration	Hypoplasia	46,XY[20]	Alive
FA3	M	3	No	Recife – PE	Short stature, Café au lait spots, renal agenesis, skeletal alteration, protruding ear	Normal	46,XY[20]	Alive
FA4	F	9	Yes	Bom Conselho- PE	Café au lait spots and hematological alteration	Aplasia	-	Alive
FA5	M	10	Yes	Pesqueira – PE	Café au lait spots, skeletal and hematological alteration, protruding ear	Hypoplasia	46,XY[20]	Alive
FA6	F	14	No	Xexéu – PE	Hematological alteration, ectopic and horseshoe kidneys	Hypoplasia	-	Alive
FA7	F	7	No	Sairé -PE	Café au lait spots, short stature and protruding ears	Hypoplasia	46,XX[20]	Alive
FA8	F	34	Yes	Betânia-PE	Thumb e hematological alteration	Hypoplasia	46,XX[20]	Alive
FA9	M	12	Yes	Ouricuri – PE	Café au lait spots and hematological alteration	Hypoplasia	-	Alive
FA10	F	17	Yes	Ouricuri – PE	Café au lait spots and skeletal alteration	Hypoplasia	-	Alive
FA11	M	6	Yes	Peixinhos-PE	Short stature, protruding ears, skeletal and hematological alteration	Hypoplasia	47,XY,+21[15]	Alive
FA12	M	16	No	Gravatá-PE	Hematological alteration hepatosplenomegaly	Hypoplasia	46,XY[20]	Death (19 years)
FA13	F	6	No	IATI-PE	Hematological alteration and microcephaly	Hypoplasia	-	Alive
FA14	F	2	Yes	Floresta-PE	Café au lait spots, hematological and skeletal disorders	Hypoplasia	-	Alive
FA15	F	8	No	Recife-PE	Hematological alteration, heart disease	Hypoplasia	-	Alive
FA16	F	8	Yes	Pesqueira- PE	Café au lait spots and protruding ear	Normal	-	Alive

CG: Consanguineous marriage; BM: Bone marrow; M: Male; F: Female.

3.3 ARTIGO III

FANCONI ANEMIA PATIENTS FROM PERNAMBUCO, BRAZIL: A NEW FOUNDER PATHOGENIC VARIANT IN FANCA

Maria Luiza Rocha da Rosa Borges¹, Terezinha de Jesus Marques Salles², Juan Llerena Junior³, Fabio Miyajima⁴, Neide Santos¹.

¹ *Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE/Brazil*

² *Centro Especializado em Oncohematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife-PE/Brazil.*

³ *Centro de Genética Médica & Centro de Doenças Raras, Instituto Nacional Fernandes Figueira, Fiocruz-RJ, RJ/Brazil.*

⁴ *Rede Genômica, Fundação Oswaldo Cruz, Ceará/Brazil*

Short title: NOVEL MUTATIONS IN FANCONI ANEMIA BRAZILIAN PATIENTS

Autor correspondente: Maria Luiza Rocha da Rosa Borges, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, PE, Brazil. E-mail: marialuiza.rosaborges@hotmail.com

Acknowledgments

We thank Dr. Sayoana Gonzalez and Isabelle de Oliveira Moraes and the entire team from the Laboratory of Genomic Medicine - Instituto Nacional Fernandes Figueira - Fiocruz-RJ for their partnership in carrying out the genetic analyses.

The present work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001

MANUSCRITO SUBMETIDO NA REVISTA MOLECULAR BIOLOGY REPORTS
FATOR DE IMPACTO: 2.7 ; QUALIS 2016 : B2.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare disease with a heterogeneous genetic basis and its etiopathogenesis is related to mutations in 22 genes involved the DNA repair mechanism. The symptoms of FA include café au lait spots, skeletal changes, deafness, hematological changes and bone marrow hypoplasia. Six patients with diagnosis of FA were analyzed by next-generation sequencing (Nextseq 500) using a clinical panel of FA genes. In the analysis six mutation were found, four in the *FANCA* gene (c.3788_3790delTCT; c.2535_2536delCT; c.1475A>G and c.4011-2A>C) and two in *FANCG* gene (c.1077-2A>G and c.908T>C). This is the first report of the c.4011-2A>C variant in *FANCA* which is a splicing acceptor mutation. Mutations in the canonical splicing sequences usually lead to a single exon skipping, in which case several distinct transcripts can be generated, resulting in mRNA isoforms that can result in a truncated or non-functional protein product. The c.1475A>G variant had only been reported once in Brazilian patients. The c.908T>C variant in *FANCG*, on the other hand, had never been reported in Brazilian patients. The molecular study of FA patients is extremely important to better elucidate the etiopathogenesis of the disease helping directly in the creation of new therapeutic methods

Key words: Fanconi anemia, FANCA, Pathogenic variant

Introduction

Fanconi anemia (FA) is a genetically based disease arising from mutations in genes involved in the DNA repair mechanism. This failure in the repair system leads to spontaneous chromosomal fragility, which is the main characteristic used for diagnosis. The gold standard for the diagnosis of the disease is the chromosomal fragility test, where DNA damage is induced through exposure to alkylating agents such as Diepoxybutane (DEB) and Mitomycin C (MMC), thus causing an increase in the chromosomal fragility present in patients with FA [1].

The main clinical laboratory symptoms in FA are short stature, presence of café au lait spots, protruding ears, skeletal changes, renal agenesis, deafness, cytopenia(s) and macrocytosis in peripheral blood, bone marrow hypoplasia, high HbF [2]. The characteristics in FA are very heterogeneous and often common to several other diseases, making the clinical characterization of patients often difficult to perform. The differential diagnosis with diseases that course with skeletal malformations or even the concomitance of the two pathologies such as VACTERL-H should always be performed [3].

The pathogenesis of FA is related to the abnormality of at least one of the 22 *FANC*'s genes (*FANCA-FANCV*), whose protein products play an important role in maintaining the integrity of the genome through DNA repair in cases of mutations. FA can be caused by biallelic mutations in genes, heterozygosity in the *FANCB* gene or by dominant negative mutation in the *RAD51* gene [4]. The genetic heterogeneity associated with FA makes molecular diagnosis laborious and costly in addition to the high number of associated genes, many unique disease-causing mutations have been reported in all FA genes [5].

Population studies with FA are still scarce in Brazil. To date, we do not have an epidemiological data on the disease in the country. The most recent study by Pilonetto *et al.* (2017)^[6] carried out mutation research in the *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* genes in 255 patients, 68 out of them from the Northeast, where 22 new mutations were identified. In the Northeast, bone marrow cytogenetic follow-up studies to assess disease evolution have revealed new disease-associated chromosomal alterations [7].

Materials and methods

This study was carried out with six pediatric patients (0 - 18 years old) diagnosed with Fanconi Anemia treated at the pediatric oncohematology outpatient clinic of the

Oswaldo Cruz University Hospital (HUOC), Recife/Pernambuco. For mutation analysis, state-of-the-art sequencing with expanded capture Trusight One (Illumina) was performed on the Nextseq 500 equipment with base space analysis method and variant interpreter (Illumina) using GRCh37 /hg19 as the reference genome with a clinical panel. containing the 33 genes: ATM, ATR, BLM, BRCA1, BRCA2, BRP1, CENPJ, CEP152, CEP63, COX4I1, DNA2, ERCC4, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, NBN , NF1, NIN, PALB2, RAD51, RAD51C, RBBP8, RBM8A, SLX4, UBE2T, XRCC2.

Results were searched and compared in the following public consultation databases: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>, The Genome Aggregation Database (gnomAD), <https://gnomad.broadinstitute.org>, Brazilian Online Mutation Archive (ABraOM), <https://abraom.ib.usp.br/>, Recommendations from the Human Genome Variation Society (HGVS), <https://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html>, and Public archive of interpretations of clinically relevant variants (ClinVar), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

Results and discussion

In this study, six pediatric patients with FA were analyzed based on clinical characteristics and by the MMC chromosomal fragility test. Ages ranged between 8 and 16 years (mean 10.8 years), three were male and three were female. Five (83.3%) were children of consanguineous marriages and all came from the state of Pernambuco, three of them (50%) came from the agreste region, two (33.4%) from the sertão and one (16.6%) from the metropolitan region of Recife.

Of the six patients studied, four of them had mutations in the *FANCA* gene, and two had mutations in the *FANCG* gene. In *FANCA* two homozygous mutations, c.2535_2536delCT and c.3788_3790delTCT, and two heterozygous mutations, c.4011-2A>C and c.1475A>G. In *FANCG*, one in homozygosity, c.1077-2A>G, and two in heterozygosity, c.1077-2A>G and c.908T>C. The classifications of these variants followed the recommendations of the American College of Medical Genetics-ACMG ^[8] and are shown in table 1.

Of the total number of variants found, we highlight three rare mutations found in FA patients from Pernambuco (Northeast Brazil). A mutation in the *FANCA* gene in intronic

region 40 (c.4011-2A>C) not yet described in the literature, another mutation in the *FANCG* gene exon 07 (c.908T>C) never described in Brazilian patients, and a rare mutation in *FANCG* exon 16 (c.1475A>G) described in only one Brazilian patient to date [9].

Mutation analysis studies in populations with FA show that about 90% of patients have a higher frequency of mutations in the *FANCA* (65%), *FANCC* (15%) and *FANCG* (10%) genes, respectively [10]. However, in the study carried out by Pillioneto *et al.* (2017)^[6] showed that in Brazil the frequency of mutations in *FANCG* (23%) is higher than *FANCC*. In this study, the patients analyzed presented mutations in *FANCA* and *FANCG*, corroborating the literature.

FANCA is the gene with the highest frequency of mutations reported in patients with FA. In this study, four patients (66.6%) had *FANCA* mutations (c.3788_3790delTCT; c.2535_2536delCT; c.1475A>G and c.4011-2A>C). Of these, two (33.3%) had the c.3788_3790delTCT variant in homozygosity. It is estimated that in the European population about 25% of patients with FA have this mutation [9]. However, according to studies carried out by Levran *et al.* (2005)^[11] and Pillioneto *et al.* (2017)^[6] this frequency is even higher in the Brazilian population, being present in about 30% of Brazilian patients with FA and having its highest incidence in the southern region of the country, which can be explained by the higher incidence of European descent in this region.

The second variant found in this study was c.2535_2536delCT which is described in less than 0.001% of patients with FA, thus being considered a very rare mutation as reported by Pillioneto *et al.* (2017)^[6], in Brazilian patients from the Northeast region. The third variant found in this study was c.1475A>G which is considered to be extremely rare which still does not have an allele frequency in population databases for public consultation (gnomAD, AbraOM). The first report was made by Levran *et al.* (1997)^[9] being classified as a pathogenic genetic variant. This is the second report of this variant in a Brazilian patient and the first report of this mutation in a patient from the Northeast region of Brazil. The fourth variant observed was c.4011-2A>C located in a canonical splicing acceptor site which has not yet been identified in population studies according to public consultation databases (gnomAD, AbraOM). It was also not described in the literature or placed in the clinically relevant variants database (Clinvar). However the variant was classified as pathogenic according to the recommendations of the American College of Medical Genetics-ACMG (Table 2).

Mutations in acceptor splicing sites (ASS) can lead to a change in the open reading

frame which can lead to a decrease in the level of specific messenger RNA and thus a deprivation of the protein level that can result in aberrant and / or nonfunctional cellular metabolism [12]. Mutations in the canonical splicing sequences usually lead to a single exon skipping, in this situation, several distinct transcripts can be generated, resulting in mRNA isoforms.

A meta-analysis study on splicing mutations (478 mutations in 38 selected genes) indicated that donor splicing site mutations were more prevalent than splicing acceptor site variants (ratio 1.5:1) [13]. Therefore, the new reported variant (c.4011-2A>C/ref. GRCh38/Hg38: chr16:89,739,291 T>G) is located in an ASS site on the border between intron 40 and exon 41, causing an alteration crucial part of ASS, a highly conserved region, in which the typical sequence “AG” is changed to “CG”, thus likely obliterating splicing and causing exon 41 not to be transcribed and then translated. In addition to obliterating intron 40 - exon 41 ASS, and consequently skipping transcription of the entire exon 41 (~54 amino acids) and shortening the overall transcript(s), this mutation will also be responsible for a frameshift downstream, which will have an even greater impact on the resulting protein. The introduced frameshift can be explained by the fact that exon 41 contains 161 nucleotides, which is not an exact multiple of 3 and will therefore shift the reading frame to the next exon (42), hence the expected amino acid sequences and the introduction of an early stop codon (depending on the isoform evaluated), generating a non-functional FANCA protein.

The FANCA protein is a crucial element in the core complex of the FA repair pathway, when the main core is not functional, the formation and activation of the ID2 complex (FANCD2 and FANCI) through ubiquitination also does not occur, causing the repair pathway to collapse [14]. It is also important to note that this reported mutation also maps to a 3'UTR of a *Zinc Finger protein* gene (ZNF276, ENSG00000158805.12), which is transcribed in the opposite direction (positive strand) to the *FANCA* gene.

FANCG is the third most frequently mutated gene, representing about 10% of the reported cases of FA worldwide. In Brazil, a frequency of mutations in this gene is observed in approximately 23% of patients with FA. [15]. In this work, we report two patients with mutations in *FANCG*, specifically the variants c.1077-2A>G and c.908T>C. The c.1077-2A>G variant is located in a canonical splicing acceptor site and has an allele frequency below 0.001% in the public consultation population databases (gnomAD, AbraOM), and is also a rare variant. The first report was performed by Demuth *et al.* (2000)^[16], in a patient of European origin and it was later reported in Brazilian patients by Pilloneto *et al.* (2017)^[6].

This variant was classified as pathogenic according to the recommendations of the American College of Medical Genetics-ACMG. The second variant identified, c.908T>C, was reported for the first time by Auerbach *et al.* (2003)^[17] in an individual of Hispanic ethnicity. The allele frequency of this variant is also below 0.001% in the public consultation population databases (gnomAD, AbraOM). However, there is controversy regarding the classification of this variant, it was deposited in the database of variants with clinical cleavage relevance (ID571355) as pathogenic and as a variant with uncertain significance. In this work, it was classified as possibly pathogenic, according to the recommendations of the American College of Medical Genetics-ACMG. It is important to note that this variant had not been previously reported in Brazilian patients (Table 2).

Conclusion

The analysis of the mutational profile of FA patients in the state of Pernambuco reported for the first time the c.908T>C variant and the second report of the c.1475A>G variant in Brazilian patients, in addition to a new mutation in the *FANCA* gene, c. 4011-2A>C(ref.GRCh38/Hg38:chr16:89,739,291T>G), associated with the disease. The functional impact of this mutation appears to be of great relevance and should be complemented by new experimental analyses including functional genomics and transcriptomic / RNA sequencing. In addition, in silico analysis on individual transcriptional isoforms and predictive modeling to evaluate the resulting proteins are also required. This study shows the importance of new research techniques linked to diagnosis, such as gene sequencing to unravel the genomic alterations of patients with FA serving to correlate with the clinical diversity of the disease, and as a potential for therapeutic innovations and it contributes to updating the genetic profile of the disease in the Brazilian population.

Declarations

Funding

The present work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001

Conflict of Interest

The authors declare that no conflict of interest could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

Authors Contributions

MLRRB: data curation, investigation, formal analysis, writing-original draft. TJMS: data curation, project administration, resources, writingreview and editing. JLJ: Methodology, software. NS: data curation, project administration, resources, writing review and editing. All authors read and approved the final version.

Referências

1. Auerbach AD (1993) Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane(DEB) test. Exp Hematol 21:731.<https://doi.org/10.1002%2F0471142905.hg0807s85>
2. Pinto AN, Coutinho MB, Costa E, Fernandes R, Soares T, Almeida, Sousa (2016) Otologic and audiology findings in children with Fanconi anemia. Acta Otorrinolaringol Gallega 9:89-97.<https://doi.org/10.1002/pbc.26155>
3. Alter BP, Giri N (2016) Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi Anemia According to PHENOS: VACTERL-H, PHENOS, and Fanconi Anemia. Am J Med Genet Part A170:1520–1524. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37637>
4. Peake JD, Noguchi E (2022) Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair. Hum Genet 21. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02462-9>
5. Steinberg-Shemer O, Goldberg TA, Yacobovich J, Levin C, Koren A, Revel-Vilk S, Ben-Ami T, Kuperman AA, Zemer VS, Toren A *et al.* (2020) characterization and genotype-phenotype correlation of patients with Fanconi anemia in a multi-ethnic population. Haematologica 105:1825-1834.<https://doi.org/10.3324/haematol.2019.222877>

6. Pilonetto DV, Pereira NF, Bonfim CMS, Ribeiro LL, Bitencourt MA, Kerkhoven L, Floor K, Ameziane N, Joenje H, Gille JJP *et al* (2017) A strategy for molecular diagnostics of Fanconi anemia in Brazilian patients. *Mol Genet Genomic Med* 9:360-372. <https://doi.org/10.1002/mgg3.293>

7. Borges ML, Capela de Matos RR, Amaral BD, Soares-Ventura EM, Leite EP, Silva MO, Cornélio MT, Silva ML, Liehr T, Marques-Salles TDJ (2017) Molecular Cytogenetic Approach to Characterize Novel and Cryptic Chromosome Abnormalities in Childhood Myeloid Malignancies of Fanconi Anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 39:e85-e91 <https://doi.org/10.1097/mpb.0000000000000720>

8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E *et al.* (2015) ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

9. Levrán O, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, Auerbach AD (1997) Sequence variation in the Fanconi Anemia gene FAA. *Proc + Natl Acad SciUSA* 94:13051-13056. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13051>

10. Jasmine DP, Noguchi E (2022) Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair. *Hum Genet* 21. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02462-9>

11. Levrán O, Diotti R, Pujara K, Batish SD, Hanenberg H, Auerbach AD (2005) Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat* 25:142-149. <https://doi.org/10.1002/humu.20125>

12. Abramowicz A, Gos M (2018) Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genetics* 59:253–268. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0444-7>
 13. Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, Cooper DN (2007) Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat* 28:150–158. <https://doi.org/10.1002/humu.20400>
 14. Rennie ML, Lemonidis K, Arkinson C, Chaugule VK, Clarke M, Streetley J, Spagnolo L & Walden H (2020) Differential functions of FANCI and FANCD2 ubiquitination stabilize ID2 complex on DNA. *EMBO Rep* 21:e50133. <https://doi.org/10.15252/embr.202050133>
 15. Magdalena N, Pilonetto DV, Bitencourt MA, Pereira NF, Ribeiro RC, Jeng M, Pasquini R (2005) Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the FANCA 3788-3790del mutation. *Brazilian J Med Biol Res* 38:669-673.
 16. Demuth I, Wlodarski M, Tipping AJ, Morgan NV, De Winter JP, Thiel M, Gräsl S, Schindler D, D'andrea AD, Altay C, *et al.* (2000) Spectrum of mutations in the Fanconi anemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Europ J Hum Genetics* 8:861-868. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200552>
-
17. Auerbach AD, Greenbaum J, Pujara K, Batish SD, Bitencourt MA, Kokemohr I, Schneider H, Lobitzc S, Pasquini R, Giampietro PF *et al* (2003) INTERNATIONAL FANCONI ANEMIA REGISTRY. Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat* 21:158-168. <https://doi.org/10.1002/humu.10166>
-

TABLES

Table 1. Mutations found in patients with Fanconi anemia

Patient	Consanguineous	Mutation 1	Mutation 2	Allele
FA1	Yes	c.2535_2536delCT	c.2535_2536delCT	Homozygous
FA2	Yes	c.1077-2A>G	c.908T>C	Heterozygous
FA3	No	c.4011-2A>C	c.1475A>G	Heterozygous
FA4	Yes	c.1077-2A>G	c.1077-2A>G	Homozygous
FA5	Yes	c.3788_3790delTCT	c.3788_3790delTCT	Homozygous
FA6	Yes	c.3788_3790delTCT	c.3788_3790delTCT	Homozygous

Table 2. Identification of the variants found

Location	Mutation	Effect	Type of mutation	Reports in Brazil/Northeast	Reference
FANCA					
ex27	c.2535_2526delCT	p.Cys846Glnfs*20	<i>frameshift</i> ⁽¹⁾	6/2 Pilonetto <i>et al.</i> (2017)	Levrán <i>et al.</i> (1997)
i40	c.4011-2A>C	ND	<i>Aceptor de splicing</i>	NR	Nova mutação
ex16	c.1475A>G	p.His492Arg	<i>missense</i> ⁽²⁾	1/-	Levrán <i>et al.</i> (1997)
ex38	c.3788_3790delTCT	p.Phe1263del	<i>In frame</i> ⁽³⁾	67/9 Pilonetto <i>et al.</i> (2017)	Levrán <i>et al.</i> (1997)
FANCG					
i8	c.1077-2A>G	<i>Splice</i>	<i>Aceptor de splicing</i>	28/8 Pilonetto <i>et al.</i> (2017)	Demuth <i>et al.</i> (2000)
ex07	c.908T>C	p.Leu303Pro	<i>missense</i> ⁽²⁾	NR	Auerbach <i>et al.</i> (2003)

ND: Not determined; NR : not reported

(1) *Framshift*: change in reading frame that may result in different gene product or no product.

(2) *Missense*: missense mutation (encodes a different amino acid)

(3) *in Frame*: amino acid deletion followed by insertion that does not change the reading frame, but leads to the synthesis of a different product

4 DISCUSSÃO GERAL

Diante dos resultados expostos podemos observar que os dados epidemiológicos a respeito da anemia de Fanconi no Brasil ainda são muito escassos, assim como, os centros que realizam o diagnóstico citogenético da doença através do SUS, o que acarreta que a doença seja subdiagnosticada. O perfil clínico da doença no estado de Pernambuco não diferiu do perfil previamente descrito em literatura, no qual inclui baixa estatura, manchas café com leite, alterações esqueléticas, alterações hematológicas e infecções recorrentes. (PILLONETO *et al.*, 2017) Apesar da pequena casuística foi observado presença de anomalias menos frequentes como agenesia renal e rins em ferradura.

A implantação do teste diagnóstico de fragilidade cromossômica no estado de PE, em 2018 veio para agilizar o diagnóstico de 16 pacientes com AF, assim como fazer o acompanhamento das famílias dos mesmos. Este número diagnóstico corresponde a uma média de 4,5 diagnósticos por ano. Dado este que mostra o quanto a doença vinha sendo subdiagnosticada, visto que a taxa de diagnóstico relatada na literatura da doença é de 3,5 casos / ano na região nordeste (compostapor nove estados) (PILLONETO *et al.*, 2017).

Em relação a idade de diagnóstico da doença, um estudo anterior observou que a idade média ao diagnóstico da doença no estado de PE era de 13 anos (dado não publicado), mas após a implantação do teste de fragilidade com a MMC, a média de idade ao diagnóstico caiu para 8,5 anos. O diagnóstico precoce proporciona um tratamento direcionado, aumentando assim a qualidade de vida do paciente.

Nesse estudo observamos que 87,5% dos pacientes eram provenientes da região de agreste e sertão do estado, e 62,5% eram filhos de pais consanguíneos.

A consanguinidade é um costume cultural bastante presente nas regiões do agreste e sertão de Pernambuco, onde muitas vezes o aconselhamento genético não é realizado devido ao precário ao sistema de saúde. Sendo principalmente importante nestas regiões a divulgação da doença visando o diagnóstico precoce e aconselhamento genético a essas famílias. O alto número

de consanguinidade também tem sido observado em outros países em desenvolvimento que também apontam a AF como uma doença subdiagnosticada e que precisa de uma atenção especial não só para o paciente, mas para toda a família (SIDDIQUI *et al.*, 2020).

A anemia de Fanconi é uma doença caracterizada por falência medular com predisposição de cerca de 500X para malignidade hematológicas, sendo assim, a análise citogenética da medula óssea um importante método de acompanhamento da doença, visando identificar alterações cromossômicas, permitindo a detecção precoce de evolução para SMD e/ou LMA. Neste estudo foi encontrado um paciente com trissomia do cromossomo 21 adquirida (FA11-47,XY,+21) que sabidamente está envolvida em casos de leucemias agudas e SMD em evolução clonal. Diversos genes encontrados no cromossomo 21 estão envolvidos da leucemogênese, como os genes *GATA1*, *GATA2* E *GATA3* e o gene *RUNX1* que tem papel importante na hematopoiese (Byrd *et al.*, 2011).

Mutações genéticas relacionadas a AF foram relatadas em 21 genes, as mais frequentes no Brasil foram encontradas nos genes *FANCA*, *FANCC* e *FANCG*, respectivamente. De acordo com Pilonetto *et al.* (2017) a mutação c.3788_3790delTCT no *FANCA* foi a mais frequentemente encontrada na região Nordeste, seguida pela IVS8+2A>G no *FANCG* e c.456+4A>T no *FANCC*. A análise molecular em seis pacientes desse estudo mostrou que o gene mais frequentemente afetado foi o *FANCA*, seguido pelo *FANCG*, como relatado na literatura. No gene *FANCA* as mutações observadas foram: c.2535_2536delCT, c.3788_3790delTCT, c.4011-2A>C e c.1475A>G. De grande interesse para literatura o encontro das mutações 1475A>G, ainda não descrita na região nordeste do Brasil, e a mutação c.4011-2A>C sem relatos na literatura. Em relação ao gene *FANCG* foram encontradas as mutações c.1077-2A>G e c.908T>C. A mutação 908T>C foi encontrada apenas uma vez em pacientes AF brasileiros, descrita por Levran *et al.* (1997). Estes dados mostram a importância dos estudos moleculares dos pacientes AF do Brasil, devido a miscigenação étnica da população brasileira, além de que possivelmente esses estudos tragam casos inéditos que acrescentem dados novos à literatura existente.

A partir da definição do perfil mutacional dos pacientes do estado de Pernambuco será possível criar um painel de triagem genético regional para

auxiliar o diagnóstico precoce.

Como doença rara, a AF deve ter atenção especial pelo SUS, com diagnóstico precoce através do teste de fragilidade cromossômica pela MMC, associada ao teste molecular e acompanhamento da doença através da citogenética da medula óssea. A implantação desse fluxo diagnóstico irá proporcionar o diagnóstico precoce e um eficaz aconselhamento genético familiar, resultando em um tratamento mais específico e uma melhor qualidade de vida ao paciente e sua família.

Por outro lado, os casos de AF contribuirão para literatura com estudos mais detalhados sobre as características clínicas, epidemiologia e dados moleculares sobre a doença. Estimulando pesquisas para descoberta de novos métodos diagnósticos e de tratamentos, visando torná-la menos subdiagnosticada e proporcionando melhoria da sobrevida no Brasil, especialmente na região Nordeste.

5 CONCLUSÕES

1. Na AF, três foram os sintomas mais frequentes: anormalidades hematológicas, alterações da coloração da pele e anormalidades esqueléticas. Apontando para um perfil clínico similar ao perfil clássico da doença.
2. O diagnóstico da AF usando o teste de fragilidade cromossômica com a MMC em Pernambuco, mostrou que anemia de Fanconi apresenta uma frequência maior do que a estimada na região Nordeste. E mostrou a importância deste teste para rede SUS.
3. Os estudos citogenéticos na MO para investigar anormalidades cromossômicas que causam risco de evolução clonal e/ou transformação leucêmica, como o paciente AF11 com trissomia adquirida 21 (47,XY,+21) é de extrema importância. Pois, relato dessas anormalidades cromossômicas indicarão transplante de MO precoce para evitar a leucemização, cujo prognóstico é muito desfavorável.
4. A análise mutacional permitiu a identificação de uma nova mutação relacionada com a doença e com grande potencial deletério na proteína (c.4011-2A>C). E relatou a presença de outras duas mutações raras (1475A>G, 908T>C). Mostrando a importância de se realizar o diagnóstico molecular desses pacientes e da implantação dessa metodologia no SUS do estado de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- Aftab, Saima I, Saba K; Muhammad I, NADIR A, Hussain J, Khaliq S, Shagufta; and Shahida M. Analysis of FANCC gene mutations (IVS4+4A>T, del322G, and R548X) in patients with Fanconi anemia in Pakistan. **Turk. J. Med. Sci.**, 47:391-398,2017.
- Albers CA, Paul DS, Schulze H, Freson K, Stephens JC, Smethurst PA, Jolley JD, Cvejic A, Mk, Bertone P, *et al.*Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. **Nat Genet**,44:435–439,2012
- Alcón P, Shakeel S, Chen ZA, Rappsilber J, Patel KJ, Passmore LA. FANCD2-FANCI is a clamp stabilized on DNA by monoubiquitination of FANCD2 during DNA repair. **Nat Struct Mol Biol**, 27:240–248,2020.
- Ali BH, Olfa M, Sahar E, Faten T, Wiem A, Fethi M, *et al.*FANCA Gene Mutations in North African Fanconi Anemia Patients. **Frontiers in Genetics**, 12:1-12,2021.
- Alter BP. Arm anomalies and bone marrow failure may go hand in hand. **J Hand Surg Am**, 17: 566-571,1992
- Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA, Uchida T, Velagaleti GV, Elghetany MT. Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. **Cancer Genet Cytogenet**, 117:125-131,2000
- Alter B.P, Giri N. Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi Anemia According to PHENOS: VACTERL-H, PHENOS, and Fanconi Anemia. **Am. J. Med. Genet. Part A**, 170:1520–1524, 2016.
- Alter BP, Rosenberg PS. VACTERL-H Association and Fanconi anemia. **Mol Syndromol**, 4:87-93,2013
- Alves AFNR. Alterações tireoidianas e outras alterações endócrinas em crianças e adolescentes com anemia de fanconi. Curitiba. Monografia [Especialização em endocrinologia pediátrica] - Universidade Federal do Paraná, 2016.
- Amaral A, De Lima S, Silva L, Lemos-Pinto M, Lucena L, Marques-Salles T, Silva E, Magnata S. A new methodology for diagnosis of fanconi anemia based on biological dosimetry. **Archives in Biosciences & Health**, 1:189-200,2019
- Asur RS, Kimble DC, Lach FP, Jung M, Donovan FX, Kamat A, Noonan RJ, Thomas JW, Park M, Chines P, Vlachos A, Auerbach AD, Smogorzewska A, Chandrasekharappa SC. Somatic mosaicism of an intragenic FANCB duplication in both fibroblast and peripheral blood cells observed in a Fanconi anemia patient leads to milder phenotype. **Mol Genet Genomic Med**, 6:77–91, 2018
- Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry. Relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. **Blood** 73:391-6,1989

Auerbach AD, Adler B, Chaganti RS. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. **Pediatrics**, 67:128-35,1981.

Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. **Exp Hematol**, 21:731-3,1993

Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. **Mutat Res**, 668(1-2):4-10,2009. Bagby G. Recent advances in understanding hematopoiesis in Fanconi Anemia. **F1000Research** 7:105, 2018

Balta G, de Winter JP, Kayserili H, Pronk JC, Joenje H. Fanconi anemia A due to a novel frameshift mutation in hotspot motifs: lack of FANCA protein. **Hum Mutat**,15:578,2000

Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. **J Med Genet** 42:737-48,2005.

Berger R, Bussel A, Schenmetzler C. Cytogenetic studies in four cases of Fanconi's anemia. **Nouv Rev Fr Hematol**, 15:539-50,1975

Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegue E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. **Cell Stem Cell**, 8:16–29,2011

Bloom GE, Warner S, Gerald PS, Diamond LK. Chromosome Abnormalities in Constitutional Aplastic Anemia. **N Engl J Med**, 274:8-14,1966.

Bonfim C, Nichele S, Loth G, Funke VAM, Nabhan SK, Pillonetto DV, Lima ACM, Pasquini R. Transplantation for Fanconi anaemia: lessons learned from Brazil. **Lancet Haematol**, 9:e228–e236,2022

Borges ML, Capela de Matos RR, Amaral BD, Soares-Ventura EM, Leite EP, Silva MO, *et al.* Molecular Cytogenetic Approach to Characterize Novel and Cryptic Chromosome Abnormalities in Childhood Myeloid Malignancies of Fanconi Anemia. **J Pediatr Hematol Oncol**,39:e85-91,2017

Bottega R, Nicchia E, Cappelli E, Ravera S, Rocco D, Faleschini M, Corsolini F, Pierri F, Calvillo M, Russo G. Hypomorphic FANCA mutations correlate with mild mitochondrial and clinical phenotype in Fanconi anemia. **Haematologica**,103(3):417-426,2018.

Botto LD, Khoury MJ, Mastroiacovo P, Castilla EE, Moore CA, Skjaerven R, *et al.* The spectrum of congenital anomalies of the VATER association: an international study. **Am J Med Genet**, 71:8-15,1997.

Brégnard C, Guerra J, Déjardin S, Passalacqua F, Benkirane M, Laguet N.

Upregulated LINE-1 Activity in the Fanconi Anemia Cancer Susceptibility Syndrome Leads to Spontaneous Pro-inflammatory Cytokine Production. **Ebio Medicine**,8:184-194,2016.

Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. **Blood**, 84:1650-5,1994.

Calado RT, Clé DV. Treatment of inherited bone marrow failure syndromes beyond transplantation. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)**, 1: 96-101,2017. Cantres-Velez JA, Blaize JL, Vierra DA, Boisvert RA, Garzon JL, Piraino B, Tan W, Deans AJ, Howlett NG. Cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation of FANCD2 promotes mitotic fidelity. **Mol Cell Biol**, 41:e0023421,2021.

Cappelli E, Ravera S, Vaccaro D, Cuccarolo P, Bartolucci M, Panfoli, Dufour C, Degan P. Mitochondrial respiratory complex I defects in Fanconi anemia. **Trends. Mol. Med**,19: 513–514,2013.

Carapito R, Konantz M, Paillard C, Miao Z, Pichot A, Leduc MS, Yang Y, Bergstrom KL, Mahoney DH, Shardy DL, *et al.* Mutations in signal recognition particle SRP54 cause syndromic neutropenia with Shwachman-Diamond-like features. **J Clin Invest**, 127:4090– 4103,2017.

Casado JA, Valeri A, Sanchez-Domínguez R, Vela P, López A, Navarro S, Alberquilla O, Hanenberg H, Pujol R, Segovia JC, *et al.* Upregulation of NKG2D ligands impairs hematopoietic stem cell function in Fanconi anemia. **J Clin Invest**, 132:e142842,2022.

Castella M, Pujol R, Callén E, Ramírez MJ, Casado JA, Talavera M, Ferro T, Muñoz A, Sevilla J, Madero L, *et al.* Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. **J Med Genet**, 48:242-50,2011.

Castella M, Pujol R, Callén E, Trujillo JP, Casado JA, Gille H, Lach FP, Auerbach AD, Schindler D, Benítez J, *et al.* Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. **Blood**, 117:3759-69,2011.

Català A, S. Ali S, Cuvelier GDE, Steele MG, Klaassen RJ, Fernandez CV, Pastore YD, Abish, S, Rayar M, Jardine L, Breakey VR, *et al.* **Br J of Haematol**, 189:976– 981,2020.

Ceccaldi R, *et al.* Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Stem Cell**, 11(1):36–49,2012

Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 17:337-49,2016.

Cheung RS, Taniguchi T. Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers. **Int J Hematol**,106:335-344,2017.

Chrzanowska KH, Gregorek, H, Dembowska-Bagińska B. Kalina MA, Digweed M.Nijmegen breakage syndrome (NBS). **Orphanet J Rare Dis**, 7:1-19,2012.

Columbaro M, Ravera S, Capanni C, Panfoli I, Cuccarolo P, Stroppiana G, Degan P, Capelli E.Treatment of FANCA Cells with Resveratrol and N-Acetylcysteine: A Comparative Study. **PloS One**, 9: e104857,2014.

Dacie J V, Gilpin A. Refractory anaemia (Fanconi type). Its incidence in three members of one family, with in one case a relationship to chronic haemolytic anaemia with nocturnal haemoglobinuria (Marchiafava-Micheli disease or "nocturnal haemoglobinuria"). **Arch Dis Child**, 9:155-62,1994.

Datta A, Brosh RM Jr. Holding All the Cards-How Fanconi Anemia Proteins Deal with Replication Stress and Preserve Genomic Stability. **Genes (Basel)**, 10:170,2019.

Deans AJ, West SC.DNA interstrand crosslink repair and cancer. **Nat Rev Cancer**, 11:467-80,2011.

Dhanraj S, Matveev A, Li H, Lauhasurayotin S, Jardine L, Cada M, Zlateska B, Taylor C, Zhou J, Mendonza-Londo R. Biallelic mutations in DNAJC21 cause Shwachman-Diamond syndrome. **Blood**,129:1557– 1562,2017.

Dilshad J, Maruf AH,Mainul H. Diamond–Blackfan anemia with mutation in *RPS19*:A case report and an overview of published pieces of literature.**J Pharm Bioallied Sci**, 12: 163–170,2020.

Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Beauvils S, Bellanger F, Mahlaoui N, LambilliotteA, AladjidiN, Bertrand Y, Mialo V, *et al*. Classification of and risk factorsfor hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. **Haematologica**, 97: 1312–1319,2012.

Dosik H, Hsu LY, Todaro GJ, Lee SL, Hirschhorn K, Selirio ES, Alter AA. Leukemia in Fanconi's Anemia: Cytogenetic and Tumor Virus Susceptibility Studies. **Blood**, 36: 341-352,1970.

Dubois EL, Guitton-Sert L, Beliveau M, Parmar K, Chagraoui J, Vignard J, Pauty J,Caron MC, Coulombe Y, Buisson R, *et al*. A Fanci knockout mouse model reveals common and distinct functions for FANCI and FANCD2. **Nucleic Acids Res**,47:7532 7547,2019.

Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Béka'ssy AN, Scimè R, PistorioA, Pistoia V.TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. **Blood**,102:2053-9,2003.

Dulmovits BM, Olson TS.Does immune destruction drive all forms of bone

marrow failure?. **J Clin Invest**, 132:e161288,2022.

Dutrillaux B, Fosse AM. Use of BrdU in the study of cell in normal and abnormal subjects. **Ann genet**, 19:95,1976.

Elder DA., D'Alessio DA., Eyal O., Mueller R., Smith FO., Kansra AR., & Rose, SR. Abnormalities in glucose tolerance are common in children with fanconi anemia and associated with impaired insulin secretion. **Pediatr Blood Cancer**, 51:256– 260,2008.

Elmore E, Swift M. Growth of cultured cells from patients with Fanconi anemia. **J Cell Physiol**, 87:229-33,1975.

Fanconi Anemia Research Fund. Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. 4 ed. **Fanconi Anemia Research Fund**, Oregon:421,2014.

Fanconi G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's Anemia (F.A). **Sem. Hematol**, 4:233-40,1967.

Fajardo NB, Taraviras S, Lygerou Z. Fanconi anemia proteins and genome fragility: unraveling replication defects for cancer therapy. **Trends iCancer**, 8:467-481,2022

Filipović J, Joksić G, Vujić D, Joksi I, Mrasek K, Weise A, Liehr T. First molecular-cytogenetic characterization of Fanconi anemia fragile sites in primary lymphocytes of FA-D2 patients in different stages of the disease. **Molecular Cytogenetics**, 9:1-10,2016

Frontbrune FS, Soulier J, Latour RP. Fanconi anemia. In: Abutalib SA, Hari P. Clinical Manual of Blood and Bone Marrow Transplantation. **Wiley Blackwell**, 23:255-63,2017.

Galeano L, Guevara G. Alteraciones cromosómicas estructurales inducidas por bioflavonoides de la dieta en linfocitos de anemia de Fanconi. **Rev. Cienc. Salud**, 5: 26-36,2007

Garaycoechea JI, Patel KJ. Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia?. **Blood**, 123: 26–34,2013.

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. **Mol Cell**, 7:249-62,2001.

Garriga S, Rosby WH. The incidence of leukemia in families of patients with hypoplasia of the marrow. **Blood**, 14:1008-14,1959.

Geng L, Huntoon CJ, Karnitz LM. RAD18-mediated ubiquitination of PCNA activates the Fanconi anemia DNA repair network. **J Cell Biol**, 191:249-57,2010.

Gennery AR, Slatter MA, Bhattacharya A, Barge D, Haigh S, O'driscoll M,

Coleman R, Abinun M, Flood TJ, Cant AJ, *et al.* The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia. **Clin Immunol**, 113:214-219, 2004.

Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA. Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. **J Clin Endocrinol Metab**, 92:2624–2631, 2007.

Guardiola P, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, Marsh JC, Ball SE, Locatelli F, Vermynen C, Skinner R, *et al.* Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Blood**, 95:422-9, 2000.

Gueiderikh A, Maczkowiak-Charitois F, Rosselli F. A new frontier in Fanconi anemia: From DNA repair to ribosome biogenesis. **Blood Rev**, 52:100904, 2022.

Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, *et al.* Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. **Blood**, 122:3206-9, 2013.

Hirano S, Yamamoto K, Ishiai M, Yamazoe M, Seki M, Matsushita N, Ohzeki M, Yamashita YM, Arakawa H, Buerstedde JM, *et al.* Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. **EMBO**, 24:418-427, 2005.

Huret JL. Fanconi anaemia. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol France**, 2:308-10, 2002.

Huret JL, Tanzer J, Guilhot F, Frocraïn-Herchkovitch C, Savage JR. Karyotype evolution in the bone marrow of a patient with Fanconi anemia: breakpoints in clonal anomalies of this disease. **Cytogenet Cell Genet**, 48:224-7, 1988.

Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. **Nature**, 290:142-143, 1981.

Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. **Nat Rev Genet**, 2:446-57, 2001.

Kelly PF, Radtke S, von Kalle C, Balcik B, Bohn K, Mueller R, Schuesler T, Haren M, Reeves L, Cancelas JA, *et al.* Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. **Mol Ther**, 15:211-219, 2007.

Kim JM, Kee Y, Gurtan A. Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconianemia core complex by FANCM/FAAP24. **Blood**, 111:5215-22, 2008.

Knies K, Inano S, Ramírez MJ, Ishiai M, Surrallés J, Takata M, Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFWD3 cause Fanconi anemia. **J Clin Invest**, 127:3013–27, 2017.

Korgaonkar S, Ghosh K, Vundinti BR (2010) Clinical, genetic and cytogenetic study of Fanconi anemia in an Indian population. **Hematology**, 15:58-62,2010.

Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**, 101:1249-1256,2003.

Kwee ML, Poll EHA., van de Kamp JJP, Koning H, Eriksson AW, Joenje . Unusual response to bifunctional alkylating agents in a case of Fanconi anaemia. **Hum Genet**, 64:384–387,1983.

Langevin F, Crossan GP, Rosado IV, Arends MJ, Patel KJ. FANCD2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. **Nature**, 475:53-8,2011.

Lemonidis K, Arkinson C, Rennie ML, Walden H. Mechanism, specificity, and function of FANCD2-FANCI ubiquitination and deubiquitination. **FEBS. J**, 1-19,2021.

Lévy JM, Stoll C, Korn R. A case of acute leukemia in a girl with Fanconi's anemia. Review of the literature. **Nouv Rev Fr Hematol**, 14:713-20,1974.

Li N, Wang J, Wallace SS, Chen J, Zhou J, D'Andrea AD. Cooperation of the NEIL3 and Fanconi anemia/BRCA pathways in interstrand crosslink repair. **Nucleic Acids Res**, 48:3014–3028,2020.

Liu Y, Ballman K, Li D, Khan S, Derr-Yellin E, Shou W, et al. Impaired function of Fanconi anemia type C-deficient macrophages. **J Leukoc Biol**, 91:333-40,2012.

Liu W, Palovcak A, Li F, Zafar A, Yuan F, Zhang Y. Fanconi anemia pathway as a prospective target for cancer intervention. **Cell & Bioscience**, 10:1-14,2020.

McManus JF, Nguyen N-YN, Davey RA, MacLean HE, Pomilio G, McCormack MP, Chiu WS, Wei AH, Zajac JD, Curtis DJ. Androgens stimulate erythropoiesis through the DNA-binding activity of the androgen receptor in nonhematopoietic cells. **Eur J Haematol**, 0:1–8,2020.

Mankad A, Taniguchi T, Cox B, Akkari Y, Rathbun RK, Lucas L, Bagby G, Olson S, D'Andrea AD, and Grompe M. Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia. **Blood**, 107: 3084–3090,2006.

Mamrak NE, Shimamura A, Howlett NG. Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. **Blood Rev**, 31:93-99,2017.

Miglierina R, Le Coniat M, Berger R. A simple diagnostic test for Fanconi anemia by flow cytometry. **Anal Cell Pathol**, 3:111-8,1991.

Moisés O, Fiesco-Roa, Neelam Giri, Lisa J. McReynolds, Ana F. Best, Blanche P. Alter. Genotype-phenotype associations in Fanconi anemia: A literature review. **Blood Rev**, 37:100589,2019.

Moreno, O.M., Paredes, A.C., Suarez-Obando, F., & Rojas, A. An update on Fanconi anemia: Clinical, cytogenetic and molecular approaches (Review). **Biomed. Rep.**,15: 74,2021.

Myers KC, Sauter S, Zhang X, Bleesing JJ, Davies SM, Wells SI, *et al.* Impaired immune function in children and adults with Fanconi anemia. **Pediatr Blood Cancer**,64:e26599,2017.

Niedzwiedz W, Mosedale G, Johnson M, Ong CY, Pace P, Patel KJ. The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. **Mol Cell**, 15: 607-620,2004.

Nilson L R (1960) Chronic pancytopenia with multiple congenital abnormalities (Fanconi's anaemia). *Acta Paediatr* 49:518-29.

Nowel PC, Bessa E. Prognostic significance of single chromosome abnormalities in preleukemic states. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 42:1-7
Nowzari H, Jorgensen MG, Ta TT, Contreras A, Slots J (2001) Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. **J Periodontol**,72:1601-6,1989.

Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, Winter J.P. Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. **Anemia**,2012:1-9,2012.

Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, Muramatsu H, Okuno Y, Higasa K, Shimada M, Takeshima H, Hanada K, Hirano T, *et al.* Digenic mutations in *ALDH2* and *ADH5* impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. **Sci Adv**, 6:eabd7197,2020.

Pilonetto D V, Pereira N F, Bonfim C MS, Ribeiro L L, Bitencourt MA, Kerkhoven L, *et al.* A strategy for molecular diagnostics of Fanconi anemia in Brazilian patients. **Mol. Genet. Genomic Med**, 5: 360–372,2017.

Pinto AN, Coutinho MB, Costa E, Fernandes R, Soares T, Almeida and Sousa C. Otologic and audiological findings in children with Fanconi anemia. **Acta Otorrinolaringol Gallega**, 9:89-97,2016.

Pollard JA, Furutani E, Liu S, Esrick E, Cohen LE, Bledsoe J, Liu CW, Lu W, Haro MJR, Surrallés J, *et al.* Metformin for treatment of cytopenias in children and young adults with Fanconi anemia. **Blood Advances**, 6:3803-3811,2022.

Ponte F, Sousa R, Fernandes A, Gonçalves C, Barbot J, Carvalho F, Porto B. Improvement of genetic stability in lymphocytes from Fanconi anemia patients through the combined effect of α -lipoic acid and N-acetylcysteine. **Orphanet J. Rare Dis**, 7:28,2012.

Poole SR, Smith AC, Hays T, McGavran L, Auerbach AD. Monozygotic twin girls with congenital malformations resembling fanconi anemia. **Am J Med Genet**, 42:780-4,1992.

Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R, Nibourel O, Pondarre C, Pages MP, *et*

al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. **Blood**, 117:e161-e170, 2011.

Rão VB, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K. Differentiation of Nijmegen breakage syndrome from Fanconi anemia. **Genet. Mol. Res**, 6: 622-626, 2007.

Ravera S, Dufour C, Degan P, Cappelli E. Fanconi anemia: from DNA repair to metabolism. **Eur J Hum Genet**, 26: 475–476, 2018.

Rennie ML, Lemonidis K, Arkinson C, Chaugule VK, Clarke M, Streetley J, Spagnolo L & Walden H. Differential functions of FANCI and FANCD2 ubiquitination stabilize ID2 complex on DNA. **EMBO Rep**, 21:e50133, 2020.

Repczynska A, Julga K, Skalska-Sadowska J, Kacprzak MM, Kubiak AB, Lazarczyk E, Loska D, Drozniewska M, Czerska K, Wachowiak J. Next-generation sequencing reveals novel variants and large deletion in *FANCA* gene in Polish family with Fanconi anemia. **Orphanet J Rare Dis**, 17:282, 2022.

Richardson CD, Kazane KR, Feng SJ, Zelin E, Bray NL, Schäfer AJ, *et al.* CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. **Nat Genet**, 50:1132-9, 2018.

Rose SR, Myers KC, Rutter MM, Mueller R, Khoury JC, Mehta PA, *et al.* Endocrine phenotype of children and adults with Fanconi anemia. **Pediatr Blood Cancer**, 59:690-6, 2012.

Ruppitsch W, Meisslitzer C, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane. **FEBS Lett**, 422:99-102, 1998.

Santos PAD. Síndromes de falência medular congênitas: da fisiopatologia à clínica. Coimbra. Dissertação [Mestrado em Hematologia] - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2017.

Schroeder TM, German J. Bloom's syndrome and Fanconi's anemia: demonstration of two distinctive patterns of chromosome disruption and rearrangement. **Humangenetic**, 25:299-306, 1974.

Schroeder TM, Anschütz F, Knopp A. Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. **Humangenetic** 1:194-196, 1964.

Shahid M, Azfaralariiff A, Zubair A, Abdulkareem AN, Khalili N, Law D, Firasat S, Fazry S. In silico study of missense variants of *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* genes reveals high risk deleterious alleles predisposing to Fanconi anemia pathogenesis. **Gene**, 812:146104, 2022.

Shen Y, Lee YH, Panneerselvam J, Zhang J, Loo LW, Fei P. Mutated Fanconi anemia pathway in non-Fanconi anemia cancers. **Oncotarget**, 6:20396-

403,2015.

Shimamura A, Oca RM, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, D'Andrea AD. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. **Blood**, 100: 4649-4654,2002.

Shimamura, A. Clinical approach to marrow failure. **Hematology**, 2009:329–337,2009.

Siddiqui F, Ansari S, Agha A, Nusrat N, Munzir S, Shan S, Hanifa A, Farzana T Sr, Taj M, Borhany M, Hussain Z, Nadeem M, Shamsi T. Chromosomal Breakage in Fanconi Anemia and Consanguineous Marriages: A Social Dilemma for Developing Countries. **Cureus**, 14:e10440,2020.

Stepensky P, Chacón-Flores M, Kim KH, Abuzaitoun O, Bautista-Santos A, Simanovsky N, *et al.* Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome. **J. Med. Genet**, 54:558– 566,2017.

Sugita K, Taki T, Hayashi Y, Shimaoka H, Kumazaki H, Inoue H.; Konno Y, Taniwaki M, Kurosawa H, Eguchi M. MLL-CBP fusion transcript in a therapy-related acute myeloid leukemia with the t(11;16)(q23;p13) which developed in acute lymphoblastic leukemia patient with Fanconi anemia. **Genes Chromosom Cancer**, 27:264-9,2000.

Sumpter R Jr, Sirasanagandla S, Fernández ÁF, Wei Y, Dong X, *et al.* Fanconi Anemia Proteins Function in Mitophagy and Immunity. **Cell**, 1654:867-81,2016.

Susan R. Rose, Mi-Ok Kim, Leslie Korbee, Kimberly A. Wilson, M. Douglas Ris, Ori Eyal, Rosa Sherafat-Kazemzadeh, Sureka Bollepalli, Richard Harris, Michael R. Jeng, *et al.* Oxandrolone for the treatment of bone marrow failure in Fanconi anemia. **Pediatr Blood Cancer**, 61:11–19,2014.

Suzuki S, Racine RR, Manalo NA, *et al.* Impairment of fetal hematopoietic stem cell function in the absence of Fancd2. **Exp Hematol**, 48: 79–86,2017.

TAKAYO U; Yoshiyuk T; Hajime H. Genetic Study of Fanconi Anemia in Infancy Revealed *FANCI* Mutations and Defective *ALDH2* Variant: A Case Report. **J. Pediatr. Hematol. Oncol**, 44:e438-e441,2022.

Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. **Blood**, 107:4223-33,2006.

Teresa BG, Rodríguez A, Frías S. Estudio multidisciplinario del paciente con anemia de Fanconi. **Acta Pediatr Mex**, 37:54-9,2016.

Uppuluri R, Vellaichamy V, Ramanan SM, Meena S, Varla H, Ramakrishnan B, Jayakumar Revathi I. Haploidentical Stem Cell Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide in Fanconi Anemia: Improving Outcomes with

Improved Supportive Care in India. **Biol Blood Marrow Transplant**, 26:2292-2298,2020.

Van de Vrugt HJ, Harmsen T, Riepsaame J, Alexantya G, van Mil SE, Franco L, *et al*. Effective CRISPR/Cas9-mediated correction of a Fanconi anemia defect by error-prone end joining or templated repair. **Sci Rep**,9:768,2019.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. **JAMA**, 285:3130-3,2001.

Wang S, Wang R, Peralta C, Yaseen A, Pavletich NP. Structure of the FA core ubiquitin ligase closing the ID clamp on DNA. **Nat Struct Mol Biol**,28:300-309,2021.

Wang Y, Zhou W, Alter BP, Wang T, Spellman SR, Haagenson M, Gadalla SM, *et al*. Chromosomal Aberrations and Survival after Unrelated Donor Hematopoietic Stem Cell Transplant in Patients with Fanconi Anemia. **Biol Blood Marrow Transplant**, 24: 2003–2008,2018.

Williams RS, Williams JS, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. **Biochem Cell Biol**,85:509–520,2007.

Wu ZH. Phenotypes and genotypes of the chromosomal instability syndromes. **Transl Pediatr**, 5:79-83,2016.

Young NS, Alter BP. Aplastic anemia acquired and inherited. **WB Saunders Company**,1:275-324,1994.

Zakrzewskis S, Sperling K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. **Hum. Genet**, 56:81-4,1980.

Zhang QS, Tang W, Deater M, Phan N, Marcogliese AN, Muhsen HL, Dhalimy AL, Major A. Metformin improves defective hematopoiesis and delays tumor formation in Fanconi anemia mice. **Blood**, 128: 2774-2784,2016.

Zen PRG, Moraes FN, Rosa RFB, Graziadio C, Paskulin GA. Clinical characteristics of patients with Fanconi anemia. **Rev Paul Pediatr**, 29:392-9,2011.

Zhen W, Evans MK, Haggerty CM, Bohr VA. Deficient gene specific repair of cisplatin-induced lesions in Xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia cell lines. **Carcinogenesis**, 14:919-24,1993.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER SUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DA ANEMIA DE FANCONI EM PERNAMBUCO: ASPECTOS CLÍNICOS E BIOMOLECULARES

Pesquisador: Terezinha de Jesus Marques Salles

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 73905817.1.1001.5192

Instituição Proponente: Complexo Hospital HUOC/PROCAPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 25 de Março de 2019

Assinado por:
Magaly Bushatsky
(Coordenador(a))

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO
PACIENTE/PORTADOR DE ANEMIA DE FANCONI****ESCLARECIMENTOS AO PARTICIPANTE DA
PESQUISA**

Venho por meio deste convidá-lo a participar do projeto de pesquisa “Caracterização da Anemia de Fanconi: Aspectos clínicos e biomoleculares”. Este estudo pretende descrever o perfil clínico laboratorial dos pacientes com anemia de Fanconi no Estado de Pernambuco e fixar a técnica de mitomicina C. Este teste laboratorial avalia a fragilidade cromossômica necessária ao diagnóstico destes pacientes.

A assinatura deste termo de consentimento permitirá a participação do seu filho(a) nesta pesquisa, através de:

- a. Acesso ao prontuário médico para retirar dados clínicos e laboratoriais;
- b. Amostra sangue periférico que serão colhidos durante procedimento rotineiro de diagnóstico.

Para que o Sr(a) possa autorizar a participação do seu filho(a) neste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO:

O estudo será feito através do sangue periférico, as amostras serão obtidas por flebotomia. Será utilizada a mesma amostra coletada para o diagnóstico e acompanhamento clínico dos pacientes. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico.

As amostras de sangue periférico que restarem serão armazenadas em Biorrepositório até a vigência do projeto. Após este período o material será descartado conforme normas estabelecidas pela Resolução 441/11 CNS/MS.

RISCOS

O risco existente neste trabalho será o mesmo existente que são inerentes ao procedimento de coleta de material biológico (sangue periférico) do paciente, não serão realizados nenhum procedimento além daquele usado na rotina para o estabelecimento do diagnóstico da doença do seu filho. A obtenção dessas amostras por flebotomia será realizada durante os procedimentos de rotina, independente da realização do estudo. Complicações muito raramente poderão surgir durante este procedimento da coleta de sangue periférico, que são: hematoma no local da punção, e infecção local. Sendo do médico da instituição, a responsabilidade de tratar até resolução do problema médico.

BENEFÍCIOS

O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com base nos resultados deste estudo, outras pessoas portadoras de Anemia de Fanconi possam ser diagnosticadas com maior rapidez e terem mais tempo para realização do tratamento.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará do seu filho, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - HUOC e pela 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 Sr. (a) ou seu filho(a) não será identificado em nenhuma publicação.

CUSTOS

A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhuma forma de pagamento, caso dê sua autorização. O Sr. (a) ou seu filho(a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a participação. Todos os cuidados assim como os tratamentos ministrados a seu filho(a) serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no estudo.

Não existirão custos para a realização da pesquisa.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que o Sr.(a) saiba que a participação neste estudo é completamente voluntária e que pode recusar a participar ou interromper participação do seu 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.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com os responsáveis pelo estudo: Dra Terezinha de Jesus Marques Salles telefone: (081) 94517243; Prof^a MSc. Maria Teresa Marquim Nogueira Cornélio (081) 88364669, e Maria Luiza Rocha da Rosa Borges (081)99009696; ou pelo telefone do Laboratório de Citogenética do CEONHPE/Hospital Universitário Oswaldo Cruz (081-21011536 - Ramal 113). Se o Sr(a) tiver perguntas com relação aos direitos do seu filho(a) como participante desta pesquisa, também pode procurar o Comitê de Ética e pesquisa em seres Humanos (CEP)-Complexo hospitalar HUOC/PROCAPE, localizado no pavilhão Ovídio Montenegro- 1º andar- Rua Arnóbio Marques,310- Santo Amaro - 50100- 130-Recife-PE.

_____ / ____ / ____ (Assinatura do

_____ (Nome do Paciente – letra

pelo Paciente) (Assinatura do responsável

ano dia mês

(Nome do responsável pelo Paciente – letra de forma)

_____/_____/____ (Assinatura de Teste)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ / ____ / ____ (Assinatura)

ANEXO C - CARTA DE ACEITE REVISTA ABCS HEALTH SCIENCES



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o manuscrito intitulado "**Síndrome Hemofagocítica em paciente com anemia de Fanconi e associação VACTERL**" autoria de Maria Luiza Rocha da Rosa Borges, Victor Coentro Torreiro de Moraes, João Lucas Cruz Souza, Edinalva Pereira Leite, Neide Santos, Terezinha de Jesus Marques-Salles, foi aceito para publicação no periódico *ABCS Health Sciences* (ISSN 2318-4965).

Santo André, 01/07/2021

Ricardo Souto

Editor Científico
ABCS Health Sciences
Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde

ANEXO D - Carta de aceite da revista HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY

View Letter

Close

Date: Nov 16, 2022
To: "terezinha de Jesus marques-salles" terezinha.salles20@gmail.com
cc: ferreira@unicamp.br
From: "BJHH" secretaria@rbhh.org
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: HTCT-D-22-00032R1
 Title: CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF CYTOGENETIC TEST OF MMC IN PERNAMBUCO, STATE, BRAZIL
 Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Dear Dr., marques-salles,

I am pleased to inform you that your paper "CLINICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF FANCONI ANEMIA DIAGNOSED AFTER IMPLEMENTATION OF CYTOGENETIC TEST OF MMC IN PERNAMBUCO, STATE, BRAZIL" has been accepted for publication in Hematology, Transfusion and Cell Therapy.

Below are comments from the editor and reviewers.

We appreciate and value your contribution to Hematology, Transfusion and Cell Therapy. We regularly invite authors of recently published manuscript to participate in the peer review process. If you were not already part of the journal's reviewer pool, you have now been added to it. We look forward to your continued participation in our journal, and we hope you will consider us again for future submissions.

Yours sincerely,

Fernando F. Costa, PhD, MD
 Editor-in-Chief
 Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Comments from the editors and reviewers:

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/htct/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Rosa Borges, Maria Luiza da
Anemia de Fanconi em Pernambuco: caracterização clínica e genética / Maria Luiza da Rosa Borges – 2022.

110 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Coorientadora: Terezinha de Jesus Marques Salles

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2022.
Inclui referências e anexos.

1. Anemia 2. Mitomicina C 3. Citogenética I. Santos, Neide (orient.)
II. Salles, Terezinha de Jesus Marques (coorient.) III. Título

616.152

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -022

