

Anemia de Fanconi: Métodos diagnósticos e a aplicabilidade da genética laboratorial

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.010-019>

Dary Medeiros Dantas

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-2923-8250>

E-mail: dary.dantas@gmail.com

Hannaly Wana Bezerra Pereira

Universidade Potiguar, Brasil

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9245-0305>

E-mail: hannaly.pereira@unp.br

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença hereditária autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X que se manifesta nos primeiros anos de vida, sendo responsável por anomalias congênitas e falência medular progressiva tendo como principal característica a anemia aplástica (AA). Este artigo de revisão teve como objetivo identificar as metodologias diagnósticas utilizadas na detecção da AF envolvendo a aplicabilidade genética, clínica e laboratoriais. Para esse estudo foram consultadas as bases de dados científicas eletrônicas como, o Portal States National Library of Medicine National Institutes of Health (Medline/PubMed), Web Of Science, e Scientific Electronic Library Online (SciELO). Foram encontrados um total de 1563 artigos científicos nos idiomas inglês, espanhol e português, em que 6 deles foram incluídos para análise. Evidenciou-se a existência de dois testes de fragilidade cromossômica, um método em biologia molecular e um método de sequenciamento de DNA, e que o grau de especificidade encontrado nos métodos Western blot e mitomicina C (MMC) complementam o diagnóstico da AF. O diepoxibutano (DEB) se diferencia em relação ao Western blot e o MMC por ser mais específico em quebras cromossômicas, sendo o sequenciamento de nova geração (NGS) o mais específico e mais informativo por conduzir a uma abordagem personalizada devido a facilidade de acesso as variações somáticas em tumores e alterações na expressão gênica. Diante disso, conclui-se que esses métodos proporcionam maior especificidade diagnóstica ao identificarem a associação gênica da AF e o mosaïcismo somático, entendendo os níveis de gravidade trazendo maior agilidade na tomada de medidas terapêuticas.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi, Anemia aplástica, Variação genética, Mosaïcismo, Pesquisa.

1 INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença hereditária autossômica recessiva que aparece nos primeiros anos de vida provocando anormalidades hematológicas, capaz de desencadear a anemia aplástica (AA) podendo levar a falência medular progressiva além de anomalias congênitas as quais levam a má formação ou até mesmo a ausência de ossos no indivíduo (Shimamura & Alter, 2010; Crossan & Patel, 2012). A AF é descrita como uma enfermidade rara com característica heterogênea, e que pode ser encontrada em vários grupos étnicos com predominância de 1 em cada 360 mil nascidos. A causa de seu aparecimento encontra-se em diversos genes responsáveis por desencadear-la tendo relação com a herança ligada ao cromossomo X, que controla os mecanismos de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Zen, Moraes, Rosa, Graziadio, & Paskulin, 2011).

A AF é conhecida pela sua especificidade em levar o sistema hematológico ao colapso, devido a falência medular generalizada e progressiva com alto risco de câncer, além de ser uma doença invariavelmente fatal com início das manifestações clínicas nos primeiros anos de vida, resultando em uma expectativa de vida entre 16-25 anos de idade ou, dependendo do nível de gravidade, essa expectativa pode variar entre 0-50 anos com uma média de 23 anos de vida (Nowzari, Jorgensen, Ta, Contreras, & Slots, 2001; Joenje & Patel, 2001). A diminuição do tempo de vida encontra-se associada a um fenótipo altamente variável, o que dificulta o diagnóstico da doença, principalmente quanto aos aspectos clínicos (Auerbach, 2009).

A falência medular pode variar em um quadro de citopenia assintomática até aplasia medular grave no qual está associado a complicações no sistema hematológico decorrente do déficit na produção de células sanguíneas (Alter, 2003). O risco aumentado de neoplasias além de alterações hematológicas que aparecem ao longo da vida leva a sucessivas complicações como, plaquetopenia com alterações granulocíticas, anisocitose, macrocitose, trombocitopenia, neutropenia, poiquilocitose, hemoglobina fetal elevada, alfa proteína elevada e manifestações clínicas que variam devido a hematopoiese anormal (Alter, 2003; Kutler et al., 2003). Além disso, estão associados o aparecimento de manchas na pele do tipo hiper ou hipocrômicas, hipoplasia em ossos dos membros superiores como o rádio e polegares, alteração nas gônadas masculinas, anormalidades no sistema endócrino com prevalência de hipotireoidismo, alteração no metabolismo, dislipidemia e síndrome metabólica (Auerbach, 2009).

Entre os pacientes, é comum que alguns apresentem um fenótipo reservado, com progresso normal do sistema esquelético, alterações hematológicas inicialmente sem sinais aparentes e sobrevida pouco mais elevada que pode chegar até mais de 30 anos de idade. Outros em virtude de desenvolverem manifestações fenotípicas mais expressivas irão apresentar, anormalidades mais severas, com aparecimento precoce de disfunções da medula óssea com fortes chances de

desencadear o câncer, que levam na maioria dos casos a óbito ainda na primeira década de vida (Crossan & Patel, 2012; Kee & D'andrea, 2012; Garaycoechea & Patel, 2014).

As manifestações clínicas da AF se agrupam em quatro grandes grupos: anomalias físicas existentes no nascimento; endocrinopatias e atraso no crescimento; surgimento de tumores sólidos e anomalias hematológicas (Sagaseta de Ilurdoz, Molina, Lezáun, Valiente, & Durán, 2003). Dentre outras anormalidades encontradas logo no início de suas vidas destaca-se a pigmentação na pele, com manchas de coloração café com leite e baixa estatura encontradas em mais de 50% dos casos (Alter, 2002). Essas manchas são resultantes da deposição de melanina (De Kerviler, Guermazi, Zagdanski, Gluckman, & Frija, 2000). Em 10 a 40% dos casos pode-se, também, encontrar a ausência de primeiro metacarpo, quirodáctilos e ulna hipoplásicos, luxação congênita do quadril, rins ausente ou em formato ferradura revelados em exames de imagem, má formação no aparelho reprodutor feminino, hipoplasia ou ausência de ovário, útero bicornuado, alterações no aparelho digestório com dobras imperfeitas, obstrução no intestino e estreitamento esofágico, no duodeno e anus que dificultam o processo digestório além de fistula traqueo-esofágica, hipoplasia labial, microcefalia, produção insuficiente de hormônio (GH) responsável pelo crescimento, defeitos visuais, anormalidades estruturais cardíacas, problemas de audição, atraso no desenvolvimento, baixo peso ao nascer, alteração no metabolismo de insulina e glicose, além de uma série de eventos que podem desencadear outras patologias decorrentes do tipo de herança genética (Alter, 2002; De Kerviler, Guermazi, Zagdanski, Gluckman, & Frija, 2000; Sagaseta de Ilurdoz, Molina, Lezáun, Valiente, & Durán, 2003; Auerbach, 2009; Shimamura & Alter, 2010).

A causa mais comum, que leva ao surgimento da AF, está diretamente associada com as mutações gênicas que ocorrem por meio do reparo do DNA e pela estabilidade genômica (Nowzari, Jorgensen, Ta, Contreras, & Slots, 2001). Constam, atualmente, na caracterização genética da doença a identificação de ao menos 19 genes que são grupos que possuem diversas mutações diferentes cada, em alguns países, como o Brasil, a frequência em determinados grupos étnicos variam em virtude de apresentarem maior ocorrência (Gille et al., 2012). Associado a caracterização genética encontra-se a pancitopenia na qual pode surgir, de maneira menos grave, por meio do mosaico somático. Essa condição é caracterizada por células somáticas geneticamente diferentes, ou seja, normais e alteradas, provavelmente desencadeado pelo aparecimento de novas mutações ou por reversões espontâneas advindas de grupos de complementações, conforme estabelecido na tabela 1 (Gregory et al., 2001).

Tabela 1 - Grupos de complementação (subtipos genéticos) da Anemia de Fanconi.

<i>SUBTIPOS</i>	<i>GENES</i>	<i>FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS</i>	<i>LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA</i>
<i>FA-A</i>	FANCA	Constitui o complexo principal da AF e realiza ubiquitinação do complexo FA-ID	16q24.3
<i>FA-B</i>	FANCB (FAAP95)	Constitui o complexo principal da AF e realiza ubiquitinação do complexo FA-ID	Xp22.31
<i>FA-C</i>	FANCC	Constitui o complexo principal da AF e atua nas funções citoplasmáticas com ubiquitinação do complexo FA-ID	9q22.3
<i>FA-D1</i>	FANCD1 (BRCA2)	Duplica a BRC – recrutamento da RAD51 além de atuar como mediador da HR, ativado pelo complexo FA-ID	13q12-13 13q13.1
<i>FA-D2</i>	FANCD2	FANCD2 monoubiquitinada – associação a BRCA2, BRCA1 e complexo MRE11 a ubiquitinação ocorre após o dano no DNA	3p25.3
<i>FA-E</i>	FANCE	Formação do complexo principal da AF recrutamento da FANCD2 ligação direta a FANCD2 ubiquitinado	6p21-22
<i>FA-F</i>	FANCF	Formação do complexo principal Homologia com ROM - ligação a ácidos nucleicos Ubiquitinação do complexo FA-ID	11p15
<i>FA-G</i>	FANCG (XRCC9)	Formação do complexo principal da AF Remoção do complexo AF após a replicação Ubiquitinação do complexo FA-ID	9p13
<i>FA-I</i>	FANCI (KIAA1794)	FANCI monoubiquitinada – associada a FANCD2, forma Complexo a jusante na via AF/BRCA Ubiquitinado após dano no DNA	15q26.1
<i>FA-J</i>	FANCI (BRIP1/BACH1)	Helicase – desespiraliza o DNA no Sentido 5'→3' Associação à BRCA1 Helicase, ativado pelo complexo FA-ID	17q23.2
<i>FA-L</i>	FANCL (PHF9)	Repetições WD40 – estabilização do complexo AF PHD – ubiquitina ligase Associada a E3 ligase na ubiquitinação do complexo FA-ID	2p16.1
<i>FA-M</i>	FANCM (Hef/FAAP250)	Formação do complexo principal AF Helicase, DNA translocase Helicase, localiza o complexo principal ao DNA	14q21.3
<i>FA-N</i>	FANCN (PALB2)	Associação/estabilização da BRCA2 Ativado pelo complexo FA-ID	16p12
<i>FA-O</i>	RAD51c	Ativado pelo complexo FA-ID	17q23
<i>FA-P</i>	SLX4, MUS312	Ativado pelo complexo FA-ID	16p13.3
<i>FA-Q</i>	XPF, ERCC4	Ativado não elucidada, apenas que interage com FANCP	16p13.12
<i>FA-R</i>	RAD51	Responsável por proteger a nova fita de DNA	15q15.1
<i>FA-S</i>	BRCAl, BRCC1	Proteína de suscetibilidade ao câncer	17q21.31
<i>FA-T</i>	UBE2T, E2	Associada a E2 ubiquitinase, envolvida na ubiquitinação do complexo FA-ID	1q32.1

Fonte: Adaptado de Gurtan & D'Andrea (2006); Taniguchi & D'Andrea (2006).

O mosaicismos é um fenômeno genético da AF que resulta na reversão de mutações danosas hereditárias, envolvidas em duas populações celulares quando se descobre que existe uma dentro dos padrões de normalidade e outra fora dela, em um mesmo indivíduo (Hirschhorn, 2003). Existem vários tipos de mosaicismos, na AF a mais comum está na presença de mutação em que o alelo apresenta com destaque para o funcionamento normal em uma faixa que varia de 15 a 25% dos pacientes acometidos pela síndrome e que demonstram algum tipo de mosaicismos espontâneo (Hirschhorn, 2003; Gregory et al., 2001).

O mosaicismos se caracteriza por meio do teste de quebras cromossômicas, nesse teste é verificado a presença de duas subpopulações de linfócitos, a confirmação é feita quando em uma

delas ocorre a sensibilidade aos agentes indutores de ligações cruzadas do DNA, a outra apresentará uma condição de normalidade que satisfaça mais de 50% das células analisadas (Gregory et al., 2001). Com o progresso das anormalidades encontradas no sistema hematopoiético, o indivíduo apresentará um quadro de AA responsável pela falência medular associado ao aumento da predisposição maligna no qual reduz o tempo de vida principalmente quando as manifestações clínicas se iniciam nos primeiros anos de vida fazendo essa expectativa ficar em torno de 16 a 25 anos de idade. Cada um dos grupos de genes envolvidos realiza diversas mutações diferentes o que permite controlar os mecanismos de reparo de DNA (Nowzari, Jorgensen, Ta, Contreras, & Slots, 2001; Porto et al., 2011).

As complicações clínicas de maior impacto desencadeadas pela AF, ocorrem no sistema hematológico e atinge maciçamente os pacientes no decorrer de suas lutas contra a doença, acredita-se que ao menos 90% deles desenvolvem insuficiência medular progressiva que podem chegar a um quadro de AA muito severa em que, a medula óssea deixa de produzir quantidades de células sanguíneas, decorrente de um agravo congênito da AF levando a diminuição dos eritrócitos, granulócitos e células megacariocíticas encontrados na medula óssea. Geralmente, em exames laboratoriais realizados no nascimento, encontram-se contagens normais em sangue periférico, e com o passar do tempo tendem a ficar alterados e se agravar podendo chegar a um quadro de pancitopenia em torno dos sete anos de vida devido a progressividade da doença (Tulpule et al., 2010).

Existem ainda, um percentual elevado de pacientes com potencial para desenvolver leucemia mielóide aguda (LMA) e síndrome mielodisplásica (SMD) que aparecem na metade do tempo de vida, ou seja, entre 10 a 15 anos de idade que são decorrentes de complicações em virtude da evolução do quadro clínico do paciente. A SMD, é uma doença hematopoética clonal que induz a citopenias, desequilíbrio na diferenciação da célula hematopoética e risco elevado de evoluir para LMA (Hasle, 2016). A LMA, é uma neoplasia típica da AF que se caracteriza por ter um progresso 800 vezes maior de risco quando comparado a população em geral. Essa enfermidade que ocorre na medula óssea, é definida pelo crescimento desordenado do número de leucócitos imaturos e baixa produção na quantidade de plaquetas (Alter, 2003; Rosenberg, Huang, & Alter, 2004). Normalmente, a falência medular progressiva ocorre quando se percebe a redução dos valores hematimétricos no sangue periférico que envolvem a trombocitopenia, leucopenia e anemia. A gravidade tem início com excessivas quebras cromossômicas responsáveis por realizar danos no reparo do DNA, apoptoses e mutações que beneficia seletivamente o crescimento de células progenitoras (Mathew, 2006). No tocante a AA, LMA e SMD desenvolvidas em pacientes nos primeiros anos de vida é importante investigar uma provável ocorrência da AF, ainda que, não aparente manifestações clínicas decorrentes da doença (Alter, 2003).

Com o avanço ocorrido nos últimos anos em tecnologias que envolvem o campo da saúde, principalmente às técnicas diagnósticas e tratamento de anormalidades encontradas no sistema hematológico associados a fatores hereditários, faz com que novos métodos que tratam sobre o diagnóstico de doenças raras venha sendo amplamente debatidos além de já haver metodologias capazes de substituir ou complementar as já existentes em virtude da necessidade de evitar dificuldades, retrabalhos e confusão diagnóstica, e que várias delas já são utilizadas em diversas partes do mundo principalmente no que envolve suas descobertas. Assim, o objetivo desse artigo é analisar, por meio de uma revisão integrativa, as metodologias diagnósticas utilizados na detecção da anemia de fanconi envolvendo a aplicabilidade genética, clínica e laboratoriais.

2 METODOLOGIA

O desenvolvimento dessa revisão integrativa se deu por meio de pesquisa bibliográfica qualitativa na qual consiste em um tipo de pesquisa capaz de responder a pergunta do estudo de forma ampla, e que contemple técnicas qualitativas estruturadas que abrangem estudos relacionados com o tema da pesquisa (Prodanov, 2013). Isso inclui, a interpretação de eventos definidos em outros estudos, principalmente os de origens investigativos que atribuem significados importantes no processo de detalhamento dos resultados como sendo, também, uma característica principal de um estudo qualitativo (Pereira, Shitsuka, Parreira, & Shitsuka, 2018). Com isso, a fim de pesquisar e interpretar os resultados obtidos por estudos relacionados com o tema, assim como o objetivo desta revisão, realizou-se a busca e seleção de artigos científicos publicados em bases de dados científicas eletrônicas como, Portal *States National Library of Medicine National Institutes of Health (Medline/PubMed)*, *Web Of Science*, e *Scientific Electronic Library Online (SciELO)*.

Por se tratar de um tema que busca avaliar as principais metodologias diagnósticas da AF de caracterização genética, considerou-se elegíveis estudos publicados no período de 2000 a 2019, visto que há uma escassez de trabalhos realizados com a temática escolhida. Para a seleção desses estudos envolvendo a evolução dos métodos diagnósticos da AF, bem como das aplasias medulares, utilizou-se os seguintes Descritores em Ciências da Saúde (DeCS/MeSH) em português, inglês e espanhol: aplasia eritrocitária, anemia de fanconi, leucemia mielóide aguda, síndrome mielodisplásica, diagnóstico, diversidade genética, mosaicism, células-tronco hematopoiéticas, diagnóstico da anemia de fanconi e medula óssea/*erythrocyte aplasia, fanconi anemia, acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, diagnosis, genetic diversity, mosaicism, hematopoietic stem cells, diagnostic of fanconi anemia and bone marrow*/aplasia de eritrocitos, anemia de fanconi, leucemia mielóide aguda, síndrome mielodisplásica, diagnóstico, diversidad genética, mosaicism, células madre hematopoyéticas, diagnóstico de anemia de fanconi y médula ósea. Como critérios de exclusão, não foram analisados teses, capítulos de teses, livros, capítulos de livros, anais de

congressos ou conferências, relatórios técnicos e científicos, além de outros delineamentos de estudos e literatura cinzenta.

Quadro 1 - Estratégia de buscas e resultados nas bases de dados.

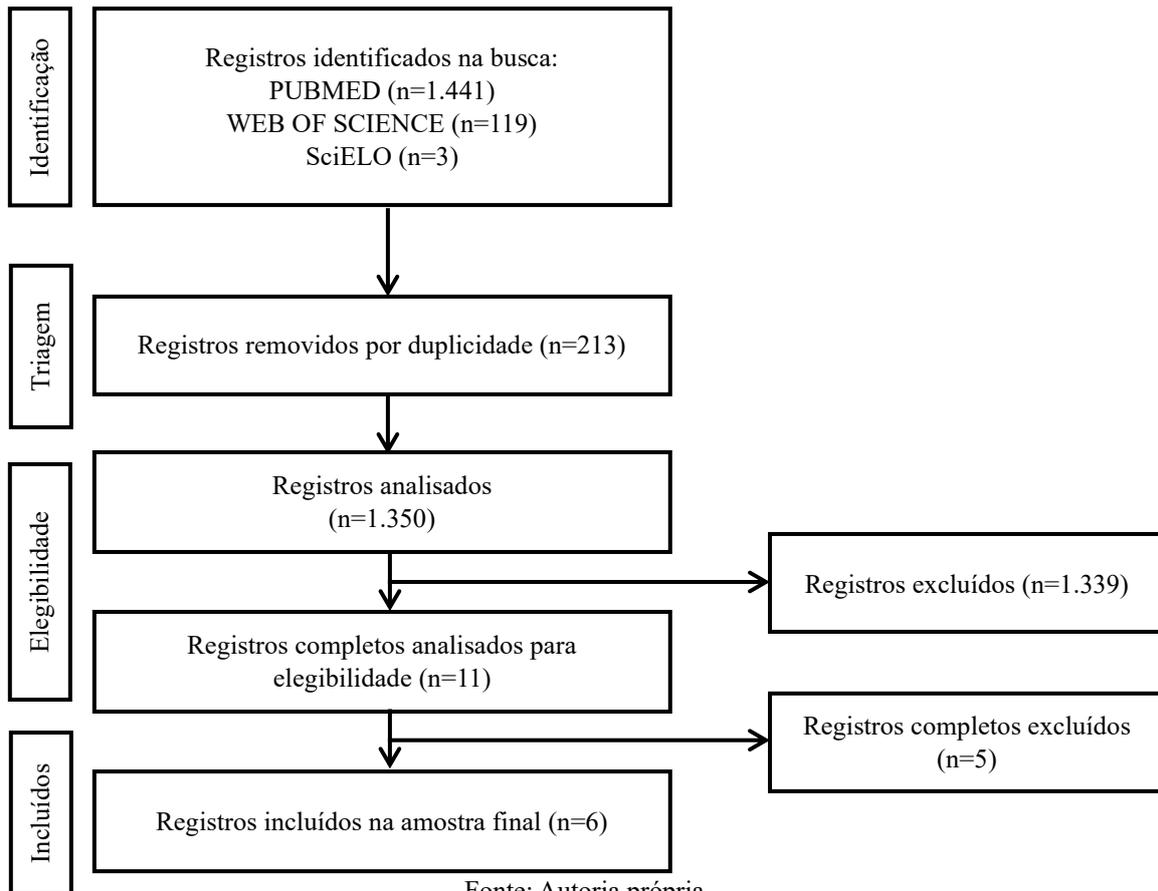
Data da busca	Estratégia de busca		Resultados
PubMed			
11/06/2020	#1	Fanconi anemia OR Diagnostic	127.989
	#2	((“fanconi anemia” OR “erythrocyte aplasia” OR “acute myeloid leukemia” OR “myelodysplastic syndrome” OR “diagnostic” OR “genetic diversity” OR “mosaicism” OR “hematopoietic stem cells and bone marrow”) AND (genetic OR diagnostic of fanconi anemia))	1.629
	#3	#1 AND #2 Filters: text availability (Free full text e Full text); article type (Clinical Trial); article language (English, Portugues e Spanish) e publication date (20 years).	1.441
Web Of Science			
15/06/2020	((((((((ALL=(fanconi anemia)) AND ALL=(erythrocyte aplasia)) OR ALL=(acute myeloid leukemia)) OR ALL=(myelodysplastic syndrome)) OR ALL=(diagnostic)) OR ALL=(genetic diversity)) OR ALL=(mosaicism)) OR ALL=(hematopoietic stem cells and bone marrow)) OR ALL=(genetic)) AND ALL=(diagnostic of fanconi anemia)		119
	Filtros aplicados: Anos de publicação (2000-2019); Tópicos de criação meso (todos); Perfis de pesquisadores (Todos); Tipos de documentos (<i>Article</i>); Categorias da <i>Web of Science</i> (Todos); Títulos de publicações (Todos); Editor (Todas).		
SciELO			
15/06/2020	Anemia de fanconi AND Diagnostico		3
	Filtros aplicados: All Open Access (Open Access e Gold), Year (2000-2019), Author Name (Todos), Subject Area (Todos), Document Type (<i>Article</i>), Publication stage (Final), Language (Spanish).		

Fonte: Autoria própria.

Com o fim da etapa de busca foram encontrados um total de 1.563 artigos nas respectivas bases de dados. Esses estudos passaram pela análise de dois revisores sendo, antes disso, removidos 213 estudos duplicados, restando 1.350 artigos para análise e seleção com base na leitura de títulos e resumos.

Aplicados os critérios de elegibilidade, foram excluídos 1.339 artigos por não terem relevância com a pergunta do estudo restando 11 deles para serem lidos na íntegra. Após a leitura foram incluídos 6 estudos na amostra final como demonstrado na figura 1.

Figura 1 - Identificação de estudos por meio de bancos de dados e registros.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final, com 6 estudos incluídos, foram extraídas informações relevantes e organizadas em uma tabela a fim de responder à pergunta do estudo. Os estudos selecionados são do tipo investigativo, descritivo e observacional, descritos e ordenados conforme quadro 2.

Quadro 2 – Caracterização dos estudos.

ID*	Autores	Método	Objetivo	Principais conclusões
E1	Soulier et al., 2005	Utilização da técnica de Western blot.	Analisar a via AF/BRCA em 53 pacientes com AF por imunotransferência de FANCD2 em testes de quebra cromossômica.	Evidenciou-se um padrão altamente recorrente de anormalidades somáticas relacionadas a translocações cromossômicas e mono-ubiquitinação de FANCD2 detectada em linfócitos do sangue periférico.
E2	Pilonetto et al., 2009	Utilização da técnica de Western blot no diagnóstico da AF.	Determinar a eficácia do método no diagnóstico de 84 pacientes brasileiros com AF, e com resultados positivos no teste de diepoxibutano, e 98 controles saudáveis.	Todos os 98 controles saudáveis foram FANCD2S+/FANCD2L+ e negativos no teste DEB. Os 84 pacientes DEB+ foram classificados em três classes fenotípicas. A maioria dos pacientes (77/84; 91,7%), incluindo 68 probandos e seus respectivos 9 irmãos, eram FANCD2S+/FANCD2L-.
E3	Auerbach, 2009	Estudo laboratorial da quebra cromossômica induzida pelo diepoxibutano (DEB).	Identificar casos pré-anêmicos, bem como pacientes com anemia aplástica ou leucemia que não apresentam achados físicos característicos de diagnóstico clínico.	A disponibilidade de tais testes revelou um número crescente de indivíduos afetados com AF que, por critérios clínicos, parecem ter anemia aplástica idiopática e parecem fenotipicamente normais.
E4	Oostra, Nieuwint, Joenje, & de Winter, 2012	Análise de citogenética de quebra cromossômica induzida por Mitomicina C (MMC) em culturas de sangue total.	Fornecer um protocolo laboratorial detalhado para a avaliação precisa do diagnóstico de AF.	O teste diferencia de forma confiável entre amostras de sangue AF e não AF, incluindo pacientes não AF com anemia aplástica, síndrome de quebra de Nijmegen, síndrome de Roberts, síndrome de Baller-Gerold, VACTERL e outras síndromes de trombo e eritropenia, pois essas condições não possuem frações celulares elevadas na fase G2.
E5	Aslan, Ameziane, & De Winter, 2015	Análise por sequenciamento de nova geração (NGS).	Analisar por meio de NGS um caso de AF com sinais inconclusivos em teste de quebra cromossômica negativo.	Confirmação de diagnóstico de AF por meio de NGS, sendo esse o primeiro diagnosticado molecularmente utilizando este método.
E6	Auerbach, 2015	Aplicação de teste de quebra cromossômica induzida pelo diepoxibutano (DEB).	Descrever a aplicação por meio de um protocolo a fim de descartar o diagnóstico pré-natal da AF a partir de uma amostra de sangue periférico.	O DEB é apontado como o mais indicado no diagnóstico pré-natal da AF por apresentar maior sensibilidade e especificidade que resultam em menos taxas de falso-positivos e falso-negativos.

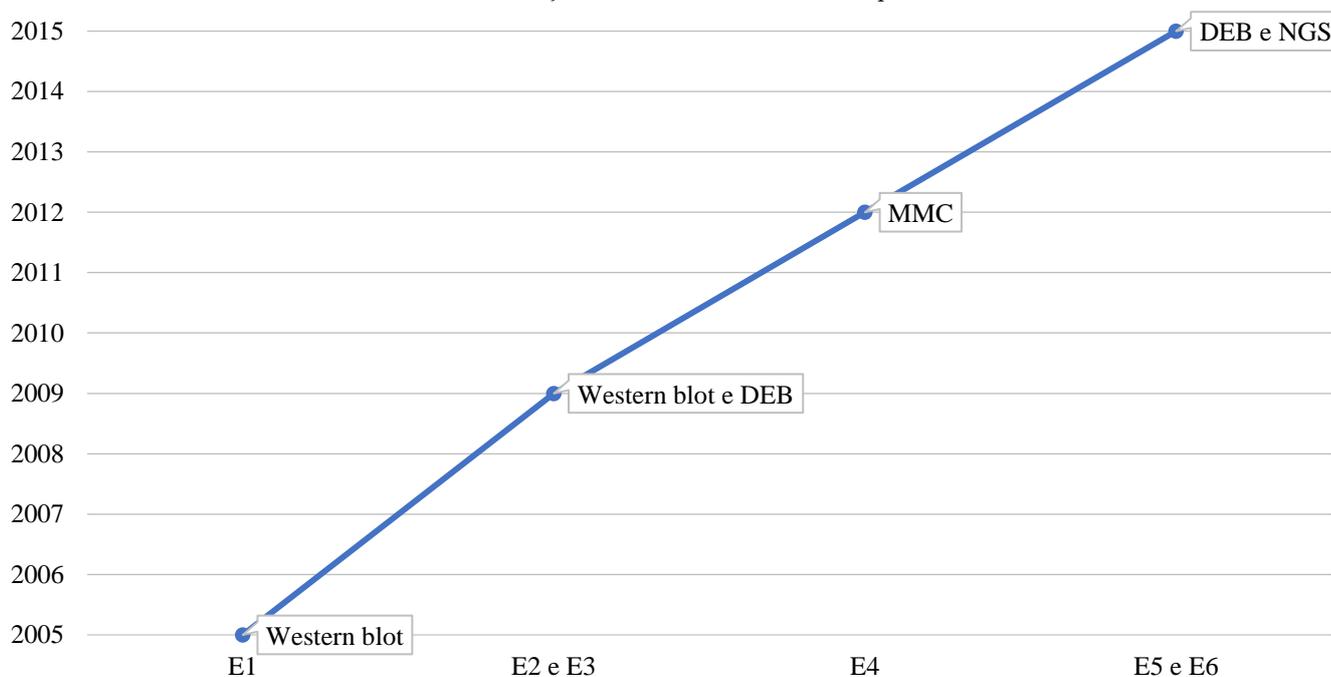
*ID = Identificação.

Fonte: Autoria própria.

Os estudos apresentados no quadro 2 são caracterizados por artigos que exploram os métodos genéticos como fator relevante no diagnóstico da AF ao representarem, por meio de análises e testes gnômicos envolvendo cromossomos, as principais descobertas dos genes bem como a especificidade

e alta sensibilidade de cada um no que envolve sua associação com os sinais e sintomas da síndrome encontrados nos estudos que servem para constatar ainda nos primeiros anos de vida o diagnóstico da AF. Com a análise dos estudos e sua caracterização, descritos no quadro 2, são representados no gráfico 1 os métodos abordados pelos estudos (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) bem como, a evolução e adoção dos mais específicos no diagnóstico da AF no decorrer do tempo.

Gráfico 1 – Caracterização dos métodos identificados por estudos



Fonte: Autoria própria.

A partir da análise do gráfico 1, é possível inferir que os estudos mencionados utilizaram quatro métodos na avaliação diagnóstica a fim de definir a tomada de decisão clínica genômica da AF como, as técnicas de Western blot, instabilidade cromossômica induzida pelo diepoxibutano (DEB), mitomicina C (MMC) e o sequenciamento de nova geração (NGS). Todas essas ferramentas são utilizadas na hipersensibilidade com quebras cromossômicas sob efeito clastogênico das células sanguíneas e no sequenciamento dos genes sendo apontadas como avanços genéticos que fortalecem a investigação gênica da síndrome além de outros fatores envolvendo instabilidade cromossômica e anemia aplástica adquirida.

Segundo Auerbach (2015), o diagnóstico da AF não pode ser apenas nas manifestações clínicas devido à considerável sobreposição do fenótipo e a variabilidade genética que fazem com que os métodos genéticos disponíveis tenham especificidades nas tomadas de decisões ao se diagnosticar a AF. Isso implica, inclusive, no descarte durante o período de investigação diagnóstica. Pois Williams et al. (2014), afirmam que atualmente o teste de sensibilidade de ligação cruzada para descartar a AF e o teste do comprimento dos telômeros para descartar outras síndromes como a

Disqueratose Congênita (DC) devem fazer parte da investigação antes do tratamento da anemia aplástica adquirida pois são considerados testes padrões que auxiliam no diagnóstico. Oostra, Nieuwint, Joenje, & de Winter (2012), alertam que, por se tratar de um distúrbio de instabilidade cromossômica propenso ao câncer, o fenótipo celular típico da AF também pode ser determinado usando culturas de sangue total (linfócitos T) estimuladas por fitohemaglutinina. Todavia, para o diagnóstico de AF, o teste não é 100% específico o que requer outras metodologias mais específicas em sua determinação.

Soulier et al. (2005), afirmam que a utilização do Western blot permiti a superexposição, de bandas quase imperceptíveis capaz de evidenciar níveis residuais da proteína FA-D2, e que é possível classificar os pacientes com AF inseridos nesse grupo de proteína. E que analisaram, também, pacientes com AF por meio de dados clínicos, testes de quebra cromossômica e imunotransferências da proteína FANCD2, constatando que a maioria deles demonstram padrões anormais da proteína FANCD2 em linfócitos do sangue periférico, confirmando o defeito específico da via AF/BRCA. Especificamente, uma única isoforma pequena de FANCD2 (FANCD2-S), mas nenhuma isoforma grande (FANCD2-L) sendo detectado fibroblastos primários que apresentaram padrões de FANCD2 normais, mas testes de quebra cromossômica positivos, sugerindo mosaicismo somático. Além disso, os padrões de imunotransferência da proteína FANCD2 permitem a determinação do nível em que a via AF/BRCA é interrompida detectando uma única isoforma de FANCD2 curta e não ubiquitinada classificando os pacientes como “núcleo AF”.

A partir das informações fornecidas por E1 e E2 e analisadas pelo gráfico 1 é possível constatar que a técnica de Western blot surge como um dos métodos mais adotados no período de 2005 a 2009 e que segundo Pilonetto et al. (2009), os resultados por esse método envolvendo a biologia molecular corroboram com os dados mundiais em que grupos de complementação de núcleo complexo apresentam grande variedade genética para a AF que incluem mutações em qualquer um dos genes que codificam o complexo central das proteínas (FANCA, B, C, E, F, G, L e M). E também podem pertencer a outros grupos de complementação a serem identificados podendo estarem associados com o complexo central da proteína FANCD2. Soulier et al. (2005), destacam que a investigação por imunotransferência da proteína FANCD2 em fibroblastos devido a especificidade do Western blot ao permitir a separação de antígenos por eletroforese facilita a monoubiquitinação dessa proteína podendo indicar situações de reversão da AF. Pois, quando a proteína FANCD2 em fibroblastos é monoubiquitinada a níveis normais, testes de quebra cromossômica em fibroblastos podem ser realizados se necessário para confirmar AF e anormalidades na via AF/BRCA2, ou deve ser investigado por imunotransferência e/ou análise molecular a fim de detectar a reversão funcional de AF além de classificar os portadores como “grupo a jusante não identificado”. Pois, isso permite a confirmação do diagnóstico, detecção de potencial e classificação de pacientes com AF facilitando a

determinação do grupo de complementação e identificação das mutações constituintes da síndrome por meio da análise molecular e a presença de mosaïcismo somático.

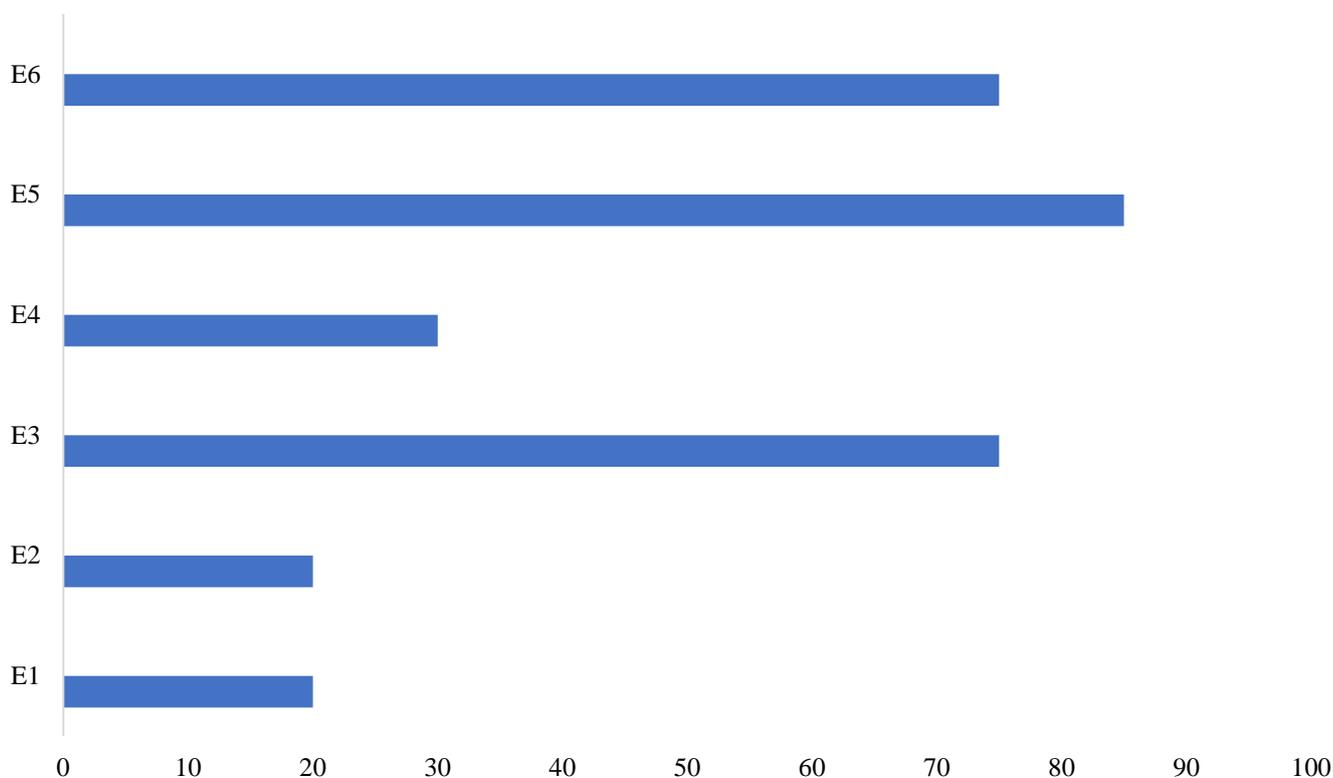
As informações descritas por E3 e E4 evidenciam a adoção do DEB e do MMC como novos métodos no período de 2009 a 2012, que segundo Auerbach (2009), a hipersensibilidade das células que compreende a AF ao efeito clastogênico (quebra de cromossomos) dos agentes de reticulação fornece um marcador celular confiável para o diagnóstico. Pois o DEB assim como o MMC são os agentes mais utilizados para o diagnóstico de AF, visto que a grande experiência com testes de MMC e DEB demonstram a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos resultados em pacientes que apresentem malformações congênitas associadas a AF, e que os testes, principalmente, realizados com DEB indicam que existe uma grande variabilidade genética quando envolve quebra cromossômica mesmo que haja pouca sobreposição em pacientes com AF no número de quebras por célula ou no número de quebras por célula aberrante podendo ser configurado mosaïcismo somático e que nos testes realizados com DEB revelarão duas populações de linfócitos do sangue periférico estimulados por fitohemaglutinina onde um demonstrou um fenótipo de AF com quebras e trocas de cromátides e o outro normal. E mesmo que, atualmente, não exista um nível geralmente aceito de células aberrantes em que um indivíduo seja considerado mosaico, cerca de 10% dos pacientes com AF têm 50% ou menos de células aberrantes.

Segundo Oostra, Nieuwint, Joenje, & de Winter (2012), apesar de o MMC ser um teste de extrema sensibilidade as células da AF devido ao efeito de quebra de cromossomos dos agentes de ligação cruzada ele pode ser omitido se um probando pertencer a uma população étnica com alta frequência de portadores para uma mutação específica do gene da AF. Assim, a demonstração desta mutação no probando seria diagnóstica de AF. Todavia, o resultado possa não fornecer informações sobre um possível mosaïcismo, o que faz com que o DEB seja rotineiramente utilizado para diagnosticar a AF.

Como visto no gráfico 1 percebe-se que desde 2009 o DEB continua sendo o mais indicado no diagnóstico da AF pois segundo Auerbach (2015), sua especificidade ao identificar o grupo de complementação do paciente, bem como as variantes patogênicas envolvidas fazem desse método a melhor opção no diagnóstico devido à extensa heterogeneidade fenotípica da AF, incluindo a heterogeneidade no grau de sensibilidade aos agentes de reticulação em alguns casos raros, e a sobreposição fenotípica com este grande número de outros genes que, com a adoção de outros métodos como o NGS abordado por E5, podem favorecer ainda mais o diagnóstico da síndrome de fanconi, principalmente no diagnóstico pós natal. Aslan, Ameziane, & De Winter, (2015), afirmam que a utilização do NGS no estudo do DNA, isolado por protocolos padrão, permite a identificação de quase todos os subtipos genéticos de AF (incluindo o subtipo FANCA) já que em algumas condições, o teste de quebra cromossômica pode ser inconclusivo e a confirmação do diagnóstico de

AF ao nível do DNA é crucial pelo NGS conforme verificado no gráfico 2, no qual aponta no E5 o NGS como sendo o mais específico se comparado com os demais.

Gráfico 2 – Especificidades dos métodos identificados nos estudos.



Fonte: Autoria própria.

Evidenciou-se a especificidade de cada método a fim de encontrar nos estudos incluídos para análise a potencialidade de cada um com base nos resultados apontados, e de acordo com o que é apresentado pelo gráfico 2 o DEB assim aparece em segundo colocado com maior predominância qualitativa nos estudos, mas diferente do que é apresentado pelos estudos E1 e E2, o DEB surge como o mais atualizado quando se analisa sua caracterização e período de utilização conforme quadro 2, principalmente, no que envolve o E1 e o E2. O DEB tem uma especificidade diferenciada em relação ao Western blot e do MMC capaz de trazer resultados em níveis mais elevados de confiança. Pois de acordo com Auerbach (2015), a hipersensibilidade ao efeito clastogênico provocada pelo DEB nos agentes de reticulação do DNA fornece um marcador único para o diagnóstico de AF, com característica celular capaz em identificar se o paciente é considerado pré-anêmico, bem como se possui indicativo de anemia aplástica e leucemias que podem resultar ou não em estigmas físicos clássicos associados à AF, o que não se vê quando utiliza-se o método de Western blot nos estudos E1 e E2 e o MMC no E4 já que ele tem a capacidade de evidenciar níveis residuais das proteínas da AF. Isso se deve, a variedade de agentes químicos utilizados para testar a sensibilidade das ligações cruzadas do DNA, sendo o teste preferido para o diagnóstico da síndrome

de fanconi por possuir a maior sensibilidade e especificidade, enquanto outros agentes apresentam taxas mais altas de resultados de testes falso-positivos e falso-negativos.

Segundo Aslan, Ameziane, & De Winter, (2015), mediante as características clínicas da AF métodos como o NGS podem substituir estudos de quebra cromossômica induzida por DEB, pois existem evidências de que na existência de teste de quebra cromossômica negativo o NGS seria o melhor método utilizado. Pois, de acordo com Bettoni et al. (2017), isso ocorre, em virtude de o NGS ser uma ferramenta informativa para orientar o tratamento do câncer e conduzir uma abordagem personalizada em oncologia devido a facilidade de acesso as variações somáticas em tumores e as alterações na expressão gênica, que tornam possível refinar o diagnóstico e prever a resposta da supressão imunológica a medicamentos, algo que não se pode prever em estudos de quebra cromossômica induzida por DEB. Além disso, o diagnóstico baseado em NGS é aperfeiçoado quando se desenvolve um ensaio simples de avaliação da integridade do DNA que pode ser usado para estimar os níveis de fragmentação e modificação do DNA extraído de amostras e estabelecer parâmetros de integridade para otimizar a preparação e demonstrar as implicações do sequenciamento de amostras tidas como de baixa qualidade, o que faz com que sua especificidade se aproxima da maior possível.

Assim, no que envolve os tipos de metodologias diagnósticas utilizadas na detecção da AF envolvendo a aplicabilidade genética, clínica e laboratoriais destaca-se o NGS e o DEB como sendo os de maior relevância no diagnóstico da AF. Outrossim, as análises dos estudos (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) permitem concluir que o avanço das ferramentas em diagnóstico genético e molecular no decorrer desse tempo permitiram a especificidade em encontrar e classificar os genes relacionados bem como grupos de complementação e subtipos genéticos diretamente associados com a síndrome de fanconi e a anemia aplástica que é um dos sintomas mais encontrados em pacientes com AF.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descrição da AF, estabelecia no passado o diagnóstico com base no histórico familiar e, posteriormente, foi caracterizado como uma forma rara de anemia aplástica a qual sempre foi considerado a causa mais comum de falência medular progressiva em pacientes portadores da síndrome. Apesar da baixa incidência da doença em diversas partes do mundo, ao longo dos anos, sempre se buscou aperfeiçoar o diagnóstico tendo como foco principal a busca pela qualidade e especificidade dos métodos utilizados para este fim. Nesse contexto, foi abordado nesse trabalho a importância das metodologias com aplicabilidade genética utilizadas no diagnóstico e acompanhamento da AF com o propósito de verificar os métodos disponíveis não só atualmente utilizados para detectar a doença mais, também, no que envolve a utilização de tecnologia de sequenciamento de DNA para melhor caracteriza-la.

Ao longo dos anos, houve uma intensa evolução tecnológica seguida de investimentos em pesquisas que propiciaram o desenvolvimento de novos métodos e técnicas com o objetivo de elevar o nível de especificidade das metodologias diagnósticas abordadas nessa revisão, capazes de entregar bons resultados e assim diminuir as chances de incertezas no diagnóstico da AF. Com isso, constatou-se quatro tipos de métodos diagnósticos como, o Western blot, DEB, MMC e o NGS, pertencentes as técnicas genéticas rotineiramente utilizados no descobrimento de genes associados a síndromes como essa. Evidenciou-se que o grau de especificidade encontrado em cada método complementa de forma satisfatória o diagnóstico da AF fazendo crescer a compreensão da doença permitindo descobrir os tipos de genes e grupos de complementação envolvidos com a sintomatologia da doença o que torna possível caracterizar com mais clareza as anormalidades funcionais de órgãos, tecidos e sistema hematopoiético sendo capaz de verificar a progressividade da falência medular que interferem substancialmente na expectativa de vida do paciente.

Identificou-se que o método diagnóstico DEB possui um diferencial extremamente importante capaz de se diferenciar em relação ao Western blot e o MMC por ser mais específico em quebras cromossômicas da AF, além de ser considerado padrão ouro na descoberta da doença. Todavia, mesmo com a especificidade que o DEB possui em diminuir ao máximo os resultados de testes falso-positivos e falso-negativos, evidenciou-se que o NGS é mais específico do que o DEB por ser capaz de realizar o sequenciamento paralelo de fragmentos de DNA sem a confirmação de existência de testes falso-positivos e falso-negativos. Assim, apesar de os testes moleculares possuírem suas especificidades este leva em conta um importante diferencial que é o de identificar genes relacionados decorrentes da instabilidade cromossômica desencadeada pela AF bem como o de se diferenciar pela facilidade de acesso as variações somáticas tornando possível refinar o diagnóstico e prever a respostas adversas ao aconselhamento genético.

Apesar das pesquisas desenvolvidas nessa revisão evidenciarem as metodologias genéticas utilizadas para este fim, a ausência de mais estudos envolvendo análises genômicas e estatísticas relacionados a AF no que envolve a descoberta de novos genes por meios de outras técnicas em biologia molecular em diversas partes do mundo limitam os resultados desse estudo pois a escassez de mais pesquisas envolvendo os genes envolvidos com a síndrome de fanconi nas últimas duas décadas tendem a ocultar informações relevantes associadas com a prevalência da AF em várias partes do mundo, principalmente com a descoberta de novas tecnologias genéticas utilizadas em outras patologias que poderiam, também, serem utilizadas no aprofundamento dos estudos envolvendo a AF.

Assim, é imprescindível que mais estudos associados a distúrbios hematológicos envolvendo a AF e a AA por meio da citogenética sejam amplamente desenvolvidos, pois trata-se do método mais precioso pela sua maior especificidade no diagnóstico da doença quando comparado a outros



métodos. Destaca-se a importância que todos os outros métodos diagnósticos citados ao longo desta revisão objetivam avaliar e acompanhar o nível de gravidade proporcionando informações clínicas por se tratar de uma doença hereditária autossômica recessiva e invariavelmente fatal. Pois, à medida que a tecnologia de sequenciamento de DNA avança, o objetivo será um sequenciamento mais rápido e preciso com taxas de erros mais baixas.

Considerando a temática em questão, principalmente no que envolve sua complexidade em descobrir novos genes, torna-se imprescindível estudos que viabilizem o descobrimento de novas metodologias diagnósticas com foco na aplicabilidade genética que visem investigar com mais especificidades os padrões de hereditariedades entre os diferentes membros da família bem como os mecanismos de ação que os tipos de genes associados a AF realizam para manifestar a doença a fim de proporcionar maior clareza ao associar os tipos de genes precursores da AF.



REFERÊNCIAS

- Alter, B. P. (2002). Bone marrow failure syndromes in children. *Pediatric Clinics of North America*, 49(5), 973-988.
- Alter, B. P. (2003). Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer*, 97(2), 425-440.
- Aslan, D., Ameziane, N., & De Winter, J. P. (2015). Molecular diagnosis of Fanconi anemia with next-generation sequencing in a case with subtle signs and a negative chromosomal breakage test. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 57(3), 282-285.
- Auerbach, A. D. (2009). Fanconi Anemia and its Diagnosis. *Mutation research*, 668(1-2), 4-10.
- Auerbach, A. D. (2015). Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis. *Current protocols in human genetics / editorial board*, Jonathan L. Haines ... [Et al.], 85, 8.7.1-8.7.17.
- Bettoni, F., Koyama, F. C., de Avelar Carpinetti, P., Galante, P. A. F., Camargo, A. A., & Asprino, P. F. (2017). A straightforward assay to evaluate DNA integrity and optimize next-generation sequencing for clinical diagnosis in oncology. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(3), 294-299.
- Crossan, G. P., & Patel, K. J. (2012). The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. *The Journal of Pathology*, 226(2), 326-337.
- De Kerviler, E., Guerhazi, A., Zagdanski, A. M., Gluckman, E., & Frija, J. (2000). The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. *Clinical Radiology*, 55(5), 340-345.
- Garaycochea, J. I., & Patel, K. J. (2014). Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia? *Blood*, 123(1), 26-34.
- Gille, J. J. P., Floor, K., Kerkhoven, L., Ameziane, N., Joenje, H., & de Winter, J. P. (2012). Diagnosis of Fanconi Anemia: Mutation Analysis by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and PCR-Based Sanger Sequencing. *Anemia*, 2012, 603253.
- Gregory, J. J., Wagner, J. E., Verlander, P. C., Levrán, O., Batish, S. D., Eide, C. R., ... Auerbach, A. D. (2001). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2532-2537.
- Gurtan, A. M., & D'Andrea, A. D. (2006). Dedicated to the core: Understanding the Fanconi anemia complex. *DNA repair*, 5(9-10), 1119-1125.
- Hasle, H. (2016). Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2016(1), 598-604.
- Hirschhorn, R. (2003). In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. *Journal of Medical Genetics*, 40(10), 721-728.
- Joenje, H., & Patel, K. J. (2001). The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nature Reviews. Genetics*, 2(6), 446-457.
- Kee, Y., & D'Andrea, A. D. (2012). Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 3799-3806.



Kutler, D. I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S. D., Berwick, M., Giampietro, P. F., ... Auerbach, A. D. (2003). A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*, 101(4), 1249-1256.

Mathew, C. G. (2006). Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene*, 25(43), 5875-5884.

Nowzari, H., Jorgensen, M. G., Ta, T. T., Contreras, A., & Slots, J. (2001). Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. *Journal of Periodontology*, 72(11), 1601-1606.

Oostra, A. B., Nieuwint, A. W. M., Joenje, H., & de Winter, J. P. (2012). Diagnosis of fanconi anemia: Chromosomal breakage analysis. *Anemia*, 2012, 238731.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM

Pilonetto, D. V., Pereira, N. F., Bitencourt, M. A., Magdalena, N. I. R., Vieira, E. R., Veiga, L. B. A., ... Pasquini, R. (2009). FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(3), 237-243.

Porto, B., Sousa, R., Ponte, F., Torgal, A., Campilho, F., Campos, A., ... Barbot, J. (2011). [Fanconi anemia: Cytogenetic diagnosis of 40 cases]. *Acta Medica Portuguesa*, 24(3), 405-412.

Prodanov, C. C. (2013). Metodologia do trabalho científico: Métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico. *Universidade Feevale*.

Rosenberg, P. S., Huang, Y., & Alter, B. P. (2004). Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. *Blood*, 104(2), 350-355.

Sagaseta de Ilurdoz, M., Molina, J., Lezáun, I., Valiente, A., & Durán, G. (2003). [Updating Fanconi's anaemia]. *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*, 26(1), 63-78.

Shimamura, A., & Alter, B. P. (2010). Pathophysiology and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. *Blood reviews*, 24(3), 101-122.

Soulier, J., Leblanc, T., Larghero, J., Dastot, H., Shimamura, A., Guardiola, P., ... Gluckman, E. (2005). Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood*, 105(3), 1329-1336.

Taniguchi, T., & D'Andrea, A. D. (2006). Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: Recent progress. *Blood*, 107(11), 4223-4233. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4240>

Tulpule, A., Lensch, M. W., Miller, J. D., Austin, K., D'Andrea, A., Schlaeger, T. M., ... Daley, G. Q. (2010). Knockdown of Fanconi anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. *Blood*, 115(17), 3453-3462.

Williams, D. A., Bennett, C., Bertuch, A., Bessler, M., Coates, T., Corey, S., ... Shimamura, A. (2014). Diagnosis and Treatment of Pediatric Acquired Aplastic Anemia (AAA): An Initial Survey of the North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium (NAPAAC). *Pediatric blood & cancer*, 61(5), 869-874.

Zen, P. R. G., Moraes, F. N. de, Rosa, R. F. M., Graziadio, C., & Paskulin, G. A. (2011). Características clínicas de pacientes com anemia de Fanconi. *Revista Paulista de Pediatria*, 29, 392-399.