

ANEMIA DE FANCONI

Diagnóstico Citogenético de 40 Casos

Beatriz PORTO, Rosa SOUSA, Filipa PONTE, Ana TORGAL,
Fernando CAMPILHO, António CAMPOS, Cristina GONÇALVES, José BARBOT

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença recessiva rara, caracterizada clinicamente por falência medular progressiva, diversas anomalias congénitas e aumento da predisposição para o cancro. A necessidade de evitar a exposição a agentes tóxicos, de programar atempadamente o transplante de células progenitoras hematopoéticas e de proceder ao rastreio de neoplasias associadas à doença reflecte a importância de um diagnóstico correcto e atempado. No entanto, tal é dificultado pela tardia progressão para a anemia, relativamente às outras citopenias, pela grande variabilidade fenotípica da doença, bem como pela dificuldade de um diagnóstico molecular rápido, consequência da grande variabilidade genética desta doença (foram identificados 13 grupos de complementação, que correspondem a 13 genes, cada um com várias mutações diferentes).

A hipersensibilidade ao efeito clastogénico dos agentes alquilantes, em particular o diepoxibutano (DEB), é um marcador único dos doentes com AF, pelo que os estudos citogenéticos de detecção de instabilidade cromossómica induzida por DEB tornaram-se o teste *gold standard* para o seu diagnóstico. Neste trabalho apresentam-se os resultados dos estudos de instabilidade cromossómica induzida por DEB efectuados no Laboratório de Citogenética do ICBAS entre 1992 e 2009. Foram enviadas 222 amostras de sangue periférico provenientes de diversos hospitais do país, maioritariamente do norte e centro, por suspeita clínica na base de alterações fenotípicas características da doença e/ou de citopenias periféricas de etiologia desconhecida. Obtiveram-se também duas amostras de líquido amniótico para diagnóstico pré-natal. No total foram diagnosticados 34 casos de AF. Adicionalmente foram também feitos estudos citogenéticos a 43 familiares de doentes com AF, a partir dos quais foi possível diagnosticar seis novos casos, cinco dos quais correspondiam a indivíduos assintomáticos. Do total da população de doentes com AF, 25% correspondem a indivíduos de etnia cigana. Foram ainda feitos estudos citogenéticos periódicos para seguimento de doentes com AF transplantados, que confirmaram o desaparecimento, pós-transplante, das células hematopoéticas originais hipersensíveis ao DEB.

SUMMARY

FANCONIANEMIA Cytogenetic Diagnosis of 40 Cases

Fanconi Anemia (FA) is a rare recessive disorder clinically characterized by progressive bone marrow failure, diverse congenital malformations and increased predisposition to cancer. Given the late onset of anemia, relatively to other cytopenias, and the high variability in the phenotype, a correct clinical diagnosis is difficult, and may be delayed or even missed. This fact may be prejudicial to patients, due to the need of avoiding exposure to toxic agents, programming the transplantation of hematopoietic progenitor cells and screening of neoplasia associated with the disease. Given the high genetic variability (thirteen complementation groups have been identified, each with genes presenting several

B.P., R.S., F.P., Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto

A.T.: Laboratório de Citogenética. Centro de Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal. Prof. Doutor Sérgio Castedo. Porto

C.G.: Serviço de Hematologia. Hospital Geral de Santo António. Porto

F.C., A.C.: Unidade de Transplante. Instituto Português de Oncologia do Porto. Porto

J.B.: Serviço de Hematologia do Hospital de Crianças Maria Pia. Porto

© 2011 CELOM

different mutations), a rapid molecular diagnosis is not possible. However, there is an urgent need for a timely and correct diagnosis, due to the early evolution of the disease towards malignancy and to the early need of finding compatible donors for future hematopoietic stem cell transplantation. Fortunately, the hypersensitivity of FA cells to the clastogenic (chromosome breaking) effect of DNA cross-linking agents, in particular to diepoxybutane (DEB), provides a unique marker for the diagnosis. At present, cytogenetic analysis for detection of DEB-induced chromosome instability is the gold-standard test for the diagnosis of FA. In the present work we present the results from the DEB induced chromosome instability studies performed in the Laboratory of Cytogenetics of ICBAS between 1992 and 2009. Blood samples from 222 patients were obtained from different hospitals mainly from the north and centre of Portugal. This population includes not only patients with clinical suspicion of FA, but also patients presented with thrombocytopenia, pancitopenia or aplastic anemia, for confirmation/exclusion of FA. Two samples of amniotic fluid were also obtained for pre-natal diagnosis. A total of 34 FA patients were diagnosed. Cytogenetic studies were also performed in blood samples from AF relatives, which allowed the diagnosis of 6 new cases, 5 of them corresponding to asymptomatic individuals. In the total population of FA patients studied, 25% belong to the gypsy ethnic group. Periodic cytogenetic studies were also performed in blood samples from AF patients post transplantation, which confirmed the elimination of the original hematopoietic DEB sensitive cells.

INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença recessiva rara, caracterizada clinicamente por falência medular progressiva, diversas anomalias congénitas e aumento da predisposição para o cancro¹. As neoplasias envolvidas com maior frequência são de carácter hematológico, nomeadamente leucemia mieloblástica aguda e síndrome mielodisplásica¹⁻⁵. Nos adultos observa-se uma frequência acrescida de outras neoplasias, nomeadamente carcinomas de células escamosas da cabeça, pescoço e sistema ginecológico. A falência medular progressiva e o aumento da predisposição maligna são factores responsáveis pela reduzida esperança de vida (cerca de 20 anos). Geneticamente trata-se de uma doença extremamente complexa: foram já identificados 13 grupos de complementação que correspondem a 13 genes, cada um com várias mutações diferentes, mas todos eles participantes num sistema comum de manutenção da estabilidade genómica^{6,7}.

Caracteristicamente, a insuficiência medular progride de forma insidiosa no sentido da pancitopenia. A anemia é geralmente a última citopenia a instalar-se, o que, dada a designação da doença, dificulta a acuidade diagnóstica. Esta dificuldade é acrescida pela sua variabilidade fenotípica. O subdiagnóstico/diagnóstico tardio conduz muitas vezes os doentes a um percurso mais ou menos longo pelas diferentes especialidades relacionadas com a morbilidade da doença, antes da sua identificação. A raridade

da doença e a sua variabilidade genética não permitem um diagnóstico molecular rápido. Esta tendência para o diagnóstico tardio colide com todo um conjunto de benefícios inerentes a um diagnóstico atempado, nomeadamente a detecção precoce de uma evolução para a malignidade e a necessidade de pesquisar atempadamente dadores compatíveis para um eventual transplante de células progenitoras hematopoéticas. O transplante de progenitores hematopoéticos permite corrigir as alterações hematológicas da doença, pelo que, mesmo em caso de evolução para mielodisplasia ou leucemia, poderá constituir um benefício real para os doentes. Os irmãos HLA compatíveis não portadores de doença serão os dadores preferíveis, podendo na sua falta recorrer-se a um dador HLA compatível não aparentado. Se disponível, um sangue de cordão de um irmão não afectado ou de um dador não aparentado pode constituir fonte alternativa de transplante. Existe, contudo, um marcador único para os doentes com AF: a hipersensibilidade das suas células ao efeito clastogénico dos agentes alquilantes, em particular o diepoxibutano (DEB). Assim sendo, os estudos citogenéticos de detecção de instabilidade cromossómica induzida por DEB (Figura 1) tornaram-se o teste *gold standard* para o diagnóstico de AF recomendado pelo *International Fanconi Anemia Registry* (IFAR)^{8,9}.

Apesar de rara, a AF apresenta uma prevalência elevada em alguns grupos étnicos, devido a efeitos de fundador, isolamento e consanguinidade. Um estudo efectuado

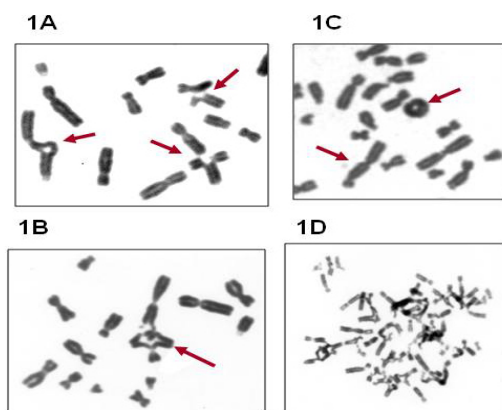


Fig. 1 – Cromossomas de um doente com Anemia de Fanconi (AF) obtidos a partir de uma cultura de linfócitos induzida com DEB. Identificam-se várias formas de instabilidade cromossómica característica das células AF, nomeadamente quebras cromossómicas (Figura 1A), figuras radiais (Figura 1A) e multiradiais (Figura 1B), cromossomas em anel e di-cêntricos (Figura 1C) e uma célula pulverizada (Figura 1D).

pela Rede Espanhola de Investigação em Anemia de Fanconi identificou os ciganos espanhóis como o grupo étnico de maior prevalência de AF (1 em 4)¹⁰. Tal facto é justificado não só pela elevada frequência estimada de portadores como também pela forte consanguinidade inerente a esta população.

Em Portugal não existem dados que permitam estimar a frequência de doentes com AF. Neste trabalho apresentam-se os resultados da pesquisa de instabilidade cromossómica induzida por DEB, de acordo com o protocolo do IFAR, em 222 amostras de sangue periférico de doentes com suspeita de AF e duas amostras de líquido amniótico para diagnóstico pré-natal, estudadas entre 1992 e 2009 no Laboratório de Citogenética do ICBAS, provenientes de diversos hospitais do país, maioritariamente do norte e centro de Portugal. Apresentam-se também os resultados de estudos citogenéticos de 43 familiares de doentes, assim como de estudos citogenéticos de seguimento de doentes transplantados. É apresentada ainda a percentagem de doentes de etnia cigana no conjunto de doentes diagnosticados.

MATERIALEMÉTODOS

Entre 1992 e 2009 foram enviadas ao Laboratório de Citogenética do ICBAS 222 amostras de sangue periférico e duas de líquido amniótico provenientes de diversos hospitais, maioritariamente do norte e centro de Portugal, para efectuar estudos de instabilidade cromossómica induzida com DEB. Os motivos de envio relacionaram-se com algum tipo de suspeita clínica de AF (n = 222), rastreio familiar (n = 43), avaliação da erradicação da instabilidade cromossómica após transplante de medula óssea (n = 6) e

diagnóstico pré-natal (n = 2). Deste conjunto de amostras resultaram 40 diagnósticos de novo, correspondentes a doentes com idades compreendidas entre os 0 e os 29 anos (média = 10 anos). Em paralelo foram também estudadas, como controlo negativo, 102 amostras de sangue periférico de indivíduos normais e duas de líquido amniótico. O número de amostras de sangue periférico de controlos é inferior ao número de doentes estudados uma vez que se efectuaram culturas de vários doentes em simultâneo. Todos os estudos não directamente relacionados com diagnóstico (controlos negativos e rastreios familiares) foram objecto de consentimento informado prévio.

Células e culturas celulares

Foram obtidos de cada doente/controlo 5-10 ml de sangue periférico colhido em tubo heparinizado. Uma amostra de 0,5 ml de sangue total foi usada em cada cultura. Para os estudos de doentes AF pós-transplante medular, além de células de sangue periférico foram também cultivadas células de medula óssea, colhidas em seringa heparinizada (1 ml aproximadamente).

As células foram postas em cultura num tubo estéril contendo meio completo RPMI (Sigma Chemicals Co.), suplementado com 15% de soro fetal (Sigma Chemicals Co.) e antibióticos (penicilina e estreptomicina, GIBCO, Invitrogen Corporation, USA). As culturas foram estimuladas com 5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, GIBCO, Invitrogen Corporation, USA) e colocadas em estufa a 37°C com 5% de circulação de CO₂ durante 72 horas ou 96 horas. O DEB ((±)-1,2:3,4-diepoxybutane, [298-18-0], D-7019 Lot 34H3683, Sigma Chemicals Co.), a uma concentração final no meio de 0.05 µg/ml, foi adicionado a cada cultura 24 horas após o seu início, expondo assim as células a este químico durante 48 ou 72 horas. Uma vez que o DEB é um suspeito carcinogénico de risco desconhecido, as culturas foram efectuadas usando luvas e todos os procedimentos realizados numa câmara de fluxo de ar laminar vertical. O DEB é rapidamente inactivado pelo ácido clorídrico (HCl), pelo que todo o material que entrou em contacto com o DEB foi lavado com HCl antes de ser rejeitado em recipientes próprios.

Análise citogenética

Ao fim de 3-4 dias de cultura, após incubação com colchicina (4 µg/ml) durante uma hora, a cultura foi terminada e as células processadas. Foi feito um tratamento com soluto hipotónico (75 mM KCl) durante 15 minutos a 37°C, seguido de fixação numa solução de ácido acético:metanol 1:3. As preparações cromossómicas foram realizadas usando o método de espalhamento e secagem ao ar.

A análise cromossómica foi feita em 25-100 metafases (número modal = 100) coradas com Giemsa a 4%. O mínimo de 25 metafases foi contado apenas nos casos em que o índice mitótico era extremamente baixo e o índice de quebras cromossómicas extremamente elevado. Para evitar desvios na selecção das células a analisar, seleccionaram-se em cada estudo apenas metafases suficientemente bem definidas e isoladas. Para cada célula seleccionada foi identificado o número total de cromossomas e o número e tipos de alterações estruturais. As áreas acromáticas de tamanho inferior à largura de um cromatídio foram seleccionadas como *gaps*, enquanto que as de tamanho superior foram consideradas quebras (Figura 1A). Configurações com trocas cromatídicas do tipo figuras radiais (Figura 1A) e multiradiais (Figura 1B), cromossomas dicêntricos e cromossomas em anel (Figura 1C) foram seleccionados como rearranjos. Os *gaps* foram excluídos do cálculo da frequência de quebras e os rearranjos seleccionados como duas quebras. Células com uma instabilidade cromossómica demasiado elevada para que fosse possível contar o número de quebras foram seleccionadas como células pulverizadas (Figura 1D).

Para determinação da instabilidade cromossómica foram avaliados, de acordo com o protocolo do IFAR, dois parâmetros: a percentagem de células aberrantes e o número de quebras/célula. Este último parâmetro é conside-

rado o mais discriminativo, uma vez que não há qualquer sobreposição de valores entre os grupos AF e não AF. Os doentes foram então diagnosticados como AF ou não AF de acordo com a sensibilidade ao DEB, conforme o protocolo da IFAR¹¹.

RESULTADOS

Estudos de instabilidade cromossómica induzida com DEB

Foram feitos estudos de instabilidade cromossómica induzida com DEB, de acordo com o protocolo do IFAR, em culturas de linfócitos de 222 indivíduos com algum tipo de suspeita clínica da doença. A análise citogenética teve como objectivo determinar a proporção de metafases com quebras cromossómicas bem como o número de quebras por célula (média de 25-100 células analisadas por doente). Os resultados obtidos mostram que 34 dos doentes estudados apresentam um significativo aumento da frequência de células com quebras (79,9% ± 20,6%) e do n.º de quebras/célula (7,33 ± 4,6) relativamente aos controlos (6,5% ± 5,7% e 0,08 ± 0,10 respectivamente) (Figuras 2A e 2B), tendo sido diagnosticados como AF. Os restantes doentes apresentam padrões de instabilidade cromossómica sobreponíveis aos dos indivíduos controlo (6,1% ± 5,7% e 0,09 ± 0,11 respectivamente), tendo sido

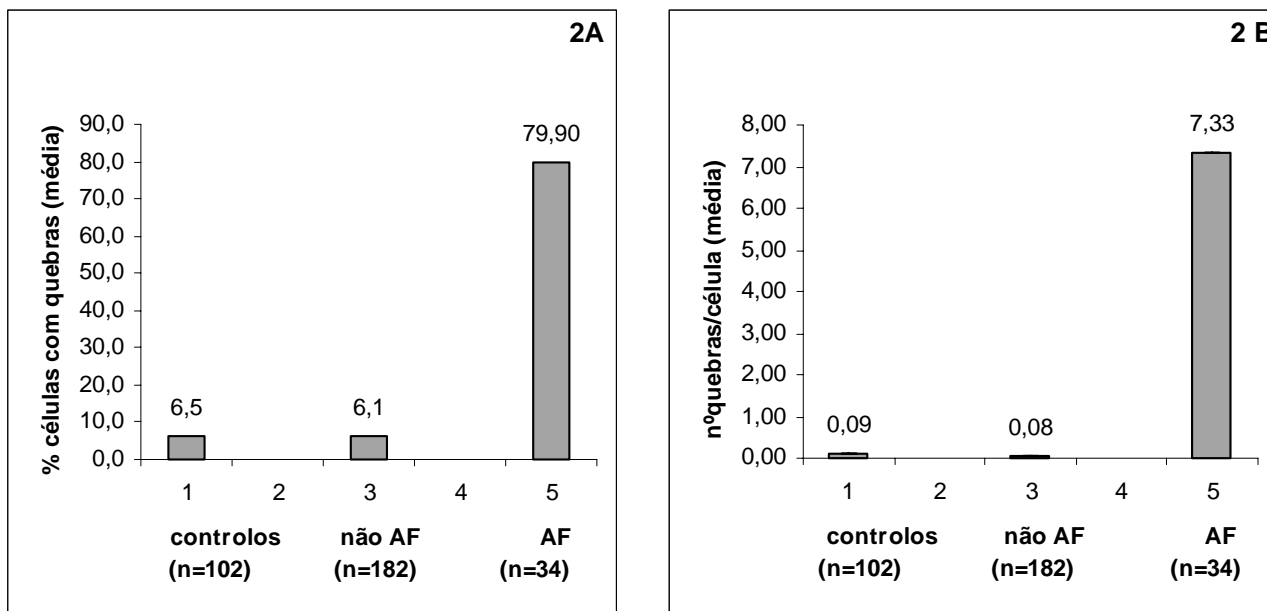


Fig. 2 – Estudos de instabilidade cromossómica induzida por DEB em linfócitos de sangue periférico de 225 doentes com suspeita clínica/exclusão de Anemia de Fanconi (AF) e 102 controlos. Os parâmetros de instabilidade, determinados para cada doente, correspondem à percentagem de células com quebras (Figura 1A) e à média do nº de quebras/célula (Figura 1B), calculados a partir de amostras, para cada indivíduo, de 25-100 células (n.º modal = 100).

Classificação do IFAR para diagnóstico de AF (A. Auerbach (2003), in: Current Protocols in Human Genetics, 8.7.1-8.7.15):

AF: nºquebras/célula (média) em culturas tratadas com DEB = 1.10-23.9;

Não AF: nºquebras/célula (média) em culturas tratadas com DEB = 0.00-0.36;

diagnosticados como não AF. Foram também efectuados estudos de instabilidade cromossómica induzida com DEB em culturas de líquido amniótico, em dois casos para diagnóstico pré-natal. Os resultados obtidos permitiram concluir a condição de não-AF (dados não apresentados).

Estudos de instabilidade cromossómica induzida com DEB em familiares de doentes com AF

Em 13 dos casos diagnosticados como AF (estudo dos pais, irmãos e estudo de primos direitos numa família consanguínea) foram feitos estudos familiares. No total foram estudados 43 indivíduos, todos sem sintomatologia, com excepção de um caso de um irmão que já apresentava uma anemia severa (irmão de AF11). Pela análise dos resultados apresentados no quadro 1 verifica-se que a partir destes estudos foi possível diagnosticar, entre os familiares estudados, mais seis novos casos de AF.

Quadro 1 – Estudos de instabilidade cromossómica induzida por DEB em linfócitos de sangue periférico de familiares de doentes com Anemia de Fanconi. O parâmetro de instabilidade, determinado para cada doente, corresponde à média do n.º de quebras/célula calculada a partir de uma amostra de 25-100 células.

Doente	Familiar	n.ºquebras/ célula	Diagnóstico dos familiares estudados
AF1		4,00	
	mãe	0,44	não AF
	irmã	7,10	AF
AF2		5,52	
	mãe	0,48	não AF
	pai	1,06	não AF
	irmão	0,20	não AF
	irmão	0,17	não AF
AF3		9,00	
	mãe	0,02	não AF
	irmão	0,05	não AF
AF4		4,48	
	mãe	0,02	não AF
	pai	0,02	não AF
	irmão	5,00	AF

Doente	Familiar	n.ºquebras/ célula	Diagnóstico dos familiares estudados
AF5		13,80	
	irmã	0,07	não AF
	irmã	0,01	não AF
	irmã	0,01	não AF
	irmão	0,08	não AF
	irmão	0,01	não AF
	irmão	0,02	não AF
	irmão	0,06	não AF
	irmão	0,01	não AF
AF6		15,00	
	irmão	0,07	não AF
	irmão	0,23	não AF
AF7		2,14	
	irmã	3,64	AF
	irmã	0,11	não AF
	irmã	0,07	não AF
AF8		6,70	
	mãe	0,06	não AF
	pai	0,10	não AF
	irmão	0,29	não AF
AF9		14,36	
	mãe	0,11	não AF
	pai	0,16	não AF
AF10		9,74	
	irmã	0,02	não AF
	irmã	0,01	não AF
	irmã	0,05	não AF
	irmã	3,18	AF
	irmã	0,05	não AF
	irmã	0,02	não AF
	irmã	0,04	não AF

Doente	Familiar	n.ºquebras/ célula	Diagnóstico dos familiares estudados
	irmã	0,03	não AF
	irmã	0,06	não AF
	irmão	0,07	não AF
	irmão	0,03	não AF
	irmão	0,04	não AF
	irmão	0,03	não AF
	irmão	0,01	não AF
	irmão	0,03	não AF
	primo	0,05	não AF
	primo	0,09	não AF
AF11		11,70	
	irmã	8,60	AF
	irmã	0,03	não AF
AF12		9,44	
	irmã	0,02	não AF
	irmã	0,08	não AF
	irmã	0,53	não AF
	irmão	7,47	AF
AF13		0,86	
	irmão	0,05	não AF

Estudos de instabilidade cromossómica induzida com DEB em doentes com AF transplantados

Foram feitos estudos citogenéticos periódicos em células do sangue periférico e/ou medula óssea de seis doentes AF após transplante medular (três doentes pertencentes ao grupo de casos AF e três com diagnóstico citogenético prévio realizado noutra instituição). Os resultados obtidos mostram que, após o transplante, as células não apresentam a instabilidade cromossómica típica das células AF (Quadro 2). Apenas num caso (AF6) os estudos efectuados cerca de 18 meses após o transplante revelaram um aumento da instabilidade cromossómica. No entanto, esse aumento não foi significativo, tendo-se observado um número de quebras/célula muito inferior ao padrão típico das células AF. Estudos posteriores efectuados a esse doente revelaram que a instabilidade diminuiu tendo-se mantido dentro de parâmetros normais.

Frequência relativa de doentes AF de etnia cigana

Entre a população de doentes AF estudada encontram-se 10 doentes de etnia cigana (25%). Estes indivíduos são oriundos de diferentes regiões de Portugal nomeadamente Porto, Aveiro e Coimbra. No entanto, estão distribuídos apenas por três famílias, e mesmo estas têm apelidos em comum. Existe, consequentemente, consanguinidade elevada nas famílias estudadas.

DISCUSSÃO

A Anemia de Fanconi é uma doença recessiva rara. Em populações não consanguíneas, está estimado que 1/200,000 indivíduos são afectados, sendo a frequência de portadores de 1/300. Esta estimativa foi baseada na incidência de indivíduos afectados antes de se conhecer por completo o fenótipo e o genótipo FA. Actualmente pensa-se que 0,5% da população seja heterozigótica para um locus AF⁵. A baixa estimativa pode ser o resultado de uma avaliação incompleta de casos antes da aplicação generalizada, em diagnóstico, dos testes de instabilidade cromossómica induzida por agentes alquilantes⁵.

Em Portugal não existe, até ao momento, um levantamento que permita estimar a frequência de doentes AF. Neste trabalho foram diagnosticados 40 doentes através de estudos de instabilidade cromossómica induzida com DEB. Tendo em conta que a população portuguesa actual tem cerca de 10 milhões de habitantes e que este estudo engloba apenas uma parte da população portuguesa (maioritariamente do norte e centro de Portugal), os resultados apresentados sugerem que a frequência de AF na população portuguesa poderá ser, de facto, superior à estimada. Em Espanha, onde a população é aproximadamente de 40 milhões de habitantes, estão registados 125 doentes AF pela Rede Espanhola de Investigação em Anemia de Fanconi SFARN¹², o que corresponde a uma frequência de doentes AF inferior à apresentada neste estudo. Assim, e como trabalho futuro, será importante realizar um estudo de colaboração a nível nacional para confirmar, através de análise de instabilidade cromossómica, a frequência encontrada no presente trabalho.

Os estudos citogenéticos efectuados mostraram-se valiosos não só para o estudo de doentes com suspeita clínica de AF mas também para estudos de familiares de doentes AF. A partir destes, foi possível diagnosticar mais seis novos casos, cinco dos quais correspondem a indivíduos que não apresentavam qualquer sintomatologia da doença. Este facto está em sintonia com convicção actual de que a AF é uma doença subdiagnosticada. Estes dados foram também de extrema importância para a selecção de

Quadro 2 – Avaliação periódica da instabilidade cromossómica induzida por DEB em culturas de linfócitos de sangue periférico (s.p.) e/ou medula óssea (m.o.) de doentes com Anemia de Fanconi após transplante de medula óssea

Doente (Data de Transplante)	Cultura	Data	Nº Quebras / Célula	
			Ao diagnóstico	Pós transplante
AF14			*	
(30/05/1997)	s.p.	02.07.1998		0,12
	s.p.	23.11.1998		0,06
	s.p.	15.06.1999		0,09
AF15			12,00	
(21/07/1998)	s.p.	06.10.1997		
	s.p.	15.06.1999		0,08
	s.p.	20.12.1999		0,02
	s.p.	23.10.2000		0,01
	m.o.	23.07.2002		0,03
AF16			*	
(16/04/2001)	s.p.	13.11.2001		0,04
	s.p.	16.04.2002		0,10
	m.o.	“		0,08
	m.o.	31.10.2002		0,06
	m.o.	16.04.2003		0,06
	m.o.	20.04.2004		0,08
	s.p.	09.05.2007		0,00
	s.p.	08.05.2008		0,05
	s.p.	06.05.2009		0,07
	AF4			9,00
(21/11/2001)	s.p.	26.03.1996		
	m.o.	23.07.2002		1,25
	m.o.	05.12.2002		0,01
AF6			15,00	
(16/11/2005)	s.p.	16.12.2004		
	m.o.	20.12.2005		0,04
	s.p.	21.02.2006		0,03
	m.o.	“		0,32
	s.p.	16.05.2006		0,54
	m.o.	“		0,43
	s.p.	12.09.2006		0,03
	m.o.	“		0,04
	s.p.	21.11.2006		0,03
	m.o.	“		0,05
	s.p.	27.11.2007		0,03
	m.o.	“		0,09
	s.p.	11.11.2008		0,08
	AF17			*
(16/05/2006)	m.o.	17.08.2006		0,00

* diagnóstico efectuado noutra instituição

possíveis dadores de medula óssea.

Após transplante de medula a hematopoiese da maioria dos doentes é completamente eliminada, o que resulta numa quimera completa. Nalguns doentes pode instalar-se um quimerismo misto, que pode ter um predomínio do dador ou receptor. Este facto só por si não é deletério, a não ser que o clone persistente seja maligno. A monitorização do quimerismo ao longo do tempo pode, em caso de perda do mesmo, prever a falência do enxerto e permitir a sua reversão infundindo linfócitos de dador. Assim sendo, a avaliação periódica da instabilidade cromossómica induzida por DEB após o transplante pode ser uma mais valia para o controlo da possível persistência de células do dador, uma vez que as células transplantadas não são

sensíveis ao DEB. Os resultados dos estudos citogenéticos realizados após transplante medular mostraram que, as células não apresentam a instabilidade cromossómica típica das células AF. No único caso em que se observou um aumento da instabilidade após o transplante, esse aumento não foi significativo, tendo-se observado um número de quebras/célula muito inferior ao padrão típico das células AF. Este aumento poderá corresponder a um quimerismo misto, sem significado clínico, uma vez que o doente apresenta um quadro hematológico normal. A sequência dos estudos realizados neste doente revelou uma diminuição da instabilidade cromossómica, sempre num contexto de normalidade hematológica.

CONCLUSÃO

Embora a frequência de doentes AF seja bai-

xa, uma vez que se trata de uma doença recessiva rara, encontram-se frequências superiores em alguns grupos étnicos devido a efeitos de fundador, isolamento e consanguinidade. Um estudo efectuado pela SFARN identificou os ciganos espanhóis como o grupo étnico de maior prevalência de AF¹⁰. Tal facto é justificado não só pela elevada frequência estimada de portadores como também pela forte consanguinidade inerente a esta população. O mesmo estudo sugere que a elevada incidência daquele grupo étnico se deve a uma mutação ancestral fundadora no gene *FANCA*, originada há 600 anos numa família cigana que migrou para Espanha. Esta mutação terá sido espalhada, por consanguinidade, por toda a Península Ibérica, incluindo Portugal¹⁰. No presente trabalho verificamos que

dentro da população de doentes AF estudados existe também uma elevada percentagem de doentes de etnia cigana (25%), que curiosamente é semelhante à apresentada na população Espanhola. Neste momento estão a ser desenvolvidos estudos moleculares, em colaboração com a SFARN (dados ainda não publicados), para confirmar se a mutação presente nos doentes de etnia cigana da população portuguesa é a mesma da população espanhola.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos clínicos Alexandra Mota, Anabela Ferrão, Ângelo Martins, Armandina Silva, Carlos Mocho, Carlos Seabra, Cláudia Casais, Cristina Castro, Cristina Dias, Cristina Ferreira, Cristina Godinho, Eduarda Coimbra, Esmeralda Cleto, Fátima Ferreira, Filipe Gonçalves, Gabriela Soares, Henrique Coelho, Íris Maia, Isabel Castro, Isabel Sousa, João Silva, Jorge Coutinho, Jorge Pinto Basto, José Carlos Almeida, Lúcia Gomes, Letícia Ribeiro, Luciana Pinho, Luís Vale, Lurdes Maricato, Manuel Rodrigues, Manuela Benedito, Márcia Martins, Margarida Amil, Margarida Reis Lima, Margarida Santos, Maria Teresa Lourenço, Marika Bini Antunes, Marisol Lopes, Marta Duarte, Miguel Costa Miguel Rocha, Nelson Domingues, Nuno Farinha, Pinho Vaz, Rui Almeida, Sara Morais, Telma Sousa Mendes, Telmo Fonseca, Teresa Oliva, Teresa Sevivas e Zaida Corbilton, pelo envio das amostras de sangue de doentes para diagnóstico/exclusão de Anemia de Fanconi, sem as quais não seria possível realizar este trabalho.

Agradecem também à responsável pelo Laboratório de Citogenética do ICBAS, Isabel Malheiro, pela oportunidade que concedeu para a montagem, no Laboratório, de um serviço de apoio à comunidade para o diagnóstico de Anemia de Fanconi, e ainda a Arminda Silva, pela ajuda no trabalho laboratorial.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTER BP: Diagnostic evaluation of FA. Em: Fanconi Anemia. Guidelines for Diagnosis and Management. Eiler ME, Frohnmayer D, Frohnmayer L, Larsen K, Owen J Eds. Fanconi Anemia Research Fund, Inc. Third Edition 2008;33-48
2. FANCONI G: Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (F.A.). I. Clinical aspects. *Semin Hematol* 1967; 4:233
3. SCHROEDER TM, TILGEN D, KRUGER J, VOGEL F: Formal genetics of Fanconi's anemia. *Hum Genet* 1976;32:257-288.
4. KUTLER DI, SINGH B, SATAGOPAN et al: A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003;101:1249-56
5. AUERBACH AD: Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 2009;668:4-10
6. MOLDOVAN GL, D'ANDREA AD: How the Fanconi Anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 2009;43:223-249
7. AUERBACH AD, LACH F: Fanconi Anemia Database. The Rockefeller University 2001
8. AUERBACH AD, ADLER B, CHAGANTI RSK: Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. *Pediatrics* 1981;67:128-135
9. AUERBACH AD, ROGATKO A, SHROEDER-KURTH TM: International Fanconi anemia registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* 1989;73:391-6
10. CALLÉN E, CASADO JA, TISCHKOWITZ MD et al: A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* 2005;105:1946-9
11. AUERBACH AD: Diagnosis of Fanconi Anemia by diepoxybutane analysis, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Inc 2003;8.7.1-7.15
12. CASADO JA, CALLÉN E, JACOME A et al: A comprehensive strategy for the subtyping of Fanconi Anemia patients: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia research network. *J Med Genet* 2007;44:241-9