

ANEMIA DE FANCONI
CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA
O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Aluno

JOÃO DANIEL MONTEIRO SILVA
Mestrado Integrado em Medicina (MIM)
do ICBAS/UP e HSA/CHP

Orientador: Dr. José Barbot, HMP/CHP
Co-Orientador: Prof. Beatriz Porto, ICBAS/UP

Projecto desenvolvido no âmbito da
Disciplina de Iniciação a Investigação Clínica (DIIC)
Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima, HSA/CHP e ICBAS/UP

Apresentado para obtenção do grau de Mestre em Medicina.

2012

Este trabalho, apresentado para fins de obtenção do grau de Mestre em Medicina, integra uma proposta de projecto de investigação e o respectivo relatório de execução, desenvolvidos no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP) e do Centro Hospitalar do Porto (CHP), durante os anos lectivos 2010/2011 (concepção e redacção da proposta) e 2011/2012 (execução do projecto, análise e interpretação dos resultados e elaboração do relatório).

O projecto foi executado no CHP (Serviços de Hematologia Clínica e de Hematologia Pediátrica), e no ICBAS/UP (Laboratórios de Citogenética e de Imunologia), sob a orientação do Dr. José Barbot (CHP) e da Prof^a. Beatriz Porto (ICBAS/UP).

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Margarida Lima, responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica, pela incansável disponibilidade, ao Dr. José Barbot, meu orientador, à Prof^ª. Beatriz Porto, minha co-orientadora, e ao Dr. Jorge Coutinho, Director do Serviço de Hematologia Clínica do CHP.

A todos os que contribuíram para que este trabalho fosse possível, colaborando na convocação dos doentes e na revisão dos processos clínicos – muito especialmente à Dra. Renata Cabral, médica interna de Hematologia Clínica do CHP – ou no estudo laboratorial – muito especialmente à Dra. Rosa Sousa do Laboratório de Citogenética do ICBAS, e Prof^ª. Vanessa Magalhães e Prof^ª. Paula Ferreira, do Laboratório de Imunologia do ICBAS. E a tantas outras pessoas que tanto me ajudaram, sem eu ter bem a certeza de ter sido merecedor dessa ajuda.

Ao ICBAS/UP, por ter contribuído para o financiamento deste trabalho, através da bolsa concedida aos alunos da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome de aplasia medular que se enquadra no espectro das doenças hereditárias autossómicas recessivas raras. Caracteriza-se classicamente pela tríade diagnóstica de anormalidades congénitas, falência da medula óssea e susceptibilidade ao cancro. Possui uma prevalência entre 1-5 casos por milhão de habitantes estimando-se que seja uma doença subdiagnosticada por três razões essenciais: 1) o desconhecimento médico geral desta entidade em virtude da sua raridade; 2) a variabilidade das suas formas de apresentação; e 3) a ocorrência tardia da anemia comparativamente às outras citopenias periféricas. É uma doença que, embora rara, possui linhas de investigação próprias sobretudo pelo que representa no estudo da genética do cancro e dos mecanismos que lhe estão subjacentes. As manifestações clínicas mais frequentes são a pequena estatura, as anormalidades cutâneas e as malformações esqueléticas; todavia, 25-40% dos doentes apresentam-se fisicamente normais. Cerca de 80% dos diagnósticos de AF são feitos em doentes com anomalias hematológicas, quase na sua totalidade em idade pediátrica. Sendo a variabilidade fenotípica bastante grande, também existe grande variabilidade genotípica. Existem 13 loci genéticos identificados causadores da doença, estimando-se que 0,5% da população seja heterozigótica para um dado locus. Estes 13 loci genéticos identificados condicionam a formação de proteínas que, formando três complexos multiproteicos, estão envolvidas nos mecanismos de reparação genética. Destas proteínas existe uma, FANCD2, que integra um dos complexos finais da cadeia na forma monoubiquitinada quando todos os genes a montante dessa cadeia são expressos correctamente. O diagnóstico definitivo a doença é feito por citogenética pela pesquisa de quebras cromossómicas utilizando agentes clastogénicos como o diepoxibutano (DEB), com uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 99%. A pesquisa da proteína FANCD2 monoubiquitinada através de *Western Blot* dá a base para o diagnóstico laboratorial da AF por métodos bioquímicos. Todavia, esta técnica ainda não está disponível em Portugal. O tratamento da AF assenta na correcção cirúrgica das anomalias congénitas quando estas podem ser corrigidas, nas terapêuticas médicas quando estas são indispensáveis, nomeadamente com recurso aos androgénios em doses elevadas e suporte transfusional para o controle das citopenias periféricas, ou ainda aos transplantes de medula óssea.

OBJECTIVOS: Definiram-se para este trabalho, dois objectivos principais: 1) fazer uma revisão dos casos de doentes com AF seguidos nas consultas de Hematologia e de Hematologia Pediátrica do Centro Hospitalar do Porto e 2) montar a técnica de detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de *Western Blot* e, se possível, documentar a sua sensibilidade e especificidade, por comparação com os meios convencionais de diagnóstico da doença.

MATERIAL E MÉTODOS: A revisão dos casos foi feita através da recolha de dados clínicos e analíticos dos processos clínicos dos doentes com AF, tendo sido dada especial atenção às malformações congénitas e às manifestações hematológicas e tendo-se procedido ao registo individual da evolução dos parâmetros hematológicos desde o diagnóstico até à última avaliação. A detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 foi efectuada nas proteínas obtidas a partir de células mononucleadas de sangue periférico, pelo método de *Western Blot*.

RESULTADOS: Foram identificados 23 doentes, tendo-se procedido à revisão dos dados constantes nos processos clínicos de 21 doentes, 15 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, dos quais 17 se encontravam vivos (idade mediana de 12 anos, variando entre 2 e 54 anos), 4 tinham falecido (idade mediana de falecimento 24 anos, variando entre 7 e 43 anos); os restantes 2 casos tinham sido referenciados para transplantação de medula óssea, estando os respectivos processos no Instituto Português de Oncologia do Porto, não tendo sido possível a sua consulta. Dos processos consultados, tinha sido efectuado estudo citogenético nos 21 casos, mas apenas em 15 os resultados obtidos tinham confirmado o diagnóstico. A mediana das idades à data da primeira consulta era de 6 anos, variando entre 4 meses e 28 anos e a mediana do tempo decorrido entre a primeira e a última consulta era de 8 anos, variando entre 1 e 26 anos. As malformações congénitas mais frequentes eram as malformações cutâneas (76%), seguidas pelas malformações esqueléticas (57%) e pelo atraso do desenvolvimento (42%). No que diz respeito às

manifestações hematológicas, verificou-se que a citopenia mais frequente ao diagnóstico era a trombocitopenia (76%), seguida da anemia (71%) e da neutropenia (43%). A mediana do volume globular médio estava no limite superior do normal (100,3 fL), mas quase todos os doentes tinha tido macrocitose em alguma fase da evolução da doença. Em relação à hemoglobina F, a mediana dos valores médios obtidos era de 9,1% (10 vezes o limite superior do normal). Durante o período de *follow-up*, observou-se uma relativa estabilidade dos valores de hemoglobina, leucócitos e neutrófilos, e uma tendência para a diminuição da contagem de plaquetas. Um doente que apresentava mielodisplasia tinha falecido com leucemia aguda. Não foi possível identificar as causas de morte nos restantes casos. No que respeita ao estudo laboratorial, foram dados os primeiros passos para a detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de *Western Blot* e o estudo foi efectuado em 10 doentes e 8 controlos, mas surgiram problemas relacionados à técnica que nos permitiram concluir que esta não foi eficaz na detecção da forma não monoubiquitinada da proteína FANCD2 e que portanto, por agora, não pode ainda ser encarada como uma técnica de rastreio ou diagnóstico de Anemia de Fanconi em Portugal.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES: A análise dos dados recolhidos na revisão de casos sustenta que a maioria dos padrões de apresentação e evolução da doença são idênticos aos descritos na literatura. A escassez de dados nos processos clínicos impediu uma caracterização mais detalhada, nomeadamente quanto às complicações intercorrentes, terapêuticas instituídas, referenciação para transplante de medula e causas de morte. É apresentada uma proposta de *follow-up* dos doentes com AF, com um esquema de periodicidade de avaliações, naturalmente flexível tendo em conta a especificidade de cada apresentação. No que respeita ao estudo laboratorial, concluiu-se que a detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de *Western Blot* não funcionou como era esperado, sendo necessário prosseguir o trabalho com vista à optimização da técnica e à sua efectiva disponibilização como método auxiliar para o diagnóstico da AF.

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| PROPOSTA DE PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO | 1 |
| PLANO CIENTÍFICO | 2 |
| Introdução | 2 |
| Epidemiologia da Anemia de Fanconi..... | 2 |
| Variabilidade fenotípica da Anemia de Fanconi..... | 2 |
| Critérios para pesquisa diagnóstica de Anemia de Fanconi..... | 3 |
| Variabilidade genotípica e instabilidade genética na Anemia de Fanconi..... | 3 |
| Complexos proteicos da via da Anemia de Fanconi e reparação do ADN | 3 |
| Diagnóstico laboratorial da Anemia de Fanconi..... | 4 |
| Tratamento da Anemia de Fanconi | 5 |
| Enquadramento e justificação do estudo | 6 |
| Problemas | 6 |
| Questões..... | 6 |
| Hipóteses de trabalho..... | 7 |
| Objectivos do estudo | 7 |
| Desenho do estudo..... | 7 |
| Fases do estudo | 7 |
| Tipo de estudo..... | 7 |
| Universo, população e amostra..... | 7 |
| Universo..... | 7 |
| População..... | 7 |
| Amostra | 7 |
| Seleção dos participantes e critérios de elegibilidade | 7 |
| 1ª fase do estudo – Revisão casuística | 7 |
| Critérios de inclusão | 8 |
| Critérios de exclusão..... | 8 |
| 2ª fase do estudo – Estudo laboratorial | 8 |
| Critérios de inclusão | 8 |
| Critérios de exclusão..... | 8 |
| Intervenientes no projecto..... | 8 |
| Instituições, Departamentos e Serviços | 8 |
| Equipa de Investigação | 8 |
| Constituição | 8 |
| Aluno | 8 |
| Orientadores..... | 8 |
| Supervisores..... | 9 |
| Outros investigadores | 9 |
| Funções e responsabilidades | 9 |
| Tempo dedicado ao projecto..... | 9 |
| Plano de trabalho | 9 |
| Tarefas associadas ao projecto..... | 9 |
| Tarefa 1 – Informação e solicitação de participação no estudo | 10 |
| Tarefa 2 – Revisão dos casos de AF seguidos no CHP | 10 |
| Tarefa 3 – Consentimento informado e colheita de amostras | 11 |
| Tarefa 4 – Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 | 12 |
| Material e métodos | 13 |
| 1ª fase do estudo – Revisão casuística..... | 13 |

| | |
|---|-----------|
| Instrumentos de recolha de dados | 13 |
| 2ª fase do estudo – Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 | 13 |
| Procedimentos técnicos | 13 |
| Fundamento teórico | 13 |
| Método..... | 13 |
| Colheita de sangue e isolamento de células mononucleadas:..... | 13 |
| Cultura primária..... | 13 |
| Preparação dos lisados celulares / soluções de proteínas: | 13 |
| Electroforese em gel de SDS/PAGE:..... | 14 |
| Detecção da proteína FANCD2 e da forma monoubiquitinada: | 14 |
| Interpretação: | 14 |
| Equipamento, material e reagentes | 14 |
| Equipamento..... | 14 |
| Reagentes e material consumível..... | 15 |
| Soluções e tampões de preparação extemporânea | 16 |
| Calendarização..... | 17 |
| Duração..... | 17 |
| Datas de início e conclusão..... | 17 |
| Cronograma de execução..... | 17 |
| Indicadores de produção | 17 |
| Comunicações orais e posters | 17 |
| Trabalhos escritos | 17 |
| Referências bibliográficas | 18 |
| PLANO FINANCEIRO..... | 19 |
| Orçamento | 19 |
| Financiamento | 19 |
| GLOSSÁRIO..... | 20 |
| Abreviaturas e acrónimos | 20 |
| Termos técnicos..... | 20 |
| ANEXOS..... | 21 |
| Anexo 1 - Formulário de colheita de dados (1) | 22 |
| Anexo 2 - Formulário de colheita de dados (2) | 28 |
| Termo de consentimento informado (Doentes) | 29 |
| Termo de consentimento informado (Representantes legais)..... | 30 |
| Termo de consentimento informado (Controlos, dadores de sangue) | 31 |
| Folheto informativo (Doentes) | 32 |
| Folheto informativo (Controlos, Dadores de Sangue)..... | 32 |
| Folha de rosto do estudo de investigação | 33 |
| Pedidos de autorização institucional..... | 35 |
| Presidente do Conselho de Administração do CHP..... | 35 |
| Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP | 35 |
| Directora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP | 35 |
| Termos de Responsabilidade | 36 |
| Aluno | 36 |
| Orientador..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| Supervisor do CHP | 36 |
| Termos de autorização local | 37 |
| Directores de Serviço..... | 37 |
| Directores / Conselhos de Gestão de Departamento..... | 37 |
| RELATÓRIO DE EXECUÇÃO | 38 |
| REVISÃO DE SÉRIE DE CASOS | 39 |
| Nota introdutória..... | 39 |
| Resultados..... | 39 |
| Caracterização da população e da amostra | 39 |
| Idade ao diagnóstico | 40 |
| Tempo de follow-up | 40 |
| Malformações congénitas | 40 |
| Manifestações hematológicas | 41 |
| Citopenias ao diagnóstico | 41 |
| Volume Globular Médio..... | 42 |
| Hemoglobina F | 42 |
| Evolução hematológica..... | 43 |
| Discussão | 46 |
| TRABALHO LABORATORIAL | 47 |
| Nota introdutória..... | 47 |
| Resultados..... | 47 |
| Caracterização da amostra | 47 |
| Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 por <i>Western Blot</i> | 47 |
| Discussão | 49 |
| COMENTÁRIO FINAL | 50 |
| ANEXOS | i |
| I – Resumo clínico-laboratorial individualizado | ii |
| II – Proposta de <i>follow-up</i> dos doentes..... | ix |
| III – Protocolo para a determinação da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 em doentes com Anemia de Fanconi..... | x |

PROPOSTA DE PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO

Ano lectivo: 2010/2011

PLANO CIENTÍFICO

Introdução

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença hereditária rara com padrão de transmissão autossômico recessivo, ou recessivo ligado ao cromossoma X (2% casos), caracterizada pela tríade diagnóstica de anormalidades congénitas, falência da medula óssea e susceptibilidade ao cancro (Huck, e col., 2005; Taniguchi e D'Andrea, 2006; Moldovan e D'Andrea, 2009). A nível celular, por sua vez, é caracterizada por instabilidade cromossômica demonstrada citogeneticamente pela hipersensibilidade a agentes clastogénicos como a mitomicina C (MMC) ou o diepoxibutano (DEB) (Taniguchi e D'Andrea, 2006; Moldovan e D'Andrea, 2009; D'Andrea, 2010).

Epidemiologia da Anemia de Fanconi

A doença manifesta-se maioritariamente em idade pediátrica. Existem, contudo, relatos de casos diagnosticados aos 56 anos (Huck, e col., 2005). A idade média do diagnóstico é de 6,5 anos no sexo masculino e 8 anos no sexo feminino. A sobrevivência média cifrou-se em 30 anos no período compreendido entre 1991-2000, por contraponto à sobrevivência média de 20 anos observada no período entre 1981-1990 (Taniguchi e D'Andrea, 2006). Para esta evolução foi decisivo o avanço das estratégias terapêuticas no combate às neoplasias hematológicas, largamente responsáveis pela elevada mortalidade destes doentes em idade jovem.

A sua prevalência é estimada em 1 - 5 em 1.000.000 indivíduos (Taniguchi e D'Andrea, 2006; Jacquemont e Taniguchi, 2007; D'Andrea, 2010). Nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá o Registo Internacional de Anemia de Fanconi (RIAF) registou, entre Maio de 1982 e Agosto de 2008, 1075 casos (Auerbach, 2009). O registo espanhol engloba 122 casos (Callén, e col., 2005). Em Portugal não existe um registo nacional. O número de casos diagnosticados pelo nosso principal laboratório de referência (Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP) conduz a uma estimativa de prevalência de 50 casos no país (Porto, e col., *in press*).

Variabilidade fenotípica da Anemia de Fanconi

As manifestações clínicas mais frequentes da AF são a pequena estatura, anormalidades cutâneas (manchas *café au lait* e hipopigmentação), malformações esqueléticas (ausência, hipoplasia ou anormalidades do polegar e rádio), renais e da cabeça, deficiência auditiva, hipogonadismo e ainda atraso mental (Taniguchi e D'Andrea, 2006; D'Andrea, 2010). Existe ainda um conjunto de sinais característicos de uma entidade classicamente descrita como VACTERL (*vertebral anomalies, anal atresia, cardiac abnormalities, tracheo-esophageal fistula, renal anomalies and radial limb*), a que se pode associar hidrocefalia, bastante característica da doença (Auerbach, 2009). Todavia, 25 a 40% dos doentes apresentam-se fisicamente normal, dificultando e atrasando o diagnóstico (Eiller, e col., 2008).

Quando as anomalias/malformações congénitas ou outros sinais característicos não estão presentes, ou não são valorizados, a doença manifesta-se na infância, frequentemente, por insuficiência medular progressiva (incidência cumulativa de 90% aos 40 anos), traduzida por citopenias periféricas e hipoplasia da medula óssea. Estima-se que cerca de 80% dos diagnósticos de AF são feitos em doentes com anomalias hematológicas. Ainda no campo hematológico a AF pode também manifestar-se por síndrome mielodisplásica (SMD) ou leucemia mieloblástica aguda (LMA). A idade média de ocorrência de LMA nos doentes com AF é de 13 anos, por contraponto aos 67 anos na população geral. Mais tarde, habitualmente, a doença manifesta-se por elevada susceptibilidade ao cancro, especialmente da cabeça e pescoço (média de idade de ocorrência nos doentes com AF aos 27 anos, por contraponto aos 62 anos na população geral, com incidência cumulativa de 14% aos 40 anos). Desta forma, o risco de desenvolvimento de neoplasias hematológicas e não hematológicas é de 33% e 28%, respectivamente, pelos 40 anos de idade (Huck, e col., 2005; Taniguchi e D'Andrea, 2006; Eiller, e col., 2008; Auerbach, 2009).

Crítérios para pesquisa diagnóstica de Anemia de Fanconi

Nos dias de hoje a AF é considerada uma doença subdiagnosticada devendo-se tal facto a três factores: a sua raridade, a sua variabilidade fenotípica e a ocorrência tardia da anemia comparativamente às outras citopenias periféricas. Como tal, o diagnóstico requer um elevado índice de suspeita e perspicácia clínica.

O RIAF, numa tentativa de minorar os efeitos negativos de um diagnóstico tardio, elaborou um algoritmo de diagnóstico assente em dois graus de suspeita, absoluta e relativa, baseados em manifestações clínicas e/ou laboratoriais (Eiller, e col., 2008) (Tabela 1).

Tabela 1: Indicações absolutas e relativas de pesquisa diagnóstica da Anemia de Fanconi (AF).

| Indicações absolutas | Indicações relativas |
|---|--|
| Irmão com AF | Citopenias únicas |
| Anemia aplásica | Macrocitose inexplicada |
| Anomalias/malformações congénitas características | Insuficiência ovárica prematura; |
| Quebras cromossómicas espontâneas | Tumor cerebral < 5 anos |
| Síndrome mielodisplásico primária (idade jovem) | Tumores hepáticos na ausência de factores de risco |
| Leucemia mieloblastica aguda primária (idade jovem) | Hemoglobina F inexplicavelmente aumentada |
| Sensibilidade aumentada à quimioterapia e à radioterapia | Tumor de Wilms < 4 anos |
| Cancro típico de AF em idade atípica, como cancro da cabeça e pescoço < 50 anos, colo do útero < 30 anos e ânus/vulva < 40 anos | Infertilidade |
| História familiar consistente com AF ou de cancro | |

Variabilidade genotípica e instabilidade genética na Anemia de Fanconi

Se a variabilidade fenotípica é grande, a variabilidade genotípica também o é. Existem 13 loci genéticos identificados causadores da AF e estima-se que sensivelmente 0,5% da população seja heterozigótica para um dos locus (Jacquemont e Taniguchi, 2007; Auerbach, 2009; Alpi e Patel, 2009; D'Andrea, 2010).

Focar-se-á agora atenção à via de reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN) subjacente à AF e às várias unidades de complexos proteicos que dela fazem parte. A integridade do material genético é permanentemente colocada em causa mediante a agressão exercida por agentes desestabilizadores do ADN. Dessa forma, existem mecanismos, capazes de controlar essas agressões por via da reparação do ADN lesado e conseqüente manutenção da sua estabilidade. As proteínas codificadas pelos genes envolvidos na AF desempenham um papel essencial nestes mecanismos de reparação, especialmente nos que induzem a formação de ligações cruzadas intercadeias. Fazem-no pela modulação de mecanismos envolvidos no rearranjo destas cadeias nomeadamente na recombinação de homólogos, na excisão de cadeias de nucleótidos interligados e ainda na síntese de novas cadeias a partir do local da lesão (Moldovan e D'Andrea, 2009).

Complexos proteicos da via da Anemia de Fanconi e reparação do ADN

A via da AF é constituída por três complexos multiproteicos que actuando por via sequencial ou independente influem nos mecanismos acima descritos (Figura 1).

O primeiro e o maior desses complexos, é composto por 10 proteínas distintas (FANCA, FANB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, AP100 e AP24) das quais mutações nos genes AP100 e AP24 não estão associadas ao fenótipo da AF. Este complexo, através da proteína FANCL, ubiquitina o complexo formado pelas proteínas FANCD2/FANCI. Duas das proteínas constituintes deste

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA
complexo – FANCM e FAAP24 – não são constitutivamente activas sendo recrutadas aquando da lesão do ADN com o objectivo de tornar mais eficiente a ubiquitinação do FANCD2 bem como localizar o complexo aos locais onde o ADN foi lesado. O complexo FANCD2/FANCI, uma vez ubiquitinado e por vias desconhecidas, desloca-se para loci cromossómicos responsáveis pela produção de estruturas reparadoras do ADN como o Rad51 (Taniguchi e D’Andrea, 2006; Patel e Joenje, 2007; Jacquemont e Taniguchi, 2007; Alpi e Patel, 2009; Moldovan e D’Andrea, 2009; D’Andrea, 2010).

Existe ainda um último complexo proteico a jusante do FANCD2 formado pelas proteínas FANCD1/FANCI/FANCN cuja actuação, se por via sequencial ou independente do complexo FANCD2/FANCI, não está completamente esclarecida. O gene FANCD1 é o mesmo que o gene supressor tumoral BRCA2, envolvido no aumento da susceptibilidade ao cancro da mama e ovário. A proteína resultante do gene BRCA2 é um mediador envolvido na formação dos nucleofilamentos Rad51 o que sugere um envolvimento ou acção sinérgica com a proteína FANCD2 (Taniguchi e D’Andrea, 2006; Patel e Joenje, 2007; Jacquemont e Taniguchi, 2007; Moldovan e D’Andrea, 2009; D’Andrea, 2010). Todavia, sugerindo uma acção por via independente do FANCD2 apresenta-se o facto de doentes com mutação do gene FANCD1 apresentarem um fenótipo de Fanconi mais grave com um risco aumentado de tumores sólidos e sanguíneos comparativamente àqueles que não possuem esta mutação (Moldovan, 2009).

A proteína FANCD2 existe em duas isoformas, uma isoforma curta não ubiquitinada (FANCD2S) com menor peso molecular (155kDa) e uma isoforma longa ubiquitinada (FANCD2L) com maior peso molecular (162kDa). Os doentes com AF expressam o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L- ou FANCD2S-/FANCD2L-, podendo também expressar o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+ no caso de a mutação ocorrer nos genes a jusante do complexo de monoubiquitinação (FANCD1/FANCI/FANCN) (Pilonetto, 2007).

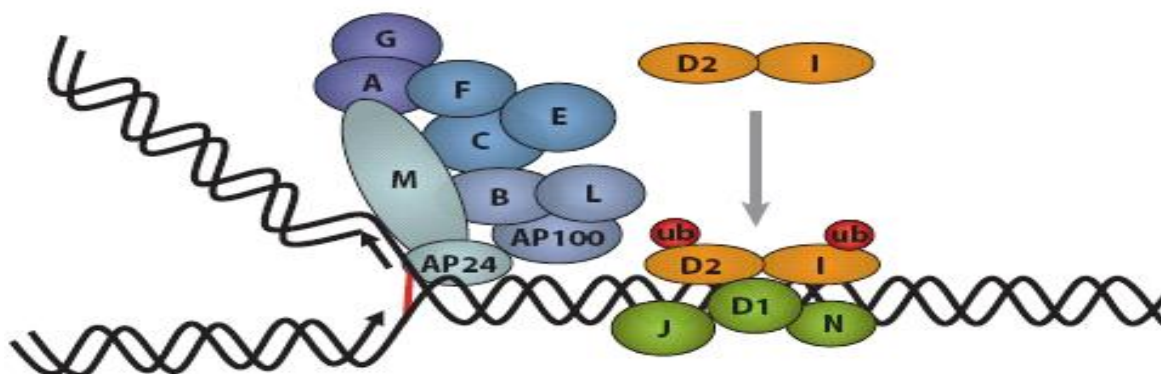


Figura 1: A via da AF protege a célula de agentes causadores de instabilidade genómica. Alterações desta via levam à aquisição de anomalias cromossómicas, com especial incidência das anomalias que se seguem à formação de ligações cruzadas intercadeias. A figura representa os complexos proteicos envolvidos na AF: FANCM e FAAP24 recrutam todo o complexo proteico primário para locais de lesão do ADN, pensando-se assim activar primariamente a via de Fanconi. Este complexo proteico primário, por outro lado, através da ligase da ubiquitina E3, FANCL, monoubiquitina a proteína FANCD2/FANCI que posteriormente se localiza em locais de ADN responsáveis pela reparação, juntamente com as proteínas FANCD1, FANCI e FANCN. Exercem assim, dependente ou independentemente, a sua acção na reparação do ADN lesado por via de vários mecanismos entre os quais a recombinação de homólogos, excisão de uma cadeia de nucleótidos e síntese de novas cadeias a partir do local de lesão (Moldovan e D’Andrea, 2009).

Diagnóstico laboratorial da Anemia de Fanconi

O diagnóstico definitivo de AF é feito com recurso à citogenética por análise da sensibilidade cromossómica dos linfócitos de sangue periférico, a agentes clastogénicos como o DEB ou MMC, considerado actualmente o método padrão para o diagnóstico de AF (Taniguchi and D’Andrea, 2006; Eiller, e col., 2008; Auerbach, 2009). Todavia, em 10-20% dos casos podem ocorrer resultados falsos-negativos e numa percentagem inferior a 1% dos casos, resultados falsos-positivos (Eiller, e col., 2008). Se estes últimos se devem a doenças raras com instabilidade cromossómica sensíveis aos clastogénios utilizados, os primeiros

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA
devem alertar para a presença de mosaicismos somáticos (presença simultânea de linhagens celulares normais e anormais no sangue periférico) nos doentes em estudo (Auerbach, 2009). Nestas situações, e caso a suspeita clínica seja elevada, o recurso a fibroblastos obtidos por biópsia cutânea constitui-se como o teste de diagnóstico definitivo (Eiller, e col., 2008).

Outras abordagens laboratoriais possíveis são a detecção da paragem do ciclo celular na fase G2/M por citometria de fluxo, a análise genética dos grupos de complementação por via da sequenciação genética (FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FANCN) ou ainda a detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de Western Blot (WB) (Pilonetto, 2007, Eiller, e col., 2008), que será um dos objectos de estudo deste trabalho.

O diagnóstico laboratorial por meio da detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de WB é, por comparação com o método padrão de diagnóstico de AF (sensibilidade cromossómica ao DEB ou MMC), mais rápido, menos laborioso e menos dispendioso. Estudos prévios mostram uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 100%, quando comparado este método com o método padrão de diagnóstico de AF (Pilonetto, 2007). Crê-se, pois, pela reunião das características acima apresentadas que seja um excelente método de rastreio da AF.

Tratamento da Anemia de Fanconi

O tratamento da anemia de Fanconi é fundamentalmente orientado para a prevenção das complicações da doença e para o alívio dos sintomas, todavia optimizado consoante a precocidade do diagnóstico. As anormalidades passíveis de serem corrigidas cirurgicamente devem sê-lo o mais cedo possível, idealmente antes da ocorrência de citopenias periféricas devido ao pior prognóstico daí resultante (Eiller, e col., 2008) (daí a necessidade do diagnóstico precoce). Todavia, o grande vector do tratamento da AF passa pelo tratamento das complicações hematológicas decorrentes da doença, nomeadamente a insuficiência medular e/ou neoplasias associadas.

O transplante de medula óssea permanece ainda como o grande vector do tratamento, apesar das hipóteses alternativas como a terapêutica com androgénios e/ou citocinas. Discute-se hoje, com grande ênfase, a hipótese do tratamento precoce, ou seja, o transplante de medula óssea antes da ocorrência de qualquer citopenia em crianças diagnosticadas com AF devido aos óptimos resultados terapêuticos obtidos (Eiller, e col., 2008). Contudo, submeter o doente a um regime terapêutico altamente agressivo, com taxas de mortalidade significativas, e cuja necessidade não é absoluta gera problemas éticos que dificultam a implementação efectiva desta modalidade terapêutica.

Todavia, o tratamento hematológico não elimina as consequências não hematológicas da doença. Como tal, a vigilância e prevenção, particularmente premente no caso do cancro, é uma arma importante no tratamento da AF (Eiller, e col., 2008).

Encontram-se em fase de ensaio várias modalidades terapêuticas para a AF. Será porventura mais relevante sublinhar a importância do estudo e da investigação da AF pelo que esta representa no estudo do cancro. A provar isso mesmo está o facto de um dos genes causadores da AF – FANCD1 – ser um dos genes que confere susceptibilidade ao cancro da mama – BRCA2 – provando a existência de vias comuns a estas duas entidades (Moldovan e D’Andrea, 2009). Daí que, nos dias de hoje, a investigação em torno da AF ultrapasse o âmbito do conhecimento e tratamento da doença. Ao investigar a instabilidade cromossómica e susceptibilidade acrescida ao cancro estamos não só a investigar a fisiopatologia do cancro bem como no enalço de novos alvos terapêuticos mais eficazes no tratamento desta doença.

Em resumo, abordamos as linhas gerais da apresentação clínica dos doentes com AF, sublinhando a necessidade de se estar atento e desperto para o diagnóstico, e apresentamos as bases moleculares da doença, com especial referência à instabilidade genética e ao papel dos complexos multiproteicos da via da AF. Pretendeu-se, assim, criar um conjunto básico de conhecimentos que possa servir de base ao trabalho de investigação em curso.

Enquadramento e justificação do estudo

Este estudo enquadrou-se primariamente no âmbito de uma necessidade de pesquisa epidemiológica com relação à imperiosidade de caracterizar com rigor a população de doentes com AF existente no contexto da região Norte de Portugal.

A necessidade desta caracterização epidemiológica assenta sobretudo na visão clara que os médicos participantes neste estudo têm de que a AF é uma doença subdiagnosticada – por várias razões – e que a única forma de combater este problema será por via da sua divulgação. ‘Só se nós pensarmos neste diagnóstico é que o faremos’, era nas palavras do Dr. José Barbot a grande motivação para a realização deste estudo. Tanto que se observou que após divulgação da doença em acções de formação específicas em alguns hospitais distritais da região Norte o número de diagnósticos aumentou tendo sido o ano de 2010 especialmente fértil em novos diagnósticos de AF.

Nesse sentido, e tendo em conta que o diagnóstico é moroso e dispendioso não faria sentido ficar por aqui. E por isso este estudo/trabalho de investigação avançou – com inestimável empenho do Dr. José Barbot novamente – no sentido de se operacionalizar uma técnica de diagnóstico de AF que possa servir de base a um rastreio da doença. Uma técnica que possa ser mais rápida e mais económica e que esteja disponível em todo o país. E é nesse âmbito que surge a bioquímica com recurso a Western Blot para a pesquisa da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 como a solução para este problema.

Para finalizar e a longo-prazo este estudo pretende igualmente sensibilizar a mobilizar esforços a nível local e nacional para que se criem centros de referência de AF com equipas treinadas no diagnóstico e tratamento da doença de forma a poder oferecer a estes doentes – que se crêem ser muitos mais do que os actualmente diagnosticados – os melhores cuidados e os melhores tratamentos.

Espera-se, pois, que resulte deste estudo/trabalho de investigação uma nova forma e mais actualizada de ver a AF, um conhecimento mais rigoroso e verdadeiro da sua epidemiologia e ainda uma nova técnica disponível em Portugal para o seu diagnóstico e, sobretudo, rastreio.

Este Trabalho Académico de Investigação, com vista à dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, surge enquadrado nas actividades da UHP do HMP/CHP e do LCG do ICBAS/UP.

A UHP do HMP/CHP, cujo Responsável e grande entusiasta deste estudo, é o Dr. José Barbot será porventura a unidade pediátrica portuguesa com maior experiência e conhecimento em AF com uma casuística de algumas dezenas de casos ao longo dos últimos anos e que actualmente tem em consulta doze crianças em follow-up das quais três aguardam transplante de medula óssea.

O LCG do ICBAS, da qual é responsável a Prof^a. Beatriz Porto, é o principal laboratório de referência a nível nacional no diagnóstico de AF com um número total de casos diagnosticados, por via da análises de quebras cromossómicas utilizando o DEB, que ultrapassará os cinquenta casos.

Problemas

Como grandes problemas identificados para este estudo encontram-se:

1. subdiagnóstico da doença com uma casuística provavelmente subavaliada;
2. inexistência de protocolos de registo de dados clínicos padronizados ou protocolos de follow-up uniformes entre os doentes;
3. inexistência no país de laboratórios que se dediquem ao diagnóstico por biologia molecular da AF por via da monoubiquitinização da proteína FANCD2.

Questões

Definem-se, então, duas questões a investigar:

- a) Quais as principais manifestações clínicas e laboratoriais dos doentes com AF seguidos no CHP?

b) A detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de WB poderá ser usada com vantagem no rastreio da AF, de forma a contribuir diagnóstico atempado da doença?

Hipóteses de trabalho

- a) As manifestações clínicas e laboratoriais dos doentes com AF seguidos no CHP são idênticas às descritas na literatura;
- b) A detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de WB pode ser usada com vantagem como teste de rastreio da AF.

Objectivos do estudo

Constituem-se, como objectivos deste trabalho de investigação, os seguintes:

- a) Fazer uma revisão sistemática de casos de doentes com AF em seguimento no CHP criando para o efeito, e fazendo uso subsequente, de uma tabela de recolha de dados clínicos e laboratoriais, desenvolvida no âmbito deste projecto;
- b) Documentar a sensibilidade e especificidade da detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de WB, como meio de diagnóstico laboratorial da AF, por comparação com os meios convencionais de diagnóstico da doença.

Desenho do estudo

Fases do estudo

O estudo será desenvolvido em duas fases, que visam dar resposta aos objectivos propostos:

- a) Na 1ª fase será efectuada a revisão casuística dos doentes com AF seguidos no CHP.
- b) A 2ª fase consistirá na detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2.

Tipo de estudo

1ª Fase: Estudo de série (revisão casuística) – Estudo nacional e institucional, observacional, de carácter descritivo, retrospectivo, de natureza clínica.

2ª Fase: Estudo laboratorial – Estudo nacional e institucional, observacional de carácter analítico, transversal, de tipo caso-controlo e de natureza laboratorial.

Universo, população e amostra

Universo

Doentes com AF

População

Doentes com AF seguidos na Consulta de Hematologia Pediátrica do HMP/CHP (crianças) ou na Consulta de Hematologia Clínica do HSA/CHP (adultos).

Estimamos que sejam seguidos, actualmente, nestas consultas cerca de 20 doentes com AF.

Amostra

- Na 1ª fase do estudo pretendemos incluir todos os doentes seguidos nas consultas de Hematologia do CHP pelo que, se possível, a amostra coincidirá com a população alvo.
- Na 2ª fase pretendemos incluir o número máximo de doentes seguidos nas consultas de Hematologia do CHP que aceitem participar e a que for possível colher uma amostra de sangue.

Seleccção dos participantes e critérios de elegibilidade

A selecção será não probabilística (de conveniência).

1ª fase do estudo – Revisão casuística

Na 1ª fase do estudo (revisão casuística) serão incluídos os doentes com AF que preencham os seguintes critérios:

Critérios de inclusão

Ser ou ter sido seguido na Consulta de Hematologia Pediátrica do HMP/CHP (crianças) ou na consulta de Hematologia Clínica do HSA/CHP (adultos);

Ter diagnóstico de AF comprovado citogeneticamente por hipersensibilidade a agentes clastogénicos como o DEB ou a MMC ou possuir fenótipo ‘*Fanconi-like*’ mesmo na ausência de diagnóstico citogenético.

Critérios de exclusão

Inexistência de processo clínico acessível para consulta ou dados insuficientes no processo clínico.

2ª fase do estudo – Estudo laboratorial

Para a 2ª fase do estudo (detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2) serão recrutados os doentes incluídos na 1ª fase que preencham os seguintes critérios:

Critérios de inclusão

Concordar em participar no estudo, mediante assinatura de termo de consentimento informado, pelo próprio (adultos), ou pelos seus representantes legais (crianças).

Critérios de exclusão

Não reunir condições para colheita de amostra de sangue durante o período de tempo de execução do estudo (em consulta programada ou em deslocação ao Hospital para o efeito).

Intervenientes no projecto

Instituições, Departamentos e Serviços

- Centro Hospitalar do Porto (CHP)
 - Hospital Maria Pia (HMP)
 - Unidade de Hematologia Pediátrica (UHP)
 - Hospital de Santo António (HSA)
 - Departamento de Medicina (DM)
 - Serviço de Hematologia Clínica (SHC)
- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto (UP), (ICBAS/UP)
 - Departamento de Microscopia (DMI)
 - Laboratório de Citogenética (LCG)
 - Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia (DIFF)
 - Laboratório de Imunologia (LI)

Equipa de Investigação

Constituição

Aluno

- João Silva: Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP

Orientadores

- Dr. José Barbot: Médico, Hematologista, Chefe de Serviço, Responsável pela UHP do HMP/CHP (Orientador).

- Prof. Doutora Beatriz Porto: Professora Auxiliar do ICBAS/UP, Responsável pelo LCG do ICBAS/UP (Co-Orientadora).

Supervisores

- Prof. Doutora Margarida Lima: Médica, Imunohemoterapeuta, Assistente Hospitalar Graduada do SHC do HSA/CHP; Professora Convidada do ICBAS/UP; Regente da DIIC.

Outros investigadores

- Dr. Jorge Coutinho, Hematologista, Chefe de Serviço de Hematologia Clínica, Director do SHC no HSA/CHP. Professor Auxiliar Convidado do ICBAS-UP.
- Dr^a. Vanessa Magalhães, Mestre em Imunologia Clínica, aluna de doutoramento do LI do ICBAS/UP.
- Dr^a. Cristina Gonçalves, Hematologista, Assistente Hospitalar de Hematologia Clínica do SHC do HSA/CHP.
- Dr^a. Renata Cabral, Médica Interna de Hematologia Clínica do SHC do HSA/CHP.

Funções e responsabilidades

- A concepção e elaboração da proposta e a execução do projecto são da responsabilidade do Aluno;
- Os Orientadores acompanharão o aluno na elaboração de proposta, na execução do projecto e na análise e interpretação dos resultados;
- A Regente da DIIC supervisionará todas as fases do projecto, desde a sua concepção até à apresentação dos resultados, passando pela sua execução e análise/interpretação dos dados;
- Os restantes investigadores colaborarão em aspectos específicos do projecto, conforme especificado mais adiante.

Tempo dedicado ao projecto

- Total: 5,05 pessoas*mês
- Aluno: 10% durante 22 meses ($1 \times 0,10 \times 22 = 2,20$ pessoas*mês)
- Orientadores: 2,5% durante 22 meses ($2 \times 0,025 \times 22 = 1,10$ pessoas*mês)
- Supervisor: 2,5% durante 22 meses ($1 \times 0,025 \times 22 = 0,55$ pessoas*mês)
- Outros investigadores: 10% durante 3 meses ($4 \times 0,10 \times 3 = 1,20$ pessoas*mês)

Plano de trabalho

Apresentam-se, de seguida as principais tarefas associadas ao projecto:

Tarefas associadas ao projecto

Durante a execução do projecto estão previstas as seguintes tarefas:

Tarefa 1

Informação e solicitação de participação no estudo (01-09 a 30-09-2011)

Tarefa 2

Revisão dos casos de AF seguidos no CHP (revisão da casuística) (01-09 a 31-12-2011)

Tarefa 3

Consentimento informado e colheita de amostras (01-10 a 31-12-2011)

Tarefa 4

Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 (01-01 a 31-03-2012)

Tarefa 1 – Informação e solicitação de participação no estudo

- Duração:
1 mês
- Datas previstas para o início e conclusão:
01-09-2011 a 30-09-2011
- Instituições, Departamentos e Serviços:
HMP/CHP – CMIN – UHP
HSA/CHP – DM – SHC
- Investigadores:
José Barbot; Jorge Coutinho; Cristina Gonçalves; Renata Cabral.
- Objectivos:
Identificar os casos de AF seguidos no CHP e os respectivos médicos assistentes.
Informar os doentes sobre o estudo e solicitar a sua participação.
- Descrição:
 - i. Os doentes (ou os seus responsáveis legais) serão contactados por telefone pelos seus médicos que informarão sobre o estudo e solicitarão a sua participação;
 - ii. Os doentes que concordarem em participar deslocar-se-ão ao hospital na data prevista para a consulta ou, caso se considere necessário e de comum acordo, noutra data a combinar;
 - iii. No caso de ser necessária a deslocação fora dos dias de consulta programada será oferecido ao doente o pagamento dos transportes, mediante a entrega de comprovativo da despesa.
 - iv. Será garantida a confidencialidade dos dados.
- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades dos Investigadores

| Investigadores | Tarefas/Funções/Responsabilidades |
|---|---|
| Dr. José Barbot | Identificar os casos de AF seguidos no CHP e os respectivos médicos assistentes. Combinar com os médicos responsáveis pelos doentes o procedimento a adoptar |
| Dr. Jorge Coutinho Dr. ^a . Cristina Gonçalves Dr. ^a . Renata Cabral | Contactar respectivos doentes, informar sobre o estudo e solicitar a participação |

Tarefa 2 – Revisão dos casos de AF seguidos no CHP

- Duração prevista:
4 meses
- Datas previstas para o início e conclusão:
01-09-2011 a 31-12-2011
- Instituições, Departamentos e Serviços:
HMP/CHP – CMIN – UHP
HSA/CHP – DM – SHC
- Investigadores:
José Barbot; Jorge Coutinho; Cristina Gonçalves; Renata Cabral; João Silva.
- Objectivos:
Fazer uma revisão sistematizada dos casos de doentes com AF seguidos no CHP criando para o efeito, e fazendo uso subsequente, de uma tabela de recolha de dados clínicos e laboratoriais, desenvolvida no âmbito deste projecto.
- Descrição:
 - i. Os dados a serem colhidos serão registados em dois formulários, enviados em anexo. Um, que funciona como uma ‘checklist’ onde se encontram todos os dados passíveis de serem recolhidos (Anexo 1) e outro, onde se procederá ao registo mais organizado e facilitado dos

dados anteriormente referidos (Anexo 2). De notar que tal procedimento se justifica pelo facto dos doentes apresentarem somente alguns dos sinais/sintomas listados e mesmo uma parte significativa deles provavelmente não se encontrará registada no processo clínico.

- ii. A recolha dos dados constantes dos processos clínicos será feita no HMP e HSA, em gabinetes disponibilizados para esse efeito.
- iii. Durante a recolha dos dados só estarão nos gabinetes o aluno e o orientador ou médico-assistente (se necessário) de forma a salvaguardar a informação constante dos registos clínicos.

- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

| Investigador | Tarefas/Funções/Responsabilidades |
|---|--|
| Dr. José Barbot | Assumir a responsabilidade e supervisionar a recolha dos dados. |
| Dr. Jorge Coutinho Dr ^a . Cristina Gonçalves Dr ^a . Renata Cabral | Supervisionar a recolha de dados dos seus doentes. |
| João Silva | Proceder à recolha dos dados relevantes constantes dos processos clínicos dos doentes com AF seguidos e tratados no CHP. Sistematizar a informação recolhida no formulário individual, onde constará a forma de apresentação da doença, o quadro das suas malformações congénitas e ainda os episódios relevantes que ocorreram entre o diagnóstico e o último registo. Fazer a análise estatística dos dados. |

Tarefa 3 – Consentimento informado e colheita de amostras

- Duração prevista:

3 meses

- Datas previstas para o início e conclusão:

01-10-2011 a 31-12-2011

- Instituições, Departamentos e Serviços:

HMP/CHP – CMIN – UHP e HSA/CHP – DM – SHC

- Investigadores:

José Barbot; Jorge Coutinho; Cristina Gonçalves; Renata Cabral.

- Outros colaboradores:

Enfermeiros da Consulta de Hematologia e dos Dadores de Sangue do SHC do HSA/CHP.

- Objectivo:

Obter o consentimento informado escrito dos doentes (ou dos seus responsáveis legais) e dos controlos e proceder à colheita de amostras de sangue com vista à detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de WB.

- Descrição:

- i. Doentes: Na data prevista, os doentes deslocar-se-ão ao Hospital e assinarão os termos de consentimento informado. Nesse dia, será efectuada a colheita da amostra de sangue (1 tubo com anticoagulante – heparina ou citrato de sódio, com 4 ou 8 ml de sangue). O procedimento não acarreta riscos, para além dos associados à punção venosa.
- ii. Controlos: Em dia específico a combinar, o aluno deslocar-se-á ao sector dos Dadores de Sangue SHC do HSA/CHP. Os dadores de sangue serão informados pelo médico de serviço, que apresentará o aluno. O aluno informará sobre o estudo e solicitará a participação e a assinatura do consentimento informado. As Enfermeiras dos Dadores de Sangue procederão à colheita.
- iii. As amostras de sangue serão imediatamente transportadas (contentor apropriado) para o LCG do ICBAS/UP, ao cuidado da Prof^a. Dr^a. Beatriz Porto.

- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

| Grupo | Investigador ou Colaborador | Tarefas/Funções/Responsabilidades |
|-------------------------------|-----------------------------|--|
| Doentes (Consulta) | Médicos responsáveis | Informação sobre o estudo, solicitação de participação e assinatura do consentimento informado |
| | Enfermeiras | Colheita das amostras de sangue Requisição de transporte |
| | Mensageiros | Transporte das amostras para o LCG do ICBAS/UP |
| Controlos (Dadores de Sangue) | Médico de serviço | Apresentação do estudo e do aluno |
| | João Silva | Informação sobre o estudo, solicitação de participação e assinatura do consentimento |
| | Enfermeiras | Colheita das amostras de sangue |
| | João Silva | Transporte das amostras para o LCG do ICBAS/UP |

Tarefa 4 – Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2

- Duração prevista:

3 meses

- Datas previstas para o início e conclusão:

01-01-2012 a 31-03-2012

- Instituições, Departamentos e Serviços

ICBAS/UP – DM – LCG

ICBAS/UP – DIFF – LI

- Investigadores:

Beatriz Porto; Vanessa Magalhães; João Silva.

- Objectivos:

Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de WB, como meio de diagnóstico laboratorial da AF, por comparação com os meios convencionais de diagnóstico da doença.

- Descrição:

- i. As amostras de sangue dos doentes e controlos serão recebidas no LCG do ICBAS/UP.
- ii. Nesse laboratório será efectuado o seu processamento inicial (separação de células mononucleadas, preparação dos lisados celulares).
- iii. As amostras processadas serão congeladas e posteriormente enviadas ao LI do ICBAS/UP.
- iv. Nesse laboratório será efectuado o procedimento final das amostras com vista à detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de WB.

- Distribuição de tarefas, funções e responsabilidades:

| Investigador | Tarefas/Funções/Responsabilidades |
|---|---|
| Prof ^a . Doutora Beatriz Porto | Coordenação e supervisão dos procedimentos inerentes ao processamento técnico das amostras e da interpretação dos resultados |
| Prof ^a . Doutora Beatriz Porto | Recepção das amostras Processamento inicial das amostras (separação de células mononucleadas, preparação dos lisados celulares, obtenção das soluções de proteínas) Criopreservação das soluções de proteínas |
| Dr ^a . Vanessa Magalhães | Optimização dos procedimentos técnicos para detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 pelo método de WB |
| Dr ^a . Vanessa Magalhães | Separação das proteínas por SDS/PAGE Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 por WB |
| João Silva | Colaboração em todas as tarefas acima discriminadas |

Material e métodos

1ª fase do estudo – Revisão casuística

Instrumentos de recolha de dados

No estudo serão usados, como instrumentos de recolha de dados, os formulários de recolha de dados clínicos e laboratoriais enviados em anexo.

2ª fase do estudo – Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2

Procedimentos técnicos

A forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 será detectada pelo método de WB, em linfócitos do sangue periférico após estimulação com fitohemaglutinina em cultura primária.

Fundamento teórico

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, leva a uma falha no mecanismo de reparação do ADN e conseqüentemente à expressão fenotípica de muitas das características observadas na AF. A ausência da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 correlaciona-se com o diagnóstico de AF por ser uma característica específica desta doença quando associado à clínica e aos testes de quebras cromossómicas, permitindo uma melhor caracterização da doença. Também facilita a detecção da reversão somática no sangue periférico e a definição dos casos de mosaicismo pela análise de fibroblastos da pele. Noutras doenças hereditárias com falência medular e (ou) síndromes de instabilidade cromossómica, a monoubiquitinação da FANCD2 está preservada e a isoforma FANCD2L é normalmente expressa.

Método

Colheita de sangue e isolamento de células mononucleadas:

O sangue periférico será colhido em tubo de vidro com vácuo tipo "CPT" que já contém anticoagulante (citrato de sódio ou heparina sódica) e gradiente de densidade de 1.077 (tipo Ficoll-Hypaque), separados por uma barreira de gel de poliéster, que permite simultaneamente a colheita de sangue e a separação das células mononucleadas por centrifugação.

Alternativamente, o procedimento será efectuado a dois tempos: colheita de sangue em tubo de vidro com vácuo contendo apenas anticoagulante (citrato de sódio ou heparina sódica), seguida de separação das células mononucleadas, por centrifugação, em tubo com gradiente com densidade de 1.077 tipo Ficoll-Hypaque (Lymphoprep ou similar).

Cultura primária

As células mononucleadas assim isoladas serão cultivadas, com concentração de 1,0 a 2,0 x 10⁶ células/ml, por 72 horas, em culturas primárias incubadas a 37°C com uma tensão de 5% de CO₂.

O meio de cultura será o RPMI 1640 completo, suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1% de solução de antibióticos (penicilina/ estreptomina), 2mM de L-glutamina.

Para estímulo da proliferação, será utilizada fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 50 ug/mL.

Após 72 horas, as células serão retiradas com auxílio de uma espátula apropriada (*scraper*), lavadas em tampão salino/fosfato (PBS) por centrifugação a 1.500 rpm, 10 min, a 4°C, suspensas em PBS e contadas em câmara de Neubauer.

Preparação dos lisados celulares / soluções de proteínas:

As células serão lisadas em tampão RIPA+PI. A proporção entre o tampão RIPA+PI e o número de células será de 10 a 50 µl de RIPA+PI para cada 10⁶ células. Após a lise, o sobrenadante será mantido em gelo até à determinação da concentração de proteínas totais num espectrofotómetro. Para tal, será utilizado o método descrito por Bradford (1976), que consiste na adição de um corante ácido do tipo azul de Coomassie

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA
à solução de proteínas e na medida da absorvância em um espectrofotómetro a 595nm. As medidas obtidas serão comparadas com os valores de uma curva padrão. Lisados contendo 100 ug de proteína total serão preparados em tampão de Laemmli aquecido a 96°C por 5 min e submetidos à electroforese ou armazenados a -80°C.

Electroforese em gel de SDS/PAGE:

A separação das proteínas será feita por meio de uma electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) a 7% (SDS/PAGE).

Transferência das proteínas para membrana de nifrocelulose:

As proteínas separadas serão transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência. Após cerca de 3 horas de transferência, será realizada a coloração com Ponceau S, que é uma coloração reversível com a finalidade de controlo da transferência, que permitirá detectar se houve degradação da proteína que está a ser transferida ou não. Os sítios inespecíficos de ligação da membrana serão bloqueados com solução de 5% de caseína em TBS-T durante 15 a 18 h a 4°C.

Detecção da proteína FANCD2 e da forma monoubiquitinada:

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas separadas por SDS/PAGE de acordo com seus pesos moleculares serão incubadas com o anticorpo monoclonal de ratinho, dirigido contra a porção N-terminal da proteína FANCD2 humana (FII17, Santa Cruz - Califórnia, EUA), que permitirá a detectar a presença ou ausência das duas isoformas da proteína FANCD2, a FANCD2S (155kDa), que não é ubiquitinada, e a FANCD2L, que é monoubiquitinada (162 kDa). A diluição para uso deste anticorpo será 1:200. As membranas serão lavadas e incubadas com anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina (*goat anti-mouse IgG (H+L)*, *Southern Biotechnology Associates*). Esse anticorpo secundário de cabra anti-ratinho será utilizado numa diluição de 1:2000. A detecção foi feita usando uma solução de NBT /BCIP (Promega) em Tampão AP (0.01 M Tris, 0.01 M NaCl, 0.5 mM MgCl₂ (pH 9.5).

Interpretação:

O padrão de bandas das isoformas da proteína FANCD2 permite classificar os doentes em três fenótipos, de acordo com a fase do mecanismo AF/BRCA que se encontra alterado.

Normais (controlos): fenótipo FANCD2S+/ FANCD2L+

Doentes com AF: fenótipo FANCD2S+/FANCD2L- ou, mais raramente, FANCD2S-/FANCD2L- ou FANCD2S+/FANCD2L+.

Equipamento, material e reagentes

Equipamento

Será usado o equipamento disponível no LCG e no LI do ICBAS/UP

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| Grande equipamento | |
| | Frigorífico |
| | Arca congeladora -80°C |
| | Centrífuga refrigerada |
| | Câmara estéril |
| | Estufa CO ₂ 37°C |
| | Espectrofotómetro |
| | Equipamento para electroforese |
| Pequeno equipamento | |
| | Câmara de Neubauer |
| | Micropipetas automáticas |
| | <i>Scraper</i> |

Reagentes e material consumível

| Finalidade | Descrição | Fabricante | Referência |
|-----------------------------|---|---------------------|------------|
| Colheita de sangue | Tubos de colheita CPT, citrato sódio, 8 ml | BD Biosciences | 362782 |
| | Tubos de colheita CPT, citrato sódio, 4 ml | BD Biosciences | 362781 |
| Lavagem de células | Tampão fosfato-salino (PBS) | Sigma | P5368 |
| Culturas celulares | Meio de cultura RPMI160 | Sigma | R5886 |
| | Soro bovino fetal | Sigma | F9665 |
| | L-Glutamina | Sigma | G7513 |
| | Penicilina / estreptomicina | Sigma | P0781 |
| | Fitohemaglutinina (PHA) | Sigma | L1668 |
| Lisados celulares (*) | Tris HCl | Sigma | T87602 |
| | NaCl | Sigma | S7653 |
| | NP-40 | Sigma | NP-40S |
| | Desoxicolato de sódio | Sigma | D6750 |
| | Pirofosfato de sódio | Sigma | 221368 |
| | EDTA | Sigma | EDS |
| | Pepstatina | Sigma | P8340 |
| | Fenilmetilsulfonilfluorida | Sigma | P8340 |
| | Ortovanadaíto de sódio | Sigma | P5726 |
| | Fluoreto de sódio | Sigma | P5726 |
| | Azul de Commasie | Sigma | 210579 |
| Electroforese (SDS/ (*) | Tris | Sigma | T87602 |
| | Mercaptoetanol | Sigma | M7154 |
| | SDS | Sigma | 08091 |
| Western-Blot (*) | Tris-HCl | Sigma | T87602 |
| | NaCl | Sigma | S7653 |
| | Tween 20 | Sigma | P9416 |
| | Ponceau S | Sigma | 7837 |
| | Solução NBT/BCIP | Sigma | 72091 |
| | Cloreto de magnésio | Sigma | M1028 |
| | Anticorpo primário anti-FANC2 (ratinho anti-humano, clone FI17) | Santa Cruz | sc-20022 |
| | Anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina | Southern Biotech | 1010-04 |
| Material consumível diverso | Tubos de cultura 14 ml | Sigma | Z617830 |
| | Tubos de 15 ml | Sigma | CLS430055 |
| | Pipetas Pasteur | Sigma | CLS7095D5X |
| | Pontas para pipetas | Sigma | Z111589 |

Soluções e tampões de preparação extemporânea

| Soluções e tampões | Finalidade | Composição |
|-----------------------------------|---|--|
| Tampão RIPA modificado (M-RIPA) | Preparação dos lisados celulares | 50mM de Tris HCl, 1% de NP-40, 0,1% de desoxicolato de sódio, 150mM de NaCl, 10mM de pirofosfato de sódio, 4mM de EDTA |
| Solução de lise RIPA+PI | | M-RIPA acrescido de: - Inibidores de proteases: 1g/ml de pepstatina e leupeptina, 2g/ml de aprotinina e 1 mM de fenilmetilsulfonilfluorida [PMSF] - Inibidores de fosfatases: 1mM de ortovanadaio de sódio e 10mM de fluoreto de sódio |
| Tampão Laemmli | Separação das proteínas por electroforese (SDS-PAGE) | 50 mM de Tris [pH 6,8], 86 mM de 2 mercaptoetanol, 2% de SDS |
| Tampão de transferência | Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (WB) | 25mM de Tris base, 200mM de glicina, 20% de metanol |
| Solução de 5% de caseína em TBS-T | Bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação da membrana (WB) | 50mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 0,1% de Tween 20 |
| Tampão AP | Detecção da proteína FANCD2 no gel de electroforese. | 0.01 M de Tris, 0.01 M de NaCl, 0.5 mM de MgCl ₂ (pH 9.5) |

Calendarização**Duração**

Global: 22 meses

Execução: 8 meses

Datas de início e conclusão

Global: Outubro de 2010 a Julho de 2012

Execução: Agosto de 2011 a Março de 2012

Cronograma de execução

| ANO | 2010 | | | 2011 | | | | | | | | | | | | 2012 | | | | | | | | |
|---|------|----|----|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|----|----|----|----|----|----|----|---|
| | Mês | 10 | 11 | 12 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | |
| Escolha do tema e do assunto | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identificação dos problemas/questões | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Revisão bibliográfica/concepção do estudo | x | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Elaboração do proposta de projecto | | | | | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Submissão à aprovação | | | | | | | | | x | x | | | | | | | | | | | | | | |
| Apresentação da proposta | | | | | | | | | | x | x | | | | | | | | | | | | | |
| Execução do projecto | | | | | | | | | | | | x | x | x | x | x | x | x | x | | | | | |
| Análise dos resultados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | x | x | | |
| Apresentação dos resultados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x |
| Provas de dissertação do MIM | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x |

Indicadores de produção**Comunicações orais e posters**

- Apresentação oral da proposta em reunião conjunta do SHC do HSA/CHP, da UHP do HMP/CHP e dos LCG e LI do ICBAS/UP (Maio / Junho de 2011)
- Apresentação oral da proposta nas 3ª JIIC (Junho / Julho de 2011)
- Apresentação oral dos resultados nas 4ª JIIC (Junho / Julho 2012)
- Apresentação dos resultados em poster, em reuniões científicas da especialidade médica (ex. Sociedade Portuguesa de Hematologia) (2012)

Trabalhos escritos

- Proposta de projecto de investigação (2011)
- Dissertação de MIM (2012)
- Artigo para publicação em revista médica nacional ou internacional com arbitragem científica (2012)

Referências bibliográficas

1. Alpi, A.F., Patel, K.J., 2009. Monoubiquitylation in the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *DNA repair*, 8, pp.430-35
2. Auerbach, A. D., 2009. Fanconi Anemia and its diagnosis. *Mutation Research*, 668, pp.4-10.
3. Callén, E. e col., 2005. A common founder mutation in *FANCA* underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood*, 105, pp.1946-49.
4. D'Andrea, A. D., 2010. Susceptibility pathways in Fanconi's Anemia and breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 362 (20), pp.1909-19.
5. Eiler, M.E. e col., 2008. Fanconi Anemia. Guidelines for diagnosis and management. 3rd edition. Oregon. Fanconi Anemia Research Fund, Inc.
6. Huck, K. e col., 2005. Delayed diagnosis and complications of Fanconi anaemia at advanced age – a paradigm. *British Journal of Haematology*, 133, pp.188-97.
7. Jacquemont, C., Taniguchi, T., 2007. The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochemistry*, [e-journal] 8(Suppl 1), Available through: BioMed Central [Accessed 3 November 2010]
8. Moldovan, G., D'Andrea, A. D., 2009. How the Fanconi Anemia pathway guards the genome. *Annual Review Genetic*, 43, pp.223-49.
9. Patel, K.J., Joenje, H., 2007. Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA repair*, 6, pp. 885-90.
10. Pilonetto, D. V., 2007. Diagnóstico laboratorial de anemia de Fanconi: análise da via de interação das proteínas AF/BRCA por meio da detecção da proteína FANCD2 e da sua forma monoubiquitinada pelo método de Western Blot. MD. Universidade Federal do Paraná. (disponível em <http://dspace.c3sl.ufpr.br/>)
11. Porto, B., e col. (*in press*), 2010. Anemia de Fanconi: diagnóstico citogenético de 40 casos. *Acta Médica Portuguesa*. (Accepted for publication November 2010)
12. Taniguchi, T., D'Andrea, A. D., 2006. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood*, 107, pp.4223-33.

PLANO FINANCEIRO

Orçamento

Não serão efectuadas consultas, internamentos, exames ou análises no CHP, pelo que não haverá despesas para esta instituição.

Todos os procedimentos laboratoriais serão efectuados no ICBAS/UP.

| | Custo estimado (€) |
|--|--------------------|
| Reagentes e material consumível de laboratório | 554,50 |
| Material administrativo (fotocópias, folhas, etc) | 50,00 |
| Pagamento de despesas aos participantes (deslocações) | 150,00 |
| Impressão de poster para apresentação de resultados | 50,00 |
| Inscrição aluno em congresso médico | 200,00 |
| Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica | 50,00 |
| TOTAL | €1054,50 |

| Finalidade | Descrição | Fabricante | Referência | Preço unitário euros | Nº Unidades | Preço euros | Subtotal |
|-------------------|---|------------------|------------|----------------------|-------------|--------------|----------------|
| Lisados celulares | NP – 40 | Sigma | NP-40S | 27,50€ | 1 | 27,50€ | 158,50€ |
| | Desoxicolato de sódio | Sigma | D6750 | 28,80€ | 1 | 28,80€ | |
| | Pirofosfato de sódio | Sigma | 221368 | 38,80€ | 1 | 38,80€ | |
| | Inibidores das fosfatases | Sigma | P5726 | 64,40€ | 1 | 64,40€ | |
| Western-Blot | Anticorpo primário anti-FANC2 (ratinho anti-humano, clone FI17) | Santa Cruz | sc-20022 | 297€ (\$259) | 1 | 297€ (\$259) | 396€ |
| | Anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina | Southern Biotech | 1010-04 | 105€ (\$146) | 1 | 98€ (\$140) | |
| | | | | | | TOTAL | 554,50€ |

(*) Os restantes reagentes necessários serão fornecidos pelo LI e pelo LCG do ICBAS/UP.

Financiamento

O estudo será financiado pelo ICBAS/UP, através de uma bolsa atribuída à DIIC.

GLOSSÁRIO

Abreviaturas e acrónimos

AP100, proteína complexo multiproteico AF
AP24, proteína complexo multiproteico AF
CHP, Centro Hospitalar do Porto
CMIN, Centro Materno-Infantil do Norte
DEB, diepoxibutano
DIFF, Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia
DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica
DM, Departamento de Medicina do HSA/CHP
DMI, Departamento de Microscopia do ICBAS/UP
EUA, Estados Unidos da América
FANCA, proteína codificada pelo gene FANCA
FANCB, proteína codificada pelo gene FANCB
FANCC, proteína codificada pelo gene FANCC
FANCD2-L, isoforma longa (L, *long*) de alto peso molecular (162 kDa) da proteína FANCD2, obtida por ubiquitinação
FANCD2-S, isoforma curta (S, *short*) de baixo peso molecular (155 kDa) da proteína FANCD2
FANCE, proteína codificada pelo gene FANCE
FANCF, proteína codificada pelo gene FANCF
FANCG, proteína codificada pelo gene FANCG
FANCI, proteína codificada pelo gene FANCI
FANCI, proteína codificada pelo gene FANCI
FANCL, proteína codificada pelo gene FANCL
FANCM, proteína codificada pelo gene FANCM
FANCN, proteína codificada pelo gene FANCN
HMP, Hospital Maria Pia
HSA, Hospital de Santo António
ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica
LCG, Laboratório de Citogenética do ICBAS/UP
LI, Laboratório de Imunologia do ICBAS/UP
MIM, Mestrado Integrado em Medicina
MMC, mitomicina C
PBS, *phosphate buffered saline* (tampão salino/fosfato)
RIAF, Registo Internacional de Anemia de Fanconi
SDS, *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
SHC, Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP
UHL, Unidade de Hematologia Pediátrica do HMP/CHP
VACTERL, *Vertebral anomalies, Anal atresia, Cardiac abnormalities, Tracheo-Esophageal fistula, Renal anomalies and radial Limb* (anomalias vertebrais, atresia anal, anomalias cardíacas, fístula traqueo-isofágica, anomalias renais e do rádio)
WB, *Western Blot*

Termos técnicos

Ubiquitinação, processo pelo qual a ligase da ubiquitina procede à ubiquitinação de uma ou mais proteínas de um complexo uni ou multiproteico.

ANEXOS

- Formulários de recolha de dados clínicos e laboratoriais

- Termos de consentimento informado (doentes, representantes legais e dadores de sangue)
- Folhetos informativos (doentes e dadores de sangue)

- Folha de rosto de estudo de investigação

- Pedidos de autorização
- Termos de responsabilidade
- Autorizações locais

Síndrome mielodisplásico

| | |
|---|--|
| Data do diagnóstico | |
| Esquema terapêutico | |
| Quimioterapia | |
| Transplante medular c/ ou s/ quimioterapia de indução | |
| Estado actual | |

Leucemia mieloblástica aguda

| | |
|---|--|
| Data do diagnóstico | |
| Esquema terapêutico | |
| Quimioterapia | |
| Transplante medular c/ ou s/ quimioterapia de indução | |
| Estado actual | |

Leucemia linfoblástica aguda

| | |
|---------------------|--|
| Data do diagnóstico | |
| Esquema terapêutico | |
| Estado actual | |

Transfusões sanguíneas

| | |
|-------------------------------|--|
| Data (s) | |
| Ferritina | |
| Complicações excesso de ferro | |
| Terapêutica quelante do ferro | |

Alterações citogenéticas

| |
|--|
| |
|--|

MEMBROS E ESQUELETO

Malformações congénitas (membros e esqueleto)

| Presente | Ausente | Data diag |
|----------|---------|-----------|
|----------|---------|-----------|

Pequena estatura

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

Membro superior

Polegar

Ausente ou hipoplásico

| | | |
|--|--|--|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Bífido

Trifalângico

Rudimentar

Rádio

Hipoplásico

| | | |
|--|--|--|
| | | |
| | | |

Ausente

Mão

Eminência tenar hipoplásica

| | | |
|--|--|--|
| | | |
| | | |

Primeiro metacárpico ausente

Cúbito

Ausente

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

Membro inferior

Pé

Sindactilia

| | | |
|--|--|--|
| | | |
| | | |

Anomalias dos dedos

Perna

Deslocação congénita anca

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

Outras

Cabeça e maciço facial

AVALIAÇÃO OTOLÓGICA

Anomalias estruturais do ouvido

- Anomalia congénita membrana do tímpano
- Canal auditivo ausente ou não desenvolvido
- Malformação ossículos ouvido médio

| Presente | Ausente |
|----------|---------|
| | |
| | |
| | |

Perda auditiva

- Leve (25-40 dB HL)
- Moderada (41-70 dB HL)
- Grave (71-90 dB HL)
- Profunda (>90 dB HL)

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |

Uso de dispositivos auditivos

Linguagem (idade em que começou a falar)

| |
|--|
| |
|--|

Fármacos ototóxicos

- Aminoglicosídeos
- Quelantes do ferro (ex: desferoxamina)
- Agentes quimioterapêuticos (ex: cisplatina)

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |

AVALIAÇÃO CANCRO DA CABEÇA E PESCOÇO

Idade de diagnóstico

| |
|--|
| |
|--|

Sintomas de apresentação

- Lesão oral
- Dor
- Disfagia
- Odinofagia
- Perda de dentição
- Úlcera
- Massa pescoço
- Hemorragia oral
- Rouquidão

| Presente | Ausente |
|----------|---------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Segmento afectado

- Comportamento biológico do tumor
 - Metástases linfáticas precoces
 - Invasão tecidos moles precoce

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |

Tabagismo e alcoolismo associado

Desenvolvimento de outros tumores primários

Sobrevida

Terapêutica

Vacinação HPV

- Idade de vacinação
- Idade início screening regular (laringoscopia)

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |

Pele

| |
|--|
| |
|--|

AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA

Anormalidades estruturais congénitas

Puberdade tardia (aval. Endocrinológica) (idade)

Fertilidade diminuída

Idade (1º filho)

Idade (2º filho)

Idade (3º filho)

Menopausa precoce (idade)

Cancro do tracto genital inferior e ânus

Colo do útero

Vagina

Vulva

Ânus

Exame ginecológico

Idade de início

Procedimentos e datas

Vacinação HPV (idade)

Prevenção cancro da mama

Idade de início

Procedimentos realizados

| Presente | Ausente |
|----------|---------|
| | |

| |
|--|
| |
| |
| |
| |

| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| | |

| |
|--|
| |
| |
| |

| |
|--|
| |
| |

AVALIAÇÃO RENAL E UROLÓGICA

Na+

K+

Ca²⁺

PO₄³⁻

Creatinina

Ureia

Ecografia renal normal

Anomalias vesicais

Refluxo vesico-ureteral

Infecções tracto urinário

Malformações tracto urinário

| Diagnóstico | Actual |
|-------------|--------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

| Presente | Ausente |
|----------|---------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Anexo 2 - Formulário de colheita de dados (2)

| | Sintoma gerais | Medula óssea | Exame objectivo | Hemograma | | | |
|---------------------------|----------------|--------------|-----------------|-----------|----|------|------|
| | | | | Data | Hb | Plaq | Leuc |
| Nome: | | | | | | | |
| Data de nascimento: | | | | | | | |
| Nº Processo: | | | | | | | |
| Morada: | | | | | | | |
| Idade ao diagnóstico: | | | | | | | |
| Procedimento diagnóstico: | | | | | | | |

Termo de consentimento informado (Doentes)

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Eu, abaixo-assinado _____:

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a caracterizar a Anemia de Fanconi, as suas manifestações iniciais, quadro de apresentação da doença e evolução para assim melhor a compreender diagnosticar no dia-a-dia da prática clínica.

Sei que neste estudo está prevista a realização de uma revisão da casuística de doentes com Anemia de Fanconi do Centro Hospitalar do Porto (Hospital de Santo António e Hospital Maria Pia) e ainda um protocolo de investigação científica que consiste na pesquisa de uma proteína tendo-me sido explicado em que consistem e quais os seus possíveis efeitos.

Sei que neste estudo está prevista a colheita de uma amostra de sangue vai ser utilizada para fazer análises de pesquisa da presença ou ausência da proteína acima referida.

Também sei que esta análise não pode ser efectuada neste hospital e que, por isso, têm que ser realizadas noutras instituições, no caso, no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efectuada a colheita de amostra de sangue para realizar a análise que faz parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo.

Data: ___/___/_____

Assinatura

Nome do Médico Responsável.

Data: ___/___/_____

Assinatura

Termo de consentimento informado (Representantes legais)

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Eu, abaixo-assinado _____, na
qualidade de representante legal de _____,

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a caracterizar a Anemia de Fanconi, as suas manifestações iniciais, quadro de apresentação da doença e evolução para assim melhor a compreender diagnosticar no dia-a-dia da prática clínica.

Sei que neste estudo está prevista a realização de uma revisão da casuística de doentes com Anemia de Fanconi do Centro Hospitalar do Porto (Hospital de Santo António e Hospital Maria Pia) e ainda um protocolo de investigação científica que consiste na pesquisa de uma proteína tendo-me sido explicado em que consistem e quais os seus possíveis efeitos.

Sei que neste estudo está prevista a colheita de uma amostra de sangue vai ser utilizada para fazer análises de pesquisa da presença ou ausência da proteína acima referida.

Também sei que esta análise não pode ser efectuada neste hospital e que, por isso, têm que ser realizadas noutras instituições, no caso, no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a autorizar a participação ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Autorizo de livre vontade a participação daquele que legalmente represento no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efectuada a colheita de amostra de sangue para realizar a análise que faz parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Representante Legal.

Data ___/___/_____

Assinatura

Nome do Médico Responsável.

Data ___/___/_____

Assinatura

Termo de consentimento informado (Controlos, dadores de sangue)

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Eu, abaixo-assinado _____,

Fui informado de que o Estudo de Investigação acima mencionado se destina a caracterizar a Anemia de Fanconi e que são necessárias amostras de sangue de pessoas normais para comparar com os doentes estando pois previstas colheitas de sangue para fazer análises.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efectuada a colheita de amostra de sangue para realizar a análise que faz parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo.

Data ___/___/_____

Assinatura

Nome do Médico Responsável.

Data ___/___/_____

Assinatura

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Folheto informativo (Doentes)

A Anemia de Fanconi é uma doença genética que se caracteriza pela ocorrência de malformações congénitas, falência da medula óssea e susceptibilidade ao cancro. Pode manifestar-se por diminuição de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas condicionando respectivamente anemia, leucopenia e/ou trombocitopenia.

Crê-se ser uma doença subdiagnosticada, não só em Portugal como no mundo inteiro.

Daí a ideia de realizar um estudo que procurasse encontrar quais as manifestações mais frequentes e precoces da doença para se fazer um diagnóstico mais atempado e, desde logo, mais eficaz.

Mas isto não nos bastou.

Quisemos também trazer para Portugal um método de diagnóstico mais barato, mas sobretudo mais rápido, que permitisse rastrear potenciais casos de Anemia de Fanconi em familiares de doentes. E daí surge uma técnica de diagnóstico com um nome muito complicado – monoubiquitinação da proteína FANCD2 – mas que se baseia num processo bastante simples de detecção da presença ou ausência de uma proteína que quando presente na forma não ubiquitinada é indicativa da presença da doença.

Contamos pois com a sua colaboração neste estudo estando certos de que todos os pequenos avanços que fizemos hoje se repercutirão com grande intensidade nos cuidados dos doentes de amanhã.

Muito obrigado pela sua participação, caso seja o caso, mas muito obrigado também por ter lido todo o texto que para si escrevemos!

Atenciosamente,

João Daniel Monteiro Silva
DIIC, Mestrado Integrado em Medicina – ICBAS/UP

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Folheto informativo (Controlos, Dadores de Sangue)

A Anemia de Fanconi é uma doença genética que se caracteriza pela ocorrência de malformações congénitas, falência da medula óssea e susceptibilidade ao cancro. Pode manifestar-se por diminuição de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas condicionando respectivamente anemia, leucopenia e/ou trombocitopenia.

Crê-se ser uma doença subdiagnosticada, não só em Portugal como no mundo inteiro.

Daí a ideia de realizar um estudo que procurasse encontrar quais as manifestações mais frequentes e precoces da doença para se fazer um diagnóstico mais atempado e, desde logo, mais eficaz.

Mas isto não nos bastou.

Quisemos também trazer para Portugal um método de diagnóstico mais barato, mas sobretudo mais rápido, que permitisse rastrear potenciais casos de Anemia de Fanconi em familiares de doentes. E daí surge uma técnica de diagnóstico com um nome muito complicado – monoubiquitinação da proteína FANCD2 – mas que se baseia num processo bastante simples de detecção da presença ou ausência de uma proteína que quando presente na forma não ubiquitinada é indicativa da presença da doença.

Contamos pois com a sua colaboração neste estudo estando certos de que todos os pequenos avanços que fizemos hoje se repercutirão com grande intensidade nos cuidados dos doentes de amanhã.

Muito obrigado pela sua participação, caso seja o caso, mas muito obrigado também por ter lido todo o texto que para si escrevemos!

Atenciosamente,

João Daniel Monteiro Silva
DIIC, Mestrado Integrado em Medicina – ICBAS/UP

Folha de rosto do estudo de investigação

TÍTULO

ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

CLASSIFICAÇÃO

Trabalho Académico de Investigação

Não conferidor de grau Conferidor de grau (Licenciatura Mestrado Doutoramento)

Projecto de Investigação

Ensaio Clínico (Medicamentos Dispositivos médicos)

Outro Qual?

VERSÃO

Novo Modificação / Adenda Prolongamento

CALENDARIZAÇÃO

Data início: Outubro de 2010

Data conclusão: Julho de 2012

PRAZO A CUMPRIR:

INVESTIGADORES

ALUNOS E ORIENTADORES

Aluno

JOÃO DANIEL MONTEIRO SILVA; INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICA ABEL SALAZAR – UP; MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA; 5ºANO; JDANIELMONTEIRO@GMAIL.COM; +351 911035134.

Orientador / Supervisor da Instituição de Ensino

PROFª. DOUTORA MARGARIDA LIMA; INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR – UP; MÉDICA, IMUNOHEMOTERAPEUTA; ASSISTENTE HOSPITALAR GRADUADA DO SHC DO HSA/CHP; PROFESSORA CONVIDADA DO ICBAS-UP

Orientador / Supervisor no CHP

DR. JOSÉ BARBOT; MÉDICO, HEMATOLOGISTA, CHEFE DE SERVIÇO, RESPONSÁVEL PELA UHP DO HMP/CHP

PROMOTOR O próprio Outro

JOÃO DANIEL MONTEIRO SILVA; INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICA ABEL SALAZAR – UP; MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA; 5ºANO

INSTITUIÇÕES E SERVIÇOS

Unidades, Departamentos e Serviço do CHP

CENTRO HOSPITALAR DO PORTO (CHP)
HOSPITAL MARIA PIA (HMP)
CENTRO MATERNO-INFANTIL DO NORTE (CMIN)
UNIDADE DE HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA (UHP)
HOSPITAL DE SANTO ANTÓNIO (HSA)
DEPARTAMENTO DE MEDICINA (DM)
SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA (SHC)

Outras Instituições intervenientes

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR – UNIVERSIDADE DO PORTO (ICBAS – UP)
DEPARTAMENTO DE MICROSCOPIA (DMI) – LAB. CITOGÉNÉTICA (LCG)
DEPARTAMENTO DE IMUNO-FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA (DIFF) – LAB. IMUNOLOGIA

CARACTERÍSTICAS do estudo**Alvo do estudo**Animais Humanos **Natureza do estudo**Clínico Terapêutico
Epidemiológico Laboratorial (2ªF)
Rev. literatura Rev. casuística (1ªF)**Países / Instituições envolvidos**Multinacional Nacional
Multicêntrico Institucional **Características do estudo (desenho)**Descritivo (1ªF) Analítico (2ªF)
Observacional Experimental
Transversal (2ªF) Longitudinal (1ªF)
Retrospectivo (1ªF) Prospectivo **Participantes**Existência de grupo controle: Não Sim (2ªF)Seleção dos Participantes: Aleatória Não aleatória **Estudos observacionais**Tipo: Caso-controlo Coorte Outro **Estudos experimentais**Conhecimento: Aberto Cego (Duplamente cego)Ensaio Clínico: Fase I Fase II Fase III Fase IV **Outros aspectos relevantes para a apreciação do estudo**Participação de grupos vulneráveis Não Sim (Crianças
Convocação de doentes / participantes Não Sim (para participar no Estudo de Investigação)
Consentimento informado Não Sim
Realização de inquéritos / questionários Não Sim (Contacto Investigadores e Participantes: Sim
Realização de entrevistas Não Sim
Colheita de produtos biológicos Não Sim (No CHP
(Não anonimizados / Anonimizados
(Anonimização reversível
(Noutro local (ICBAS)
Armazenamento de produtos biológicos Não Sim
Criação de bancos de produtos biológicos Não Sim
Realização de exames / análises Não Sim (No CHP Noutro local (ICBAS)
Realização de estudos genéticos Não Sim
Recolha de dados Não Sim (Dados clínicos analíticos / imagem
Criação de bases de dados Não Sim
Saída para outras instituições Não Sim (Produtos biológicos
(Públicas Nacionais (ICBAS)
(Anonimização dos produtos biológicos / dados saídos **ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO**Orçamento total: 1054,50 Euros Contrato financeiro em anexo: Não Sim

Financiamento: Interno (CHP) 0,00 Euros Externo (Outros) 1054,50 Euros

Entidade(s) financiadora(s): Bolsa Iniciação à Investigação – ICBAS

INDICADORESRelatórios de progresso (periodicidade:) Relatório final Outros Quais? Dissertação Mestrado Integrado em Medicina

Data:

Assinatura do proponente (Investigador Responsável / Aluno):

Pedidos de autorização institucional

Trabalho académico de investigação: ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Presidente do Conselho de Administração do CHP

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do CHP

João Daniel Monteiro Silva, na qualidade de Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP e do CHP, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data ___/___/_____

Assinatura

Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Exmo(a). Senhor(a) Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

João Daniel Monteiro Silva, na qualidade de Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP e do CHP, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data ___/___/_____

Assinatura

Directora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Exmo(a). Senhor(a) Director(a) do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

João Daniel Monteiro Silva, na qualidade de Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP e do CHP, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data ___/___/_____

Assinatura

Termos de Responsabilidade

Trabalho académico de investigação: ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Aluno

Eu, abaixo assinado, João Daniel Monteiro Silva, na qualidade de Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP e do CHP, comprometo-me a executar o Trabalho Académico de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados, respeitando os princípios éticos e deontológicos e as normas internas da instituição.

Data ___/___/_____

Assinatura

Orientador

Eu, abaixo assinado, José Barbot, médico, na qualidade de Orientador, solicito autorização do Conselho de Administração para que o Aluno acima referido possa desenvolver no CHP o seu Trabalho de Investigação. Informo que me comprometo a prestar a orientação necessária para uma boa execução do mesmo e a acompanhar o Aluno nas diferentes fases da sua realização, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Data ___/___/_____

Assinatura

Supervisor do CHP

Eu, abaixo assinado, Margarida Lima, médica, na qualidade de Professora Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP e do CHP, comprometo-me a prestar a orientação necessária para uma boa execução do Trabalho de Investigação, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados. Mais declaro que acompanharei o Aluno, responsabilizando-me por supervisionar a execução do trabalho no CHP, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Data ___/___/_____

Assinatura

Termos de autorização local

Trabalho académico de investigação: ANEMIA DE FANCONI: CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO E PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DOENÇA

Directores de Serviço

Na qualidade de Director de Serviço, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

| Serviço | Nome do Director | Data | Assinatura |
|---------------------|--------------------|-------------|------------|
| Hematologia Clínica | Dr. Jorge Coutinho | ___/___/___ | _____ |

Directores / Conselhos de Gestão de Departamento

Na qualidade de Director do Departamento, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

| Departamento | Nome do Director | Data | Assinatura |
|--------------|--------------------------|-------------|------------|
| Medicina | Prof. Doutor Lopes Gomes | ___/___/___ | _____ |

RELATÓRIO DE EXECUÇÃO

Ano lectivo: 2011/2012

REVISÃO DE SÉRIE DE CASOS

Caracterização clínica e laboratorial dos doentes com Anemia de Fanconi seguidos no CHP

Nota introdutória

Antes de passar à descrição dos resultados propriamente dita e à sua discussão descreve-se o modo como se procedeu a esta revisão de casos de doentes com Anemia de Fanconi (AF) seguidos nas consultas de Hematologia e de Hematologia Pediátrica do Centro Hospitalar do Porto (CHP).

Relativamente a este aspecto, é necessário sublinhar o facto de não terem sido utilizado o formulário mais extenso elaborado para o efeito, pelo facto de se ter verificado ao longo do trabalho que só uma pequena parte dos dados constantes nesse formulário estava disponível nos processos clínicos da maioria dos doentes, o que tornaria impraticável a análise dos dados. Assim, optou-se por fazer uma recolha de dados mais simples, centrada nos dados demográficos, nas manifestações hematológicas e nas malformações congénitas. Foram colhidos outros dados para além dos apresentados, mas a inconstância dos registos, aliada muitas vezes à dificuldade de sistematização, conduziram à opção de não os descrever e analisar, pelo facto de se poderem tornar, mais do que incompreensíveis, confundidores.

Desta forma, anotaram-se as malformações congénitas registadas nos processos clínicos e recolheram-se individualmente os valores hematológicos (concentrações de hemoglobina e contagens de plaquetas, leucócitos e neutrófilos) à data do diagnóstico da doença, bem como da sua evolução ao longo do tempo, calculando, para cada um dos parâmetros, as medidas de tendência central (medianas, médias, modas) e de dispersão (desvio-padrão, mínimo e máximo) dos valores ao diagnóstico. Procedeu-se da mesma forma quanto à Hemoglobina F (HbF) e ao Volume Globular Médio (VGM). Por fim, fez-se também a um registo individual da evolução dos parâmetros hematológicos desde o diagnóstico até à última avaliação.

Pelos motivos acima apontados, não foram analisadas as complicações da doença, nomeadamente infecciosas, hemorrágicas ou outras, as causas de morte e as terapêuticas efectuadas, incluindo a referenciação para centros de transplantação.

Resultados

Caracterização da população e da amostra

Nos registos das consultas de Hematologia e de Hematologia Pediátrica do CHP foram identificados 23 doentes com AF, 17 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, dos quais 17 se encontravam vivos (idade mediana de 12 anos, variando entre 2 e 54 anos), 4 tinham falecido (idade mediana de falecimento 24 anos, variando entre 7 e 43 anos) e 2 estavam em processo de transplantação de medula óssea estando os respectivos processos no Instituto Português de Oncologia do Porto.

O acesso aos processos clínicos foi possível em 21 casos, não tendo sido revistos os dois processos que se encontravam no IPO - Porto. (Tabela 1). Dos casos revistos, tinha sido efectuado estudo citogenético nos 21 casos, mas apenas em 15 os resultados obtidos confirmaram o diagnóstico.

Tabela 1. Principais características da população e da amostra de doentes com Anemia de Fanconi sobre as quais incidiu o presente estudo.

| Doentes com Anemia de Fanconi | Sexo | Estado | Idade (anos) |
|-------------------------------|-------|----------|---------------------------|
| | M: F | V: F: D | Mediana (mínimo – máximo) |
| Casos identificados (n = 23) | 6: 17 | 17: 4: 2 | 12 (2-54) |
| Casos revistos (n = 21) | 6: 15 | 17:4: 0 | 12 (2-54) |

F, Feminino; M, Masculino; V, Vivos; F, Falecidos; D, Desconhecido

Idade ao diagnóstico

Nos doentes em que esta informação estava disponível (n = 20), a mediana das idades à data da primeira consulta no CHP era de 6 anos, variando entre 4 meses e 28 anos (Tabela 2).

Tabela 2. Idade dos doentes com Anemia de Fanconi à data de diagnóstico

| Idade ao diagnóstico (anos) | |
|-----------------------------|--------|
| Mediana | 6 |
| Mínimo – Máximo | 1 – 28 |

Tempo de follow-up

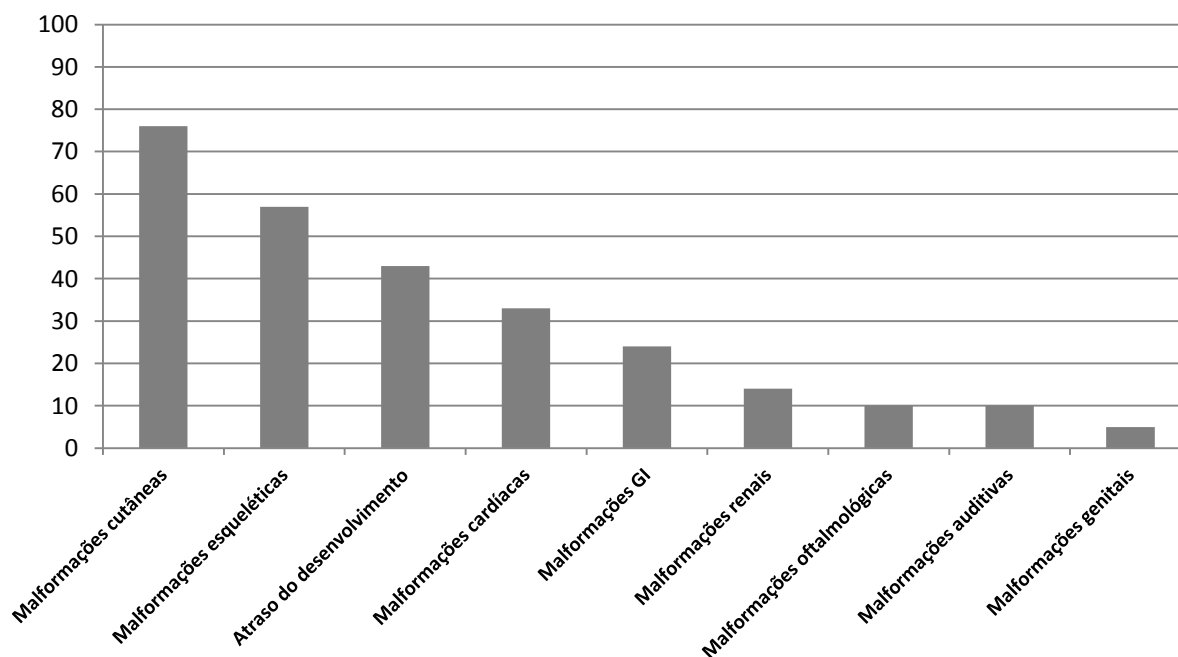
A mediana do tempo decorrido entre a primeira e a última consulta no CHP era de 8 anos, variando entre 1 e 26 anos (Tabela 3).

Tabela 3. Intervalo de tempo entre a primeira e a última consulta

| Intervalo de tempo entre a primeira e a última consulta (anos) | |
|--|--------|
| Mediana | 8 |
| Mínimo – Máximo | 1 – 26 |

Malformações congénitas

As malformações congénitas mais frequentes na presente série, foram as malformações cutâneas (76%), seguidas pelas malformações esqueléticas (57%) e pelo atraso do desenvolvimento (42%) (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Distribuição percentual das malformações congénitas por aparelhos e sistemas, observadas nos doentes com Anemia de Fanconi**

Como pode ser observado na Tabela 4 e no que respeita às manifestações cutâneas, as manchas de *café au lait* foram as mais frequentes. Dentro das malformações esqueléticas a mais observada foi a malformação do polegar. De destacar que dentro das malformações gastrointestinais só foi descrita a atresia duodenal, sendo as malformações renais, ginecológicas, auditivas ou oftalmológicas menos frequentes.

Tabela 4. Distribuição percentual das malformações congénitas dos diferentes aparelhos e sistemas observadas nos doentes com Anemia de Fanconi

| | % de casos |
|--|------------|
| Malformações da pele e tegumentos | |
| Manchas <i>café au lait</i> | 76% |
| Manchas hipopigmentação | 24% |
| Implantação baixa do cabelo | 10% |
| Malformações esqueléticas | |
| Malformações polegar | 43% |
| Microcefalia | 24% |
| Outras alterações mão | 24% |
| Malformações vertebrais | 10% |
| Malformação pés | 10% |
| Malformações rádio | 5% |
| Malformações gastro-intestinais | |
| Atrésia duodenal | 24% |
| Malformações renais | |
| Hipoplasia | 10% |
| Quistos renais | 5% |
| Malformações cardíacas | |
| Persistência canal arterial | 14% |
| Comunicação inter-auricular | 14% |
| Comunicação inter-ventricular | 10% |
| <i>Foramen oval</i> patente | 5% |

Manifestações hematológicasCitopenias ao diagnóstico

No que diz respeito às manifestações hematológicas, foi feita uma análise mais detalhada dos dados, já que são sem dúvida estas manifestações que mais vezes suscitam o diagnóstico e que mais problemas levantam no *follow-up* e tratamento destes doentes.

Assim, usando os valores de referência apropriados à idade, verificou-se que a citopenia mais frequente ao diagnóstico era a trombocitopenia (76%), seguida da anemia (71%) e da neutropenia (43%) (Tabela 5)

Tabela 5. Citopenias observadas nos doentes com Anemia de Fanconi na data do diagnóstico

| | % de doentes com citopenias |
|-----------------|-----------------------------|
| Trombocitopenia | 76 |
| Anemia | 71 |
| Neutropenia | 43 |
| Leucopenia | 24 |

Em relação aos valores de hemoglobina ao diagnóstico verificamos que a mediana se situava nos 10,7 g/dl, variando entre 7,3 e 12,6 g/dl. Uma variação ainda maior foi encontrada na contagem de plaquetas cuja mediana era de $56 \times 10^9/l$, variando entre 26 e $385 \times 10^9/l$. Finalmente, em relação aos neutrófilos, a mediana foi de 1039 mm^3 , variando entre 740 e 5109 mm^3 (Tabela 6).

Tabela 6. Valores hematológicos dos doentes com Anemia de Fanconi na data do diagnóstico

| | Hemoglobina (g/dl) | Plaquetas ($\times 10^9/l$) | Leucócitos (/mm ³) | Neutrófilos (/mm ³) |
|-----------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Mediana | 10,7 | 56 | 4230 | 1039 |
| Média | 10,6 | 102 | 5878 | 1490 |
| Desvio padrão | 1,3 | 107 | 3980 | 1240 |
| Mínimo – Máximo | 7,3 – 12,6 | 26 – 385 | 2560 – 16480 | 740 – 5109 |

Volume Globular Médio

A mediana do VGM dos eritrócitos destes doentes (100,3 fL) estava no limite superior do normal, assumindo como um intervalo de referência de 85 a 100 fL (Tabela 7). Todavia, é pertinente sublinhar que a quase todos os doentes apresentaram macrocitose em alguma fase da evolução da doença, sustentada (na maioria dos casos) ou intermitentemente.

Tabela 7. Volume Globular Médio dos eritrócitos dos doentes com Anemia de Fanconi

| | VGM (fL) |
|-----------------|--------------|
| Média | 98,6 |
| Mediana | 100,3 |
| Desvio padrão | 10,5 |
| Mínimo – Máximo | 73,0 – 115,9 |

VGM, Volume Globular Médio

Hemoglobina F

Em relação à HbF, os resultados confirmam a sua utilidade no diagnóstico da doença, já que a mediana dos valores médios obtidos (9,1%) é cerca de 10 vezes superior ao normal, traduzindo uma deficiência na transição da produção de HbF – característica do período fetal e neonatal, que se estende aos primeiros meses de vida – para a produção de HbA (Tabela 8).

Tabela 8. Níveis de HbF (%) nos eritrócitos dos doentes com Anemia de Fanconi

| | HbF (%) |
|-----------------|------------|
| Mediana | 9,1 |
| Média | 10,9 |
| Desvio padrão | 7,8 |
| Mínimo – Máximo | 1,9 – 29,5 |

Evolução hematológica

Para perceber a evolução dos valores hematológicos é útil saber que estes doentes são tratados com androgénios numa primeira fase da sua insuficiência medular sendo a decisão da progressão para terapêutica transfusional (eritrócitos e plaquetas) tomada com base em dois critérios: a refractoriedade aos androgénios ou a insuficiência destes para manter o doente assintomático.

Neste contexto, observou-se uma relativa estabilidade dos níveis de hemoglobina, do número de leucócitos e neutrófilos mas uma queda progressiva da contagem de plaquetas desde o diagnóstico até à última avaliação hematológica.

A análise da Tabela 9 e Gráficos 2 a 5 permite-nos então tirar duas conclusões: 1) a insuficiência medular é melhor avaliada em doentes com terapêutica activa pela evolução do número de plaquetas; 2) os níveis de hemoglobina e as contagens de neutrófilos são sustentadamente baixos ao longo do tempo.

Tabela 9. Evolução dos valores hematológicos, ilustrada pelos valores obtidos ao diagnóstico (A), durante a evolução da doença (B) e na última observação (C).

| Momento de avaliação | Hemoglobina (g/dl) | | | Plaquetas ($\times 10^9/l$) | | | Neutrófilos (/mm ³) | | |
|----------------------|--------------------|------|------|-------------------------------|-----|-----|---------------------------------|------|------|
| | A | B* | C** | A | B | C | A | B | C |
| Mediana | 10,7 | 11,1 | 11,3 | 56 | 47 | 55 | 1039 | 1453 | 1370 |
| Média | 10,6 | 10,8 | 10,7 | 102 | 77 | 71 | 1490 | 1789 | 1389 |
| Desvio padrão | 1,3 | 1,7 | 2,7 | 107 | 64 | 48 | 1240 | 851 | 733 |
| Mínimo | 7,3 | 6,3 | 5,7 | 26 | 18 | 10 | 740 | 840 | 749 |
| Máximo | 12,6 | 13,4 | 14,7 | 385 | 276 | 178 | 5109 | 3152 | 3420 |

* O tempo médio decorrido após diagnóstico foi de 2 anos;

** O tempo médio entre o diagnóstico e a última observação foi de 11 anos.



Gráfico 2. Evolução ao longo do tempo da média da concentração de hemoglobina no sangue periférico dos doentes com Anemia de Fanconi

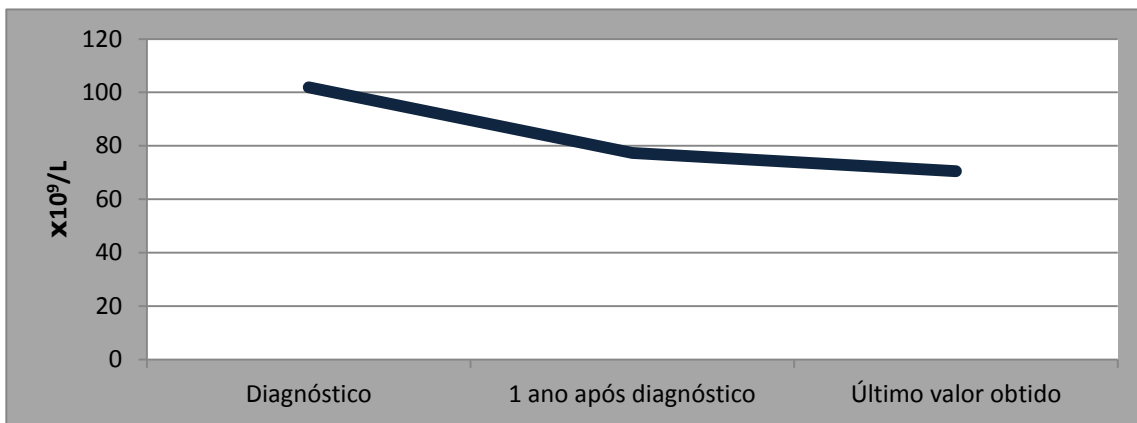


Gráfico 3. Evolução ao longo do tempo da média da concentração de plaquetas no sangue periférico dos doentes com Anemia de Fanconi

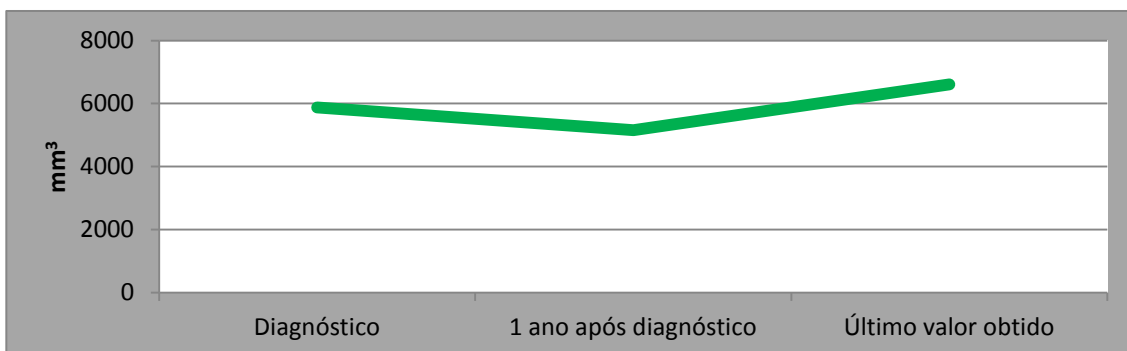


Gráfico 4. Evolução ao longo do tempo da média da concentração de leucócitos no sangue periférico dos doentes com Anemia de Fanconi

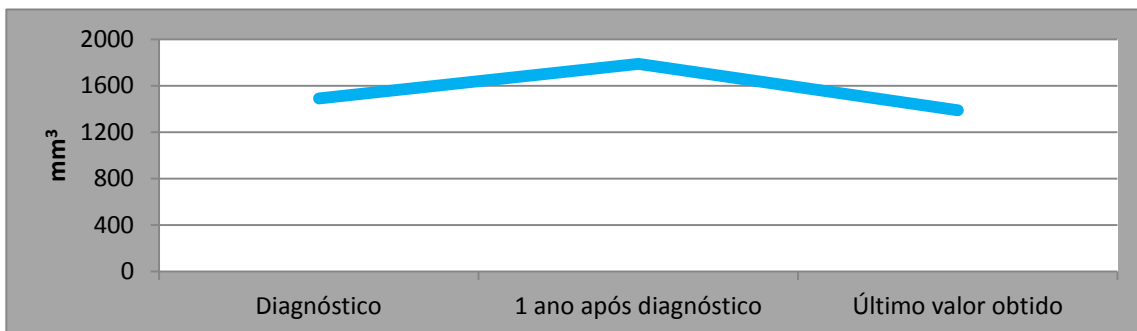


Gráfico 5. Evolução ao longo do tempo da média da concentração de neutrófilos no sangue periférico dos doentes com Anemia de Fanconi

A título de exemplo, apresenta-se a evolução dos valores hematológicos de um dos doentes com AF incluído nesta série (Doente 13). Como podemos observar no Gráfico 6, foram observadas flutuações da concentração da hemoglobina ao longo do tempo, tendo a terapêutica transfusional contribuído para a estabilização dos níveis médios de hemoglobina.

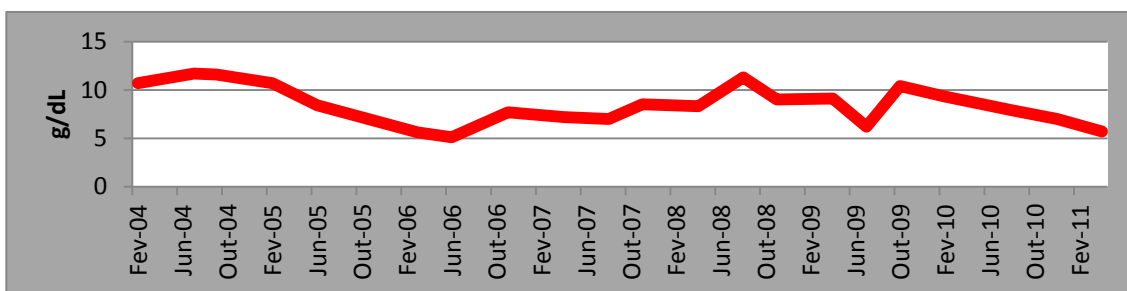


Gráfico 6. Evolução dos níveis de hemoglobina do doente 13

Este mesmo doente é também um bom exemplo em como as concentrações de plaquetas podem variar quando um doente se encontra em terapêutica transfusional com concentrados de plaquetas.

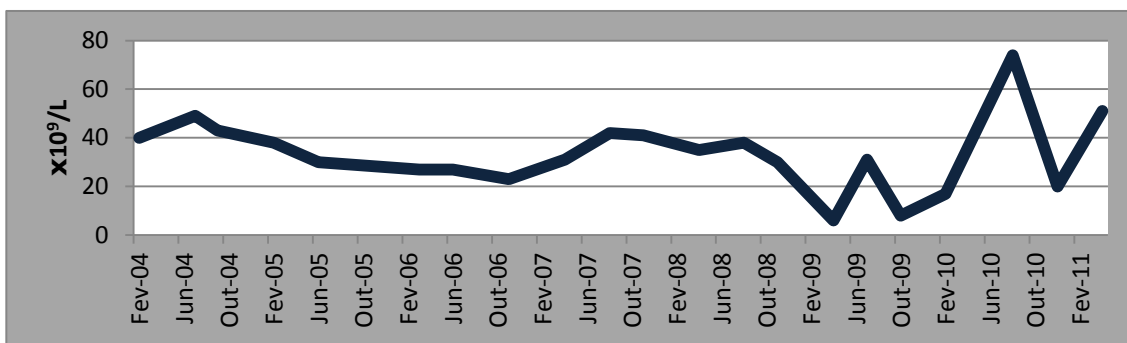


Gráfico 7. Evolução da concentração de plaquetas do doente 13

Curiosamente, e ainda no exemplo deste doente – porque é o único de que se dispõe para exemplificar uma das potenciais complicações letais deste grupo de patologias – podemos verificar que apresentou no final da sua vida uma elevação súbita da concentração de leucócitos que correspondeu a uma transformação blástica de um síndrome mielodisplásico que o doente já apresentava e que condicionou a sua morte (Gráfico 8).

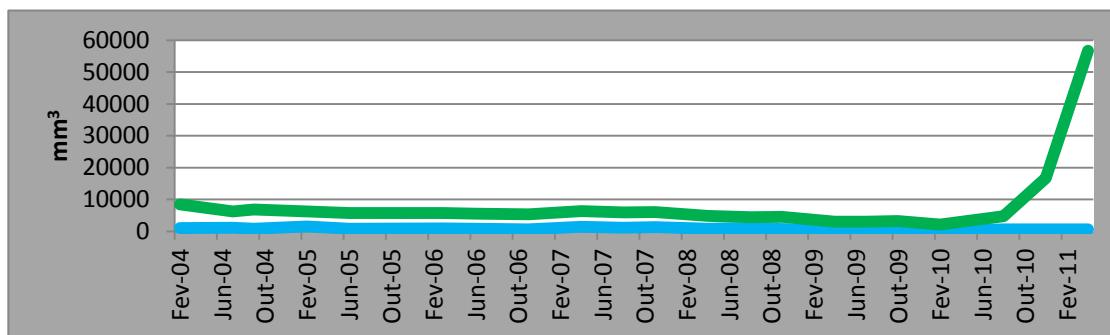


Gráfico 8. Evolução das concentrações de leucócitos (linha azul) e de neutrófilos (linha verde) do doente 13.

Ainda dentro das concentrações de leucócitos e neutrófilos, o Gráfico 9 (Doente 18) ilustra um exemplo característico de flutuações destas contagens que correspondem a infecções intercorrentes, a que estes doentes estão especialmente vulneráveis.

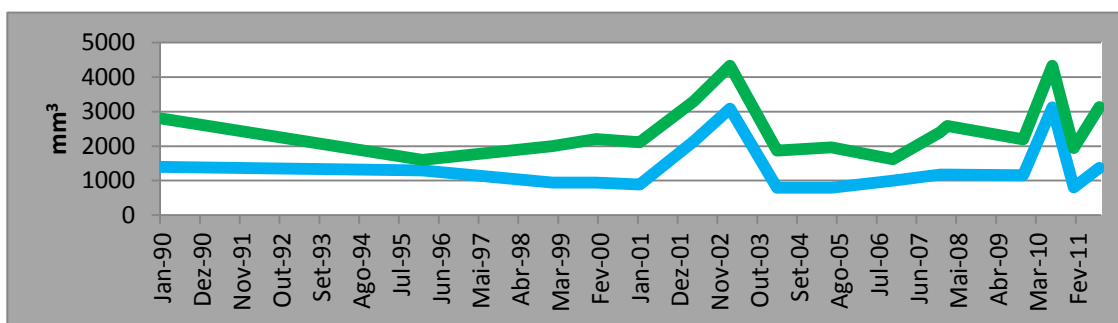


Gráfico 9. Evolução das concentrações de leucócitos (linha azul) e de neutrófilos (linha verde) do doente 18.

Discussão

A análise dos dados recolhidos a partir da presente revisão de casos sustenta que a maioria dos padrões de apresentação e evolução da doença são idênticos aos descritos na literatura.

Pode-se verificar, portanto, que a mediana de idade ao diagnóstico está de acordo com o que consta nos registos internacionais – o que significa que a doença é suspeitada em tempo útil e os profissionais estão sensibilizados para o seu diagnóstico.

Em relação às malformações congénitas verificamos que são frequentes e tem um padrão também semelhante ao descrito na literatura. Já na introdução a este trabalho foi referido que ‘pequena estatura, anormalidades cutâneas (manchas *café au lait* e hipopigmentação), malformações esqueléticas (ausência, hipoplasia ou anormalidades do polegar e rádio), renais e da cabeça, deficiência auditiva, hipogonadismo e ainda atraso mental’ são as malformações mais frequentes, o que mais uma vez se mostra consistente com os dados recolhidos.

Focando agora a atenção em dois parâmetros hematológicos, a HbF e o VGM, cujo registo resulta sobretudo da experiência acumulada dos médicos que tratam estes doentes no CHP mas também porque são dois aspectos que na literatura vêm sendo relatados com crescente interesse, verificamos um padrão consistente com valores sustentadamente aumentados de HbF e valores de VGM no limite superior do normal. Um parâmetro que poderia ter sido interessante analisar era o índice de anisocitose eritrocitária, ou RDW (*Red cell Distribution Width*), uma vez que tem sido referido em estudos recentes e congressos da especialidade como sendo um marcador importante de actividade da doença e de instabilidade cromossómica. Estes dados não foram registados pelo facto da questão ter surgido quando a revisão de casos já tinha sido concluída ficando pois a sua recolha para uma fase posterior.

Termino assim a discussão de casos deixando em anexo análises individualizadas dos dados hematológicos acompanhados de breves resumos individuais do estado de cada doente à data da recolha dos dados que poderão servir de base ou auxílio a trabalhos que ainda possam ser feitos no futuro (Anexo 1) .

Fica também em anexo uma proposta de *follow-up* destes doentes com um esquema de periodicidade de avaliações, naturalmente flexível tendo em conta a especificidade de cada apresentação (Anexo 2). A proposta apresentada tem como objectivo uniformizar os registos e torná-los mais fáceis de consultar, de forma e contornar os obstáculos que foram encontrados nesta revisão e que na sua maioria se relacionam com a desorganização dos processos e na perda de dados que daí resulta. É também uma proposta que tem em conta e reflecte a experiência acumulada dos médicos que tratam estes doentes no CHP.

TRABALHO LABORATORIAL

Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2

Nota introdutória

Conforme referi na Introdução da proposta subjacente a este projecto, a proteína FANCD2 existe em duas isoformas que podem ser detectadas por *Western Blot*: uma isoforma curta não ubiquitinada (FANCD2S) com menor peso molecular (155kDa) e uma isoforma longa ubiquitinada (FANCD2L) com maior peso molecular (162kDa).

Os doentes com AF expressam o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L- ou FANCD2S-/FANCD2L-, podendo também expressar o fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+, quando a mutação ocorre nos genes a jusante do complexo de monoubiquitinação (FANCD1/FANCDJ/FANCN).

Resultados

Caracterização da amostra

Após informar sobre o estudo e solicitar o consentimento, foram colhidas amostras de sangue de 10 doentes e de 8 controlos (dadores benévolos de sangue) para pesquisa da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 por *Western Blot*.

Todos os doentes estudados por esta técnica eram doentes com AF comprovada por diagnóstico citogenético.

Detecção da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 por *Western Blot*

A pesquisa da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 foi feita pelo método de *Western Blot*, segundo o protocolo técnico apresentado em anexo, no final deste trabalho (Anexo 3).

Numa primeira fase, procedeu-se ao estudo de 6 controlos e 6 doentes, cujos resultados se apresentam na Figura 1.

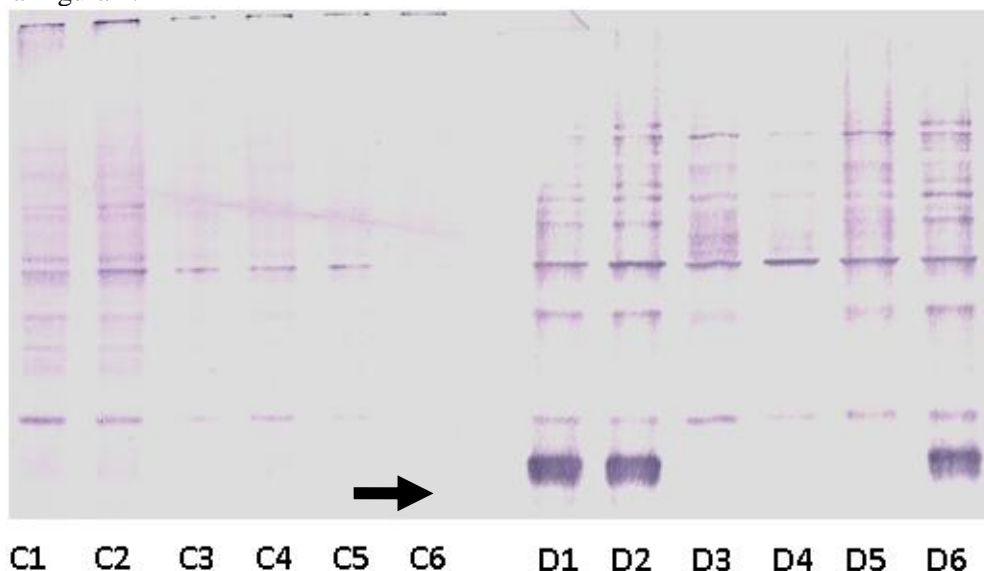


Figura 1. Resultados da pesquisa da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 por *Western Blot*, em 6 controlos (C1-C6) e 6 doentes com diagnóstico citogenético de Anemia de Fanconi (D1-D6).

Ao contrário do que seria de esperar (fenótipo FANCD2S+/FANCD2L+), nos controlos não pareciam ser observadas as bandas proteicas correspondentes às formas FANCD2S (não monoubiquitinada) e FANCD2L (monoubiquitinada).

Assim sendo, não podíamos ter a certeza de que as bandas adicionais expressas pelos doentes D1, D2 e D6 correspondessem à proteína FANCD2S, traduzindo o fenótipo mais habitual na Anemia de Fanconi (FANCD2S+/FANCD2L-). Por outro lado, seria pouco provável que os doentes D3, D4 e D5

correspondessem a fenótipos FANCD2S+/FANCD2L+ sabendo-se que dois deles eram irmãos e que um deles possuía uma mutação conhecida no gene FANCA e que, portanto, se deveria esperar um fenótipo FANCD2S+/FANCD2L-.

Desta forma, repetiu-se o estudo nos 6 controlos e nos 6 doentes inicialmente estudados e procedeu-se ao estudo dos restantes casos, de forma a afastar possíveis erros técnicos durante a electroforese e/ou o *Western Blot*.

Esta segunda tentativa de identificação da forma não monoubiquitinada da proteína FANCD2 revelou-se novamente infrutífera, conforme se pode observar na Figura 2, onde são apresentados os resultados dos 8 controlos e dos 10 doentes.

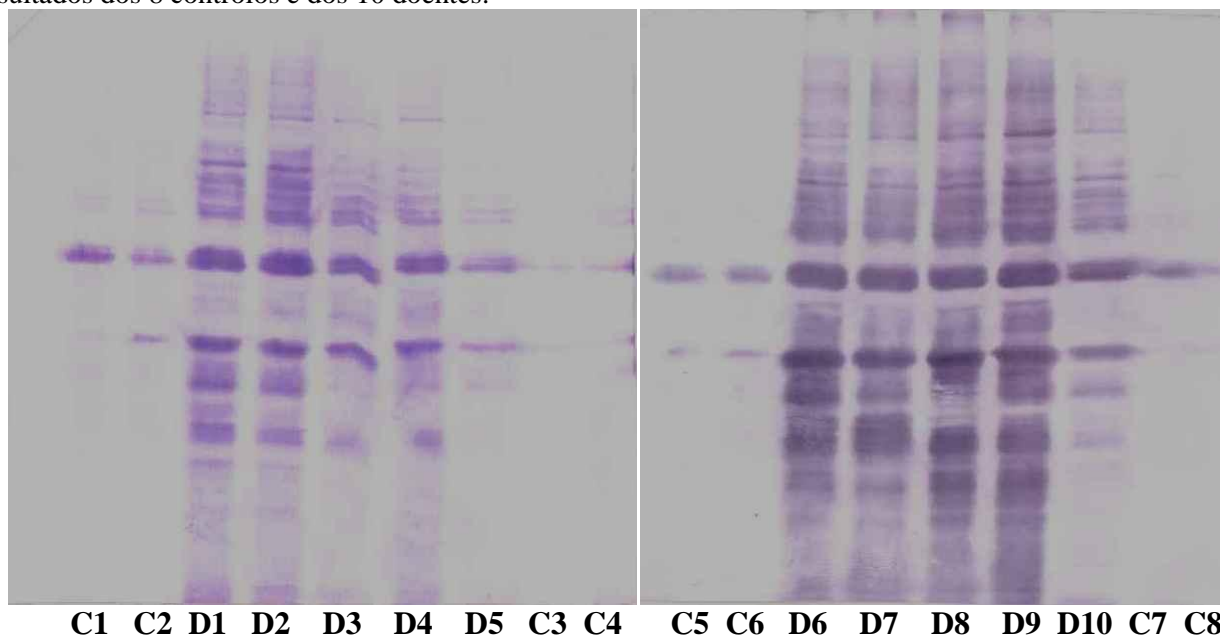


Figura 2. Resultados da pesquisa da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 por *Western Blot*, em 8 controlos (C1-C8) e 10 doentes com diagnóstico citogenético de Anemia de Fanconi (D1-D10).

Neste *Western Blot*, em que se usaram marcadores de peso molecular, confirmamos que as proteínas FANCD2S e FANCD2L não estavam a ser detectadas nos controlos. De facto, as bandas proteicas expressas correspondiam a proteínas com pesos moleculares entre 60-80 kDa, longe dos pesos esperados para as formas FANCD2S e FANCD2L (155 e 162 kDa, respectivamente).

Para além disso, a multiplicidade de bandas encontradas nos doentes, parecia traduzir uma inespecificidade inesperada do anticorpo.

Discussão

Dos resultados obtidos, inesperados e confusos, ficam duas perguntas pertinentes que não podem ser respondidas cabalmente no âmbito deste trabalho por ser necessário recorrer à opinião de peritos, o que não é possível fazer a tempo de incorporar no presente trabalho.

1º - Como explicar que um anticorpo anti-FANCD2 marque, nos controlos, proteínas cujo peso molecular é diferente daquelas para as quais este é específico?

2º - Como explicar que o anticorpo seja específico para duas proteínas nos controlos, sejam elas quais forem, e se revele altamente inespecífico nos doentes marcando dezenas de proteínas?

Após estas duas tentativas conclui-se que a técnica não teve os resultados esperados e que nesta fase não pode ser ainda implementada no CHP, como uma técnica de diagnóstico e rastreio de Anemia de Fanconi.

Apesar disso, existem dois aspectos relevantes no que respeita ao estudo da monoubiquitinação da proteína FANCD2.

O primeiro, e porventura mais importante, é que ela é pioneira não só no CHP mas também em todo o país e que por si só já acrescenta valor ao trabalho realizado e ao esforço que várias pessoas dedicaram ao desenvolvimento e implementação desta técnica.

O segundo tem a ver com os resultados, cujas dúvidas servirão para estimular o desenvolvimento e aperfeiçoamento da técnica. Por se ter concluído que a técnica não funcionou na primeira abordagem que se fez ou descreveu em Portugal não significou tal facto que tivesse esmorecido o entusiasmo pelo seu desenvolvimento. Estudos internacionais são taxativos quando afirmam que a técnica tem níveis elevados de sensibilidade e especificidade no diagnóstico de AF, reafirmando-se por isso, apesar dos resultados obtidos, o seu potencial.

COMENTÁRIO FINAL

Como comentário final, quero deixar três notas sobre o trabalho que empreendi há mais de ano e meio e tudo aquilo que o envolveu.

A primeira nota vai para as dificuldades que encontrei no que respeitou à revisão de casos, dificuldades que tiveram por base sobretudo a deficiente qualidade dos registos clínicos que se produzem nos hospitais. Não há organização nem separadores internos e os registos médicos são frequentemente ilegíveis o que torna a sua consulta um problema significativo quando se quer empreender um estudo retrospectivo como foi o caso.

Segundo, uma nota para a experiência que pude acumular com este trabalho. Foram quase dois anos muito trabalhosos mas simultaneamente muito proveitosos a todos os níveis: pessoal, profissional e de relações humanas. Tive oportunidade de ver e fazer coisas que de outra forma não faria, aprender coisas que de outra forma não aprenderia e conhecer pessoas que de outra forma não conheceria.

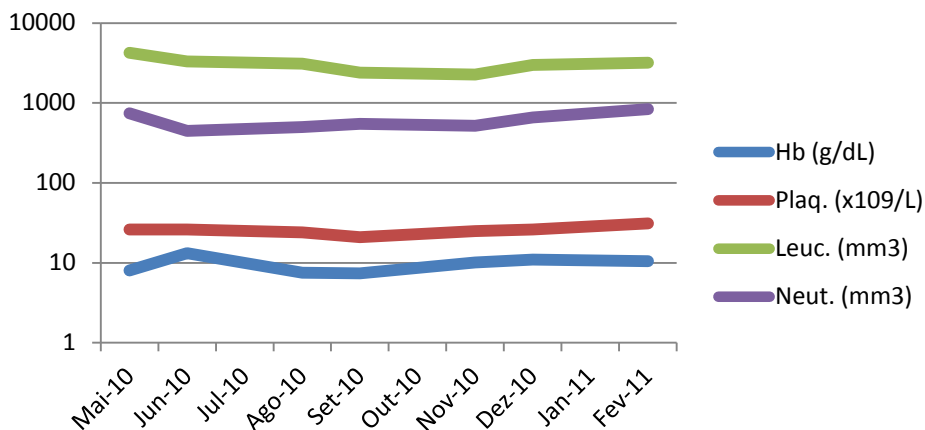
Finalmente, porque a última palavra é sempre para os doentes e para os seus problemas, concluo este trabalho com um dado básico mas talvez não irrelevante: o nome da doença, Anemia de Fanconi. Fanconi, em homenagem à pessoa que descreveu a doença pela primeira vez e Anemia pela forma como os doentes se apresentavam à época do diagnóstico. Talvez seja útil uma reflexão sobre esta nomenclatura porque está manifestamente desactualizada. Primeiro porque a anemia não é a apresentação mais frequente da doença nem porventura a mais significativa; segundo, porque se dá ênfase às consequências, esquecendo as causas e fisiologia básica da doença. Ou seja, a doença à qual se chama ‘Anemia de Fanconi’ é na realidade uma doença medular hipoplásica secundária a uma deficiência dos mecanismos de reparação do ADN. Assim, com rigor, estamos na presença de uma doença que afecta todas as células do organismo – é pois uma deficiência genética dos mecanismos de reparação do DNA – que se manifesta com maior ênfase no sistema hematológico por ser um sistema em activação permanente cujas disfunções se traduzem mais precocemente e com maior gravidade geral.

ANEXOS

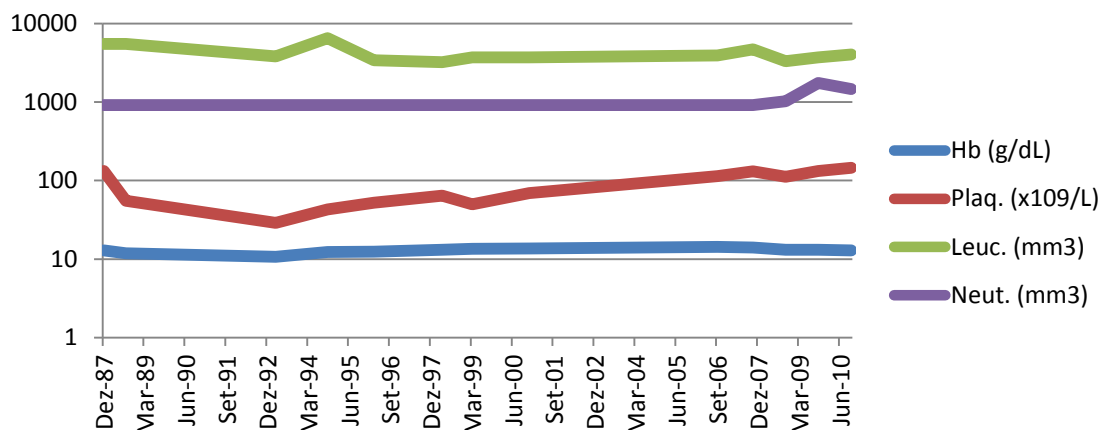
I – Resumo clínico-laboratorial individualizado

Sexo masculino; data de nascimento: 22-12-2003; 6 anos de idade ao diagnóstico; HbF 29,5%; DEB positivo.

Iniciou terapêuticas com androgénios em doses progressivamente elevadas + concentrados de plaquetas e eritrócitos. Morte de causa desconhecida em 2011.

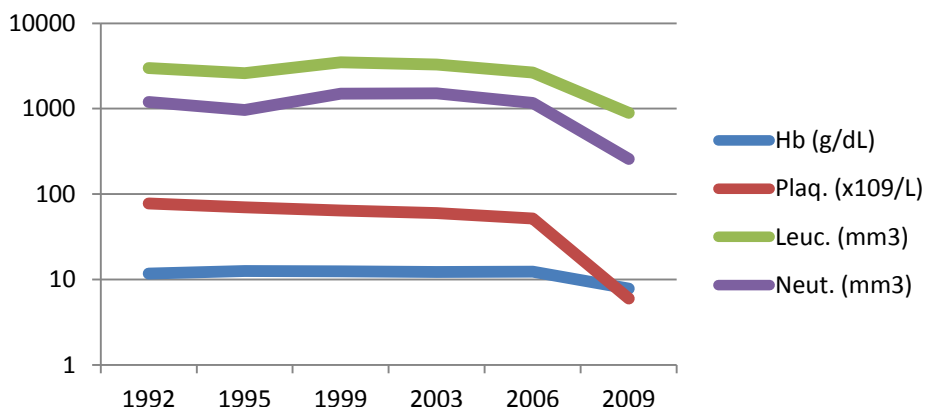


Sexo masculino; data de nascimento: 01-05-1981; 12 anos de idade ao diagnóstico; DEB positivo. Duas transfusões ocasionais de eritrócitos encontrando-se actualmente assintomático.

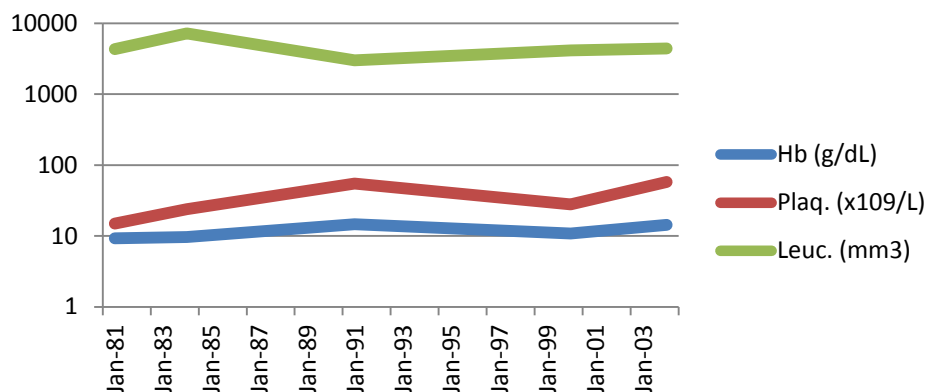


Sexo feminino; data de nascimento: 28-10-1975; 12 anos de idade ao diagnóstico; HbF 4,1%; DEB positivo. Infecções de repetição. Nunca conseguiu engravidar.

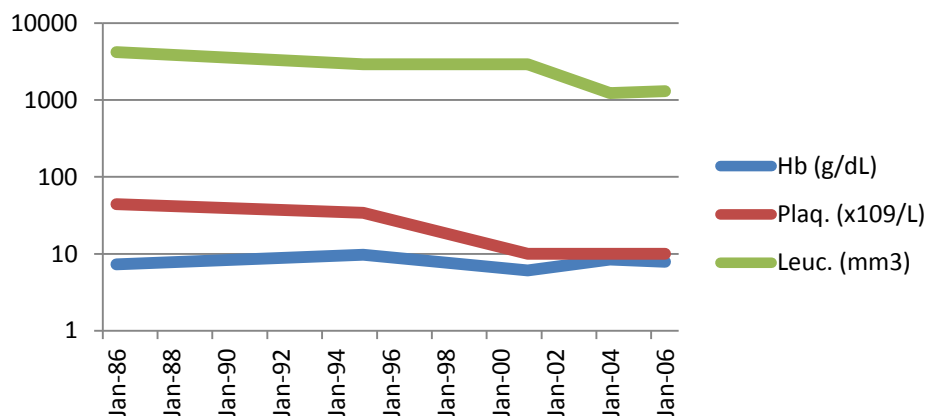
Iniciou terapêutica com androgénios + concentrados de plaquetas e eritrócitos. Morte de causa desconhecida.



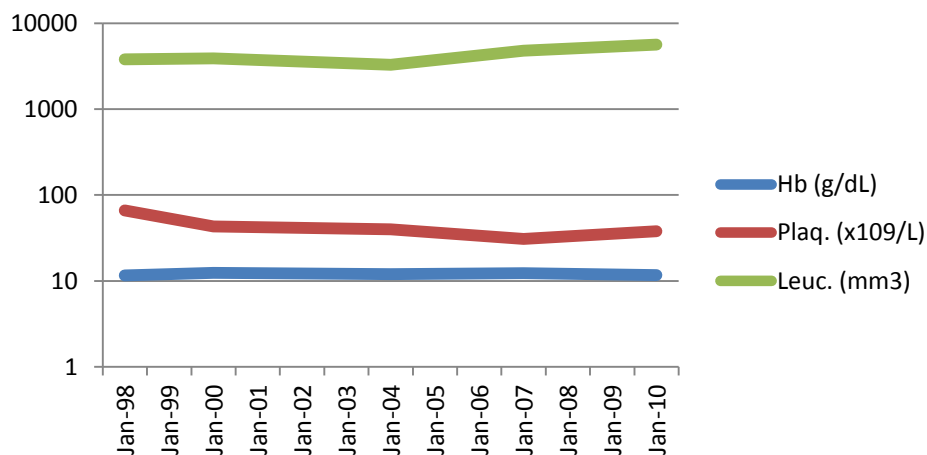
Sexo feminino; data de nascimento: 03-08-1976; 6 anos de idade ao diagnóstico; DEB negativo.
 Fez ocasionalmente androgénios com respostas parciais + concentrados de eritrócitos.
 Assintomática até 2004.



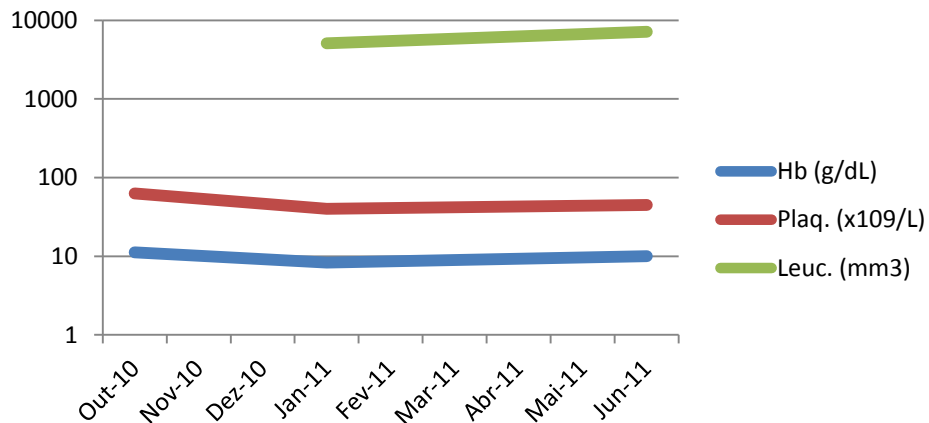
Sexo feminino; data de nascimento: 20-12-1962; 18 anos de idade ao diagnóstico; HbF 3,7%; DEB indeterminado;
 Iniciou terapêutica com androgénios em doses crescentes + terapêutica transfusional.
 Faleceu em 2006 de causa desconhecida.



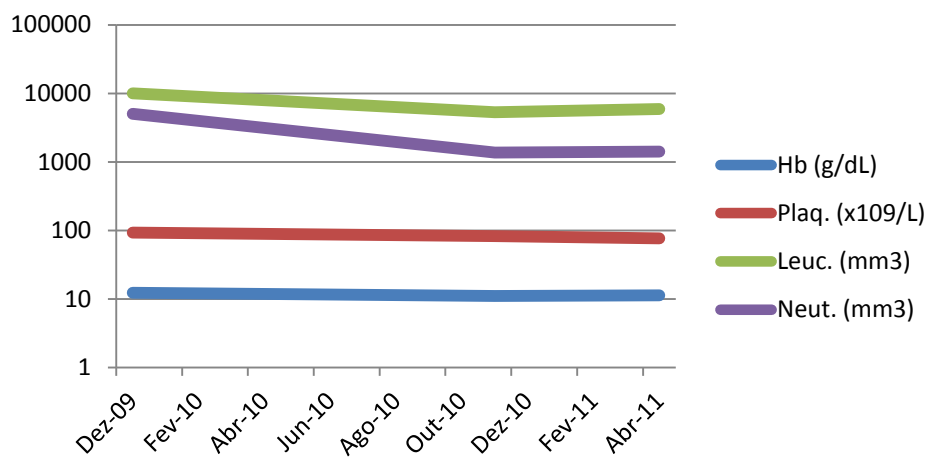
Sexo feminino; data de nascimento: 16-10-1975; 20 anos de idade ao diagnóstico; HbF 8,4%; DEB positivo;
 Surda-muda com atraso do desenvolvimento psico-motor.
 Sem terapêuticas em curso.



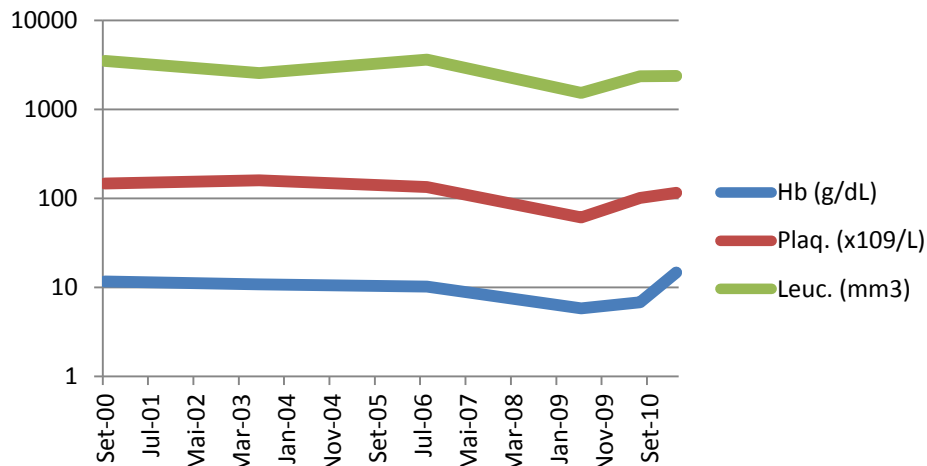
Sexo feminino; data de nascimento: 02-05-2006; 4 anos de idade ao diagnóstico; HbF 16,7%; DEB positivo.
Sem terapêuticas em curso.



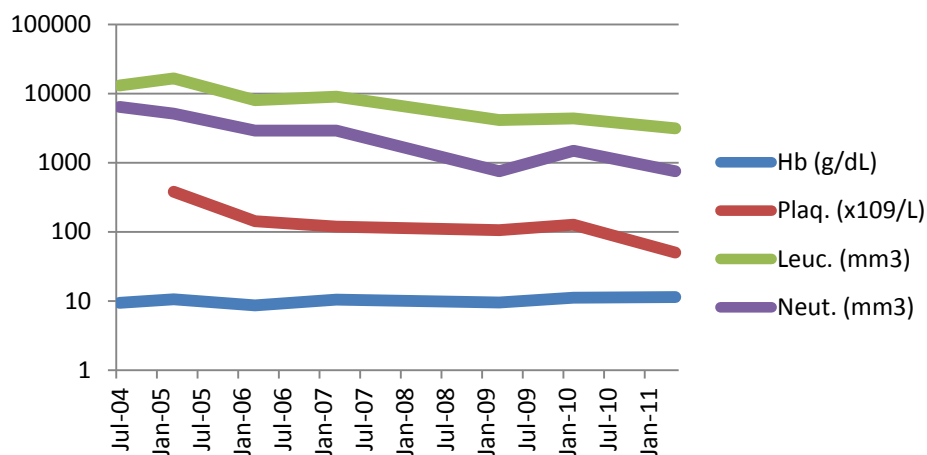
Sexo feminino; data de nascimento: 06-11-2006; 4 anos de idade ao diagnóstico; HbF 10,8%; DEB positivo.
Sem terapêuticas em curso



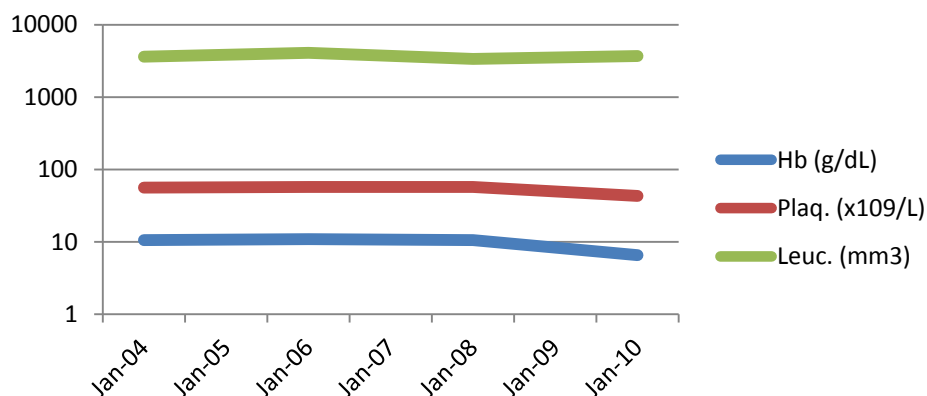
Sexo feminino; data de nascimento: 24-02-1992; 11 anos de idade ao diagnóstico; HbF 6,8%; DEB negativo
Em terapêutica transfusional mensal. Aguarda TMO.



Sexo masculino; data de nascimento: 26-12-2003; 2 anos de idade ao diagnóstico; HbF 12,7%; DEB positivo.
Sem terapêuticas em curso.

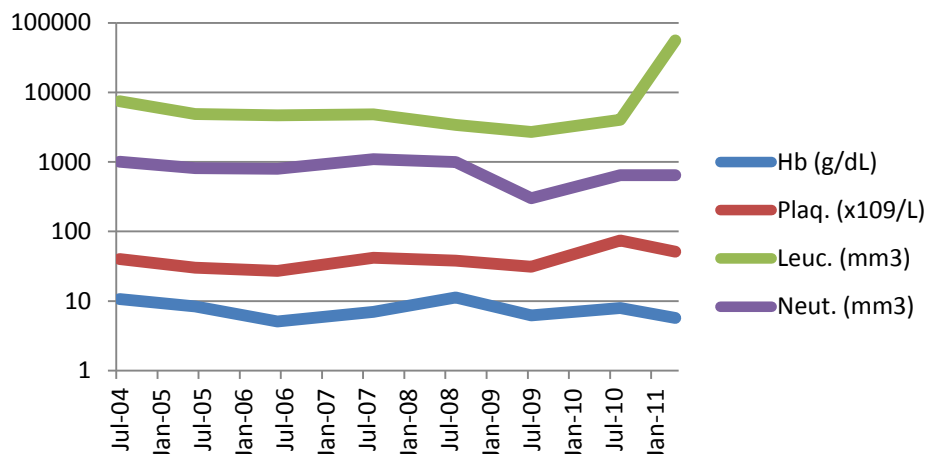


Sexo feminino; data de nascimento: 02-09-1999; 5 anos de idade ao diagnóstico; HbF 12,6%; DEB positivo.
Aguarda TMO.

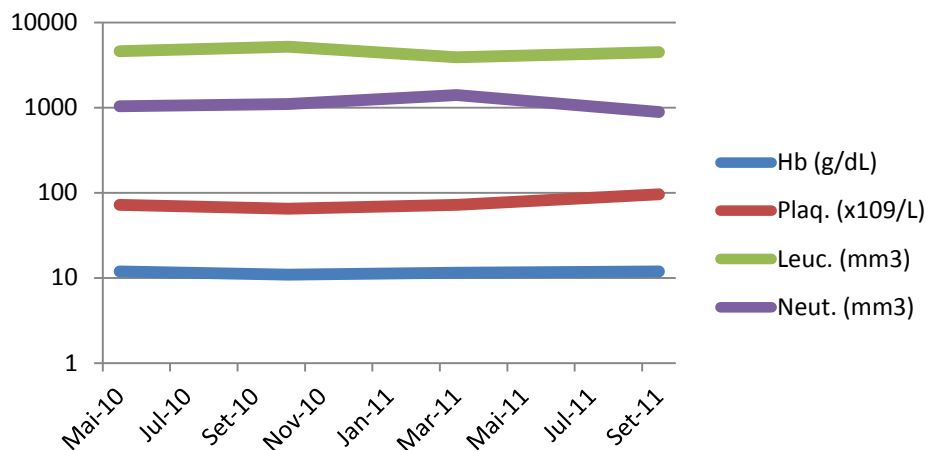


Sexo masculino; data de nascimento: 13-06-1997; 6 anos de idade ao diagnóstico; HbF 28,5%; DEB positivo.

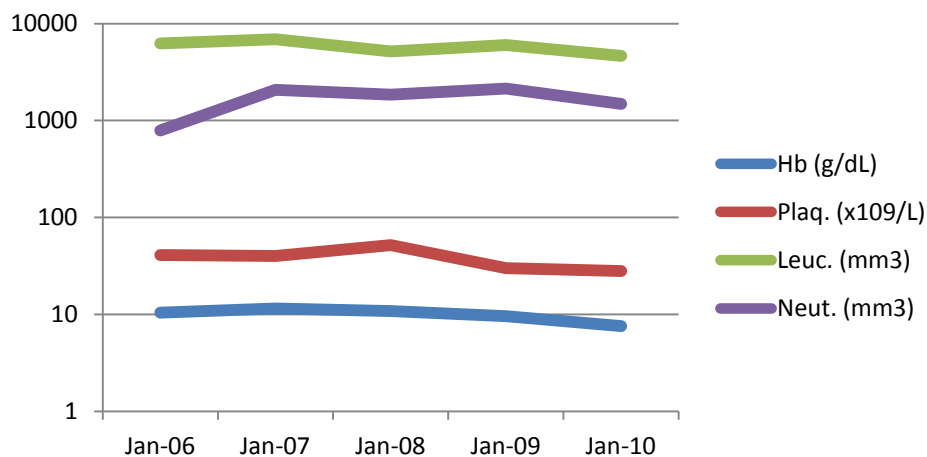
Infecções recorrentes. Iniciou terapêuticas com androgénios + suporte transfusional. Síndrome mielodisplásica em 2010. Falecimento em 2011, na sequência de transformação blástica.



Sexo feminino; data de nascimento: 06-12-1998; 11 anos de idade ao diagnóstico; HbF 11%; DEB positivo. Agenesia renal à esquerda. Sem terapêuticas em curso.

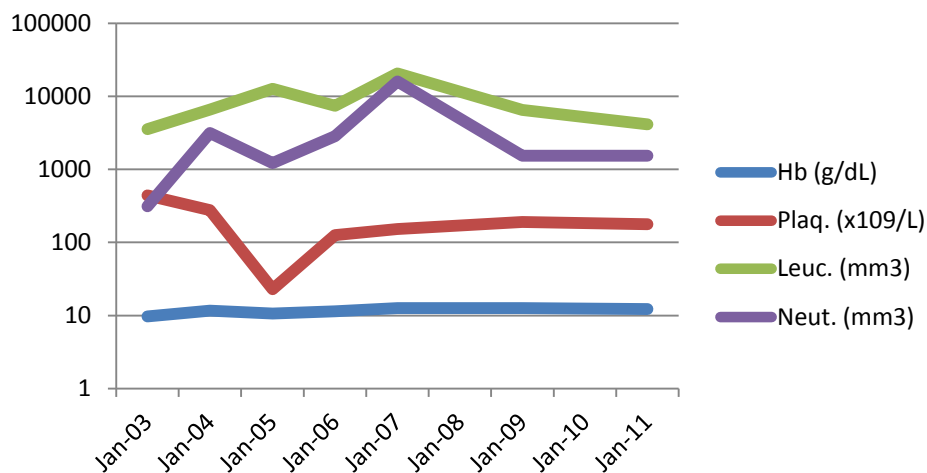


Sexo feminino; data de nascimento: 13-03-2002; 4 anos de idade ao diagnóstico; HbF 11,1%; DEB positivo. Fez transplante de medula óssea em 10-2011.

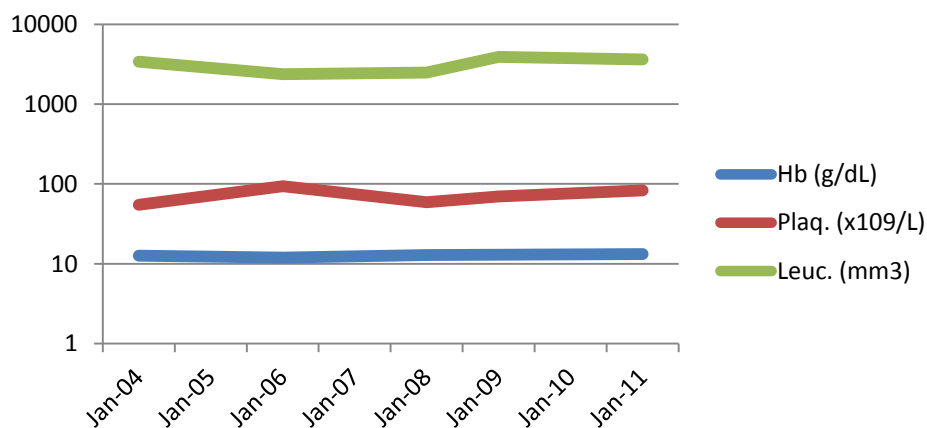


Sexo masculino; data de nascimento: 13-08-2003; 4 meses de idade ao diagnóstico; HbF 8,8%; DEB positivo.

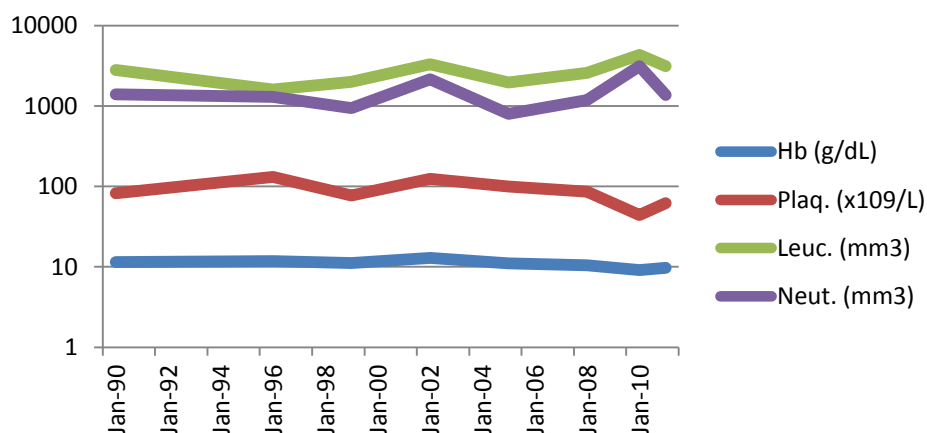
Sem terapêuticas em curso.



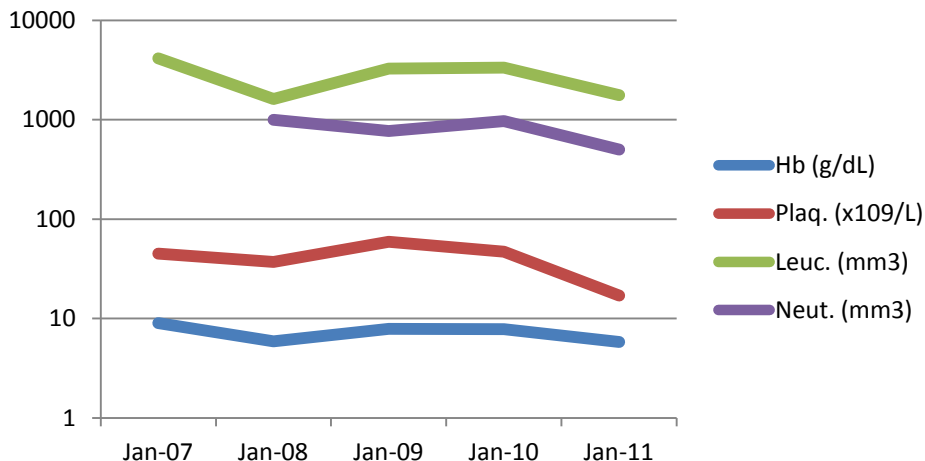
Sexo feminino; data de nascimento: 21-04-1995; 4 anos de idade ao diagnóstico; HbF 9,1%; DEB negativo. Infecções respiratórias de repetição. Sem terapêuticas em curso.



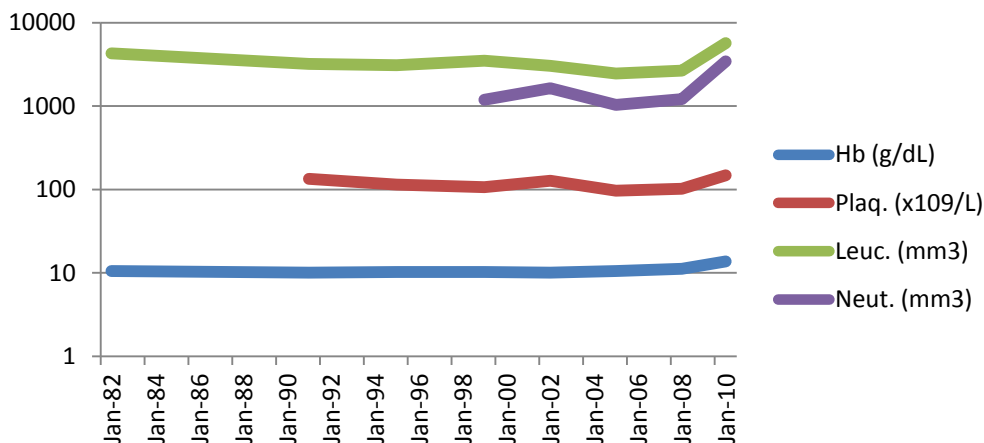
Sexo feminino; data de nascimento: 22-04-1977; 15 anos de idade ao diagnóstico; HbF 5,7%; DEB positivo. Sem terapêuticas em curso.



Sexo feminino; data de nascimento: 18-07-1999; 5 anos de idade ao diagnóstico; DEB positivo.
Iniciou terapêutica com androgénios semanal + suporte transfusional mensal.



Sexo feminino; data de nascimento: 23-03-1956; 28 anos de idade ao diagnóstico; HbF 4,1%; DEB positivo.
Vigilância anual sem terapêuticas em curso.



NOTA: Não se incluíram análises de dois doentes tendo em conta que os dados recolhidos dos processos se manifestaram insuficientes para este formato de análise.

DEB, Diepoxibutano

TMO, Transplante de medula óssea

II – Proposta de *follow-up* dos doentes

| | Ecocardiograma | Ecografia Reno-vesical | Rx esqueleto | Hemograma com plaquetas | HbF | Ex. Físico completo | Peso/ Estatura | Rastreio auditivo | Rastreio oftalmológico |
|---------------------------------|----------------|------------------------|--------------|-------------------------|----------|------------------------|----------------|-------------------|------------------------|
| Diagnóstico * | | | | | | | | | |
| Idade pediátrica * ¹ | | | | Mensal ou 3/3 meses | 2/2 anos | 3/3 meses ou 6/6 meses | 6/6 meses | 2/2 anos | 2/2 anos |
| Idade adulta | | | | 6/6 meses ou anual | | Anual | | | |

Outros Exames Auxiliares de Diagnóstico em função do estado e condição do doente

*Determinação do HLA do doente, pais e irmãos e procura de eventuais doadores compatíveis. Pesquisa de instabilidade cromossómica nas células em cultura na presença de DEB HC, IGF-1 e IGFBP3 caso atraso de crescimento (P<5%)

*¹ Biópsia de medula óssea (densidade medular, relação M/E, % blastos) LH, FSH e testosterona após puberdade

DEB, Diepoxibutano
 FSH, Follicule-stimulating hormone
 HC, Hormona de crescimento
 IGF-1, Insulin-like growth factor 1
 IGF-BP3, Insulin-like growth factor-binding protein 3
 LH, Luteinizing hormone
 M/E, relação mielóide / eritróide

III – Protocolo para a determinação da forma monoubiquitinada da proteína FANCD2 em doentes com Anemia de Fanconi

SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS

- 1) Adicionar 3mL de Histopaque + 3mL de sangue total colhido em tubos heparinizados (em Tubos de Falcon®).²
- 2) Centrifugar os tubos a 2100 rpm durante 30 minutos.
- 3) Adicionar 8mL de PBS diluído de 1/10 aos Tubos de Falcon® e juntar os leucócitos isolados após a centrifugação.³
- 4) Centrifugar os tubos a 2100 rpm durante 10 minutos.

PREPARAÇÃO DE MEIO DE CULTURA COMPLETO

- 5) Adicionar a cada tubo de cultura:
 - a. 6mL de RPMI;
 - b. 1mL de soro bovino fetal;
 - c. 100uL de PHA;
 - d. 100uL de L-Glutamina;
 - e. 100uL de Penicilina + Estreptomicina.
- 6) Adicionar o pellet celular obtido após a centrifugação do passo 4) suspendendo-o no meio de cultura.

INCUBAÇÃO DAS CULTURAS

- 7) Incubar os tubos de cultura numa estufa a 37°C, com 5% CO₂, durante 72 horas.

APÓS 72 HORAS DE CULTURA

- 8) Homogeneizar a cultura e centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
- 9) Retirar o sobrenadante e adicionar 10mL de PBS diluído 1/10.
- 10) Centrifugar a amostra a 1500 rpm durante 10 minutos.
- 11) Retirar o sobrenadante, homogeneizar a amostra e adicionar 1mL de PBS diluído 1/10.

CONTAGEM DE CÉLULAS

- 12) Adicionar, em microtubos tipo *Eppendorf*, 25uL de Turke + 25uL da solução obtida em 11)
- 13) Fazer a contagem de células em câmara de Neubauer.

LISE CELULAR, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

- 14) Centrifugar a solução obtida em 11) a 13000 rpm durante 10 minutos.
- 15) Retirar o sobrenadante e adicionar Tampão RIPA+PI na proporção de 10-50uL por 10⁶ células e deixar a solução em gelo durante 30 minutos.
- 16) Após 30 minutos centrifugar a solução a 13000 rpm durante 10 minutos.
- 17) Retirar o sobrenadante para microtubos tipo *Eppendorf*. Daqui, retirar 10uL para a realização do método de Lowry e congelar o restante -80°C.

² Adicionar primeiro o Histopaque e só depois o sangue total; este último deve ser adicionado com precaução, preferencialmente a um ritmo lento e pelas bordas do tubo de forma a ficar suspenso sobre a solução de Histopaque.

³ Os leucócitos devem ser isolados por meio de uma pipeta de Pasteur; deve-se descartar em primeiro lugar o plasma procedendo-se depois à pipetagem dos leucócitos que são adicionados aos Tubos de Falcon® contendo PBS.

MÉTODO DE LOWRY PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA

| | H2O (mL) | Alb. 0,05%/uL (mL) | Amo stra (mL) | Reagente cupro-alcalino (mL) |
|---------------------|-------------|-----------------------|------------------|---------------------------------|
| B | 0,25 | | | 0,75 |
| P1 | 0,225 | 0,025 | | 0,75 |
| P2 | 0,200 | 0,050 | | 0,75 |
| P3 | 0,175 | 0,075 | | 0,75 |
| Amo stra | 0,240 | | 0,01 0 | 0,75 |

$$f = \frac{0,3}{\sum Abs P1 + P2 + P3} \times 25 (\text{factor de diluição pra } 10\mu\text{L de solução})$$

$$\text{Concentração proteica } \left(\frac{mg}{mL}\right) = f \times \text{Absorvância das amostras}$$

- 18) Depois de adicionar reagente de Folin ao B, P1, P2, P3 e às amostras deixar os tubos 30 minutos em local escuro e posteriormente ler as absorvâncias no espectofotómetro.

ELECTROFORESE E WESTERN BLOT

- 19) A suspensão obtida em 16) e congelada a -80°C devem ser submetidas a electroforese SDS-PAGE (10%) e as proteínas devem ser transferidas por *Western Blot* para uma membrana de nitrocelulose e posteriormente analisadas.