

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Helen Tais da Rosa**

**ANEMIA DE FANCONI: OBSERVAÇÕES RECENTES EM CÉLULAS  
LINFOBLASTÓIDES IMORTALIZADAS DE PACIENTES COMO MODELO DE ESTUDO**

**UFCSPA**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre**

**Porto Alegre  
2016**

**Helen Tais da Rosa**

**Anemia de Fanconi: observações recentes em células linfoblastóides imortalizadas de pacientes como modelo de estudo**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Dinara Jaqueline Moura  
Co-Orientadora: Dra. Jenifer Saffi

**Porto Alegre  
2016**

Catálogo na Publicação

da Rosa Silva, Helen Tais  
Avaliação de linhagens linfoblásticas de anemia de Fanconi em resposta ao efeito de agentes quimioterápicos / Helen Tais da Rosa Silva. -- 2016.  
97 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2016.

Orientador(a): Dra. Dinara Jaqueline Moura ;  
coorientador(a): Dra. Jenifer Saffi.

1. anemia de Fanconi. 2. crosslink. 3. dano no DNA. 4. crosstalk. 5. disfunção mitocondrial. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“Presta atenção em seus pensamentos, pois eles se tornarão palavras.  
Presta atenção em tuas palavras, pois elas se tornarão atos.  
Presta atenção em teus atos, pois eles se tornarão hábitos.  
Presta atenção em teus hábitos, pois eles se tornarão seu caráter.  
Presta atenção em teu caráter, pois ele determinará seu destino”.*

- Talmude

*“Troque novamente. Mude, de novo. Experimente outra vez. Você certamente conhecerá coisas melhores e coisas piores do que as já conhecidas. Mas não é isso o que importa. O mais importante é a mudança, o movimento, o dinamismo, a energia. Só o que está morto não muda”.*

- Edson Marques

## AGRADECIMENTOS

À Dinara, por ser minha orientadora e preceptora científica há mais de 7 anos, por me dar oportunidade de seguir a vida acadêmica. Agradeço-te pela paciência e por acreditar em mim, me incentivar e me apoiar nos momentos complicados que passei durante essa etapa. Tenho muito orgulho de ter trabalhado tanto tempo contigo e guardarei com carinho os ensinamentos passados e seguidos de um *“leva pra vida”*.

À professora Jenifer, pela acolhida em seu laboratório, pelos conselhos e preocupação comigo. Pelas fundamentais lições sobre a vida científica ou não. És a prova de que gentileza e sabedoria podem andar juntas na pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, em especial aos professores dos quais fui aluna e aos colegas de mestrado. À Maristela, secretária do PPG, pela disponibilidade, parceria, cafés e vários momentos divertidos. À professora Alethea Gatto

A todos os colegas e visitantes do Laboratório de Genética Toxicológica. Agradeço em especial ao povo do *“zueira sem as boss”*, Bruna Immich, Betânia Ponce, Franciele Busatto, Helena Gloria, Marina Gonzáles, Giovana Baldissera, Rodrigo Veríssimo, Ana Morás e a Victória Viero. À Cristina Winter e a Cassiana Viau, pelo carinho e discussões sobre micronúcleos e *Star Wars*. À Paula Manini, grande amiga e que me auxiliou durante a seleção do mestrado.

Aos amigos, Giovana Biancini, Desirée Marchetti e Bruna Donida, e em especial ao Carlos Eduardo Jacques, atualmente meu colega de doutorado e grande amigo. Obrigada pela amizade e companheirismo.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Celular da UFCSPA: Jéssica Gonçalves, Raquel Beckenkamp, Liliana Naasani, Giuliano Rizzotto, em especial ao Cristiano Rodrigues e a Elizandra Braganhol, pelo apoio e momentos divertidos e os traumáticos.

À Ariane Custódio e ao Josué Putzke, por tornarem os momentos em casa mais divertidos, por me aguentarem e por serem, junto com a Lola, minha segunda família. Ao Otto Nienov e a Michelle Lima, pela parceria boas risadas e drinks.

Aos grandes amigos que a UNISC me deu: Thamires Klein, Augusto Weber, Clara Charlier, Paulo da Rosa, Danielli Dallemole, Fernando Abling e Guilherme Arnhold, em especial à Talise Ellwanger, minha grande amiga e agora companheira de Bioquímica.

À professora Andréia Valim, por ter me ensinado a amar a pesquisa, pelo carinho e confiança. À professora Andréa Gonçalves, obrigada pelos ensinamentos, por me ensinar a trabalhar em equipe e confiado tanto em mim. Serei eternamente grata por tudo que me oportunizaram.

Ao Joel Henrique Ellwanger, meu amigo de longa data, *“dos tempos de UNISC”*. Te agradeço por ser meu parceiro em tantas etapas marcantes, por ser meu melhor amigo e por,

assim como eu, esclarecer todas as incertezas com café. Eu poderia escrever muito mais sobre a nossa amizade, mas vou preservar a nossa dignidade em prol de um futuro promissor (risos).

Ao Jeferson Henn, meu parceiro de UNISC, de trabalho de conclusão de curso, seleção de mestrado, laboratório, ZN, T6 e tantas outras coisas. Eu não saberia descrever o quanto tua amizade significa para mim. Obrigada pelo cuidado comigo, os conselhos, risadas, fofocas, cafés e carinho.

À Nathalia Sperotto, minha colega de mestrado e laboratório, tivemos muitas brigas, mas devo à ti os vários abraços pós tratamento e o cuidado, com teu jeitinho meigo, claro.

À Luiza Steffens, minha fiel escudeira, que me ajudou a desenvolver meu lado didático. Tu é peça fundamental nessa dissertação, com certeza, sem o teu empenho e cuidado com as “*meninas FANCS*” esse trabalho não teria sido concluído. Sou eternamente grata pelo teu cuidado, atenção e maturidade com o nosso, sim nosso, trabalho. Obrigada por ter, além de tudo, se tornado minha grande amiga.

À família Da Rosa, em especial, meus irmãos Asaphe e Mateus, meus amores e maior tesouro. Aos meus pais Ronei e Mari, por terem feito o possível para que eu tivesse as oportunidades que não tiveram, graças aos valores que me passaram, eu segui esse caminho e me tornei quem sou.

À Elisa Tetelbom, pelas conversas, bizarrices em comum, carinho e cuidado nessa etapa.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
1.1 Reparo de danos ao DNA	12
1.2 Sinalização de danos – via da anemia de Fanconi	17
1.3 Anemia de Fanconi (AF) e grupos de complementação	23
1.3.1 Grupo de complementação FA-A	26
1.3.2 Grupo de complementação FA-B	27
1.3.3 Grupo de complementação FA-C	27
1.3.4 Grupo de complementação FA-D1	28
1.3.5 Grupo de complementação FA-D2	29
1.3.6 Grupo de complementação FA-E	29
1.3.7 Grupo de complementação FA-F	30
1.3.8 Grupo de complementação FA-G	30
1.3.9 Grupo de complementação FA-I	31
1.3.10 Grupo de complementação FA-J	31
1.3.11 Grupo de complementação FA-L	31
1.3.12 Grupo de complementação FA-M	32
1.3.13 Grupo de complementação FA-N	32
1.3.14 Grupo de complementação FA-O	33
1.3.15 Grupo de complementação FA-P	33
1.3.16 Grupo de complementação FA-Q	33
1.3.17 Grupo de complementação FA-R	34
1.3.18 Grupo de complementação FA-S	34
1.3.19 Grupo de complementação FA-T	35
1.4 Via da anemia de Fanconi e recombinação homóloga (HR)	36
1.5 Síntese translesão (TLS) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	36
1.6 Disfunção mitocondrial na anemia de Fanconi	37
1.7 Alternativa terapêutica utilizando a via da anemia de Fanconi	39
<b>2. OBJETIVOS</b>	41
2.1 Objetivo Geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
<b>3. ARTIGO DE REVISÃO COM INCLUSÃO DE DADOS: “Strains of assesement lymphoblastic Fanconi anemia in response to effect chemotherapeutic agents”.</b>	43
<b>4. Discussão e considerações finais</b>	79
<b>5. Perspectivas</b>	81
Referências bibliográficas	82

## **Lista de abreviaturas utilizadas**

AF - Anemia de Fanconi (*FA – Fanconi Anemia*)

ATR – Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3 (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*)

ATM - Ataxia telangiectasia mutada (*ataxia telangiectasia mutated*)

ATP - Adenosina tri-fosfatada (*Adenosine tri-phosphate*)

BER – Reparo por excisão de bases (*Base excision repair*)

BRCA1 - Gene 1 de suscetibilidade ao câncer de mama (*Breast Cancer Susceptibility Gene 1*)

BRCA2 - Gene 2 de suscetibilidade ao câncer de mama (*Breast Cancer Susceptibility Gene 2*)

CIS – cisplatina (*cisplatin*)

DCFH – diacetato Dicloro hidro-fluoresceína

DEB – Diepoxibutano

DSBs – quebra de fita dupla (*double strand breaks*)

EFARG – Grupo de Pesquisa Europeu Sobre Anemia de Fanconi (*European Fanconi Anemia Research Group*).

FAAPs – Polipeptídeos associados a Anemia de Fanconi (*Fanconi Anemia Associated Polypeptides*)

GSTP1 - *glutathione S transferase P1*

HR – Reparo por Recombinação Homóloga (*Homologous repair*)

ICL – *interstrand crosslinks*

IFAR – Registro Internacional de Anemia de Fanconi (*International Fanconi Anemia Registry*)

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

MGMT – metilguanina metiltransferase

MMC – Mitomicina C (*mitomycin C*)

MMR – Reparo incompatível (*mismatch repair*)

MMS - metanossulfonato de metila

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

NADPH – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NER – Reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide excision repair*)

NHEJ - Recombinação não homóloga (*Non-homologous end-joining*)

ROS - espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)

SOD - Enzima superóxido-dismutase

SSBs – quebras em simples fita (*single strand breaks*)

SV40 - Vírus símio 40

TLS – síntese translesão (*Translesion synthesis*)

TMO - Transplante de Medula Óssea

XTT - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 2H-tetrazólio-5-carboxanilida

## RESUMO

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença rara caracterizada pela instabilidade cromossômica, falha progressiva da medula óssea e suscetibilidade ao câncer. Dezenove proteínas da via de Fanconi são descritas e responsáveis pela sinalização de danos ao DNA. O objetivo desse trabalho foi analisar a sobrevivência celular, o dano ao DNA e o perfil de ciclo celular de linfoblastos mutados nos grupos de complementação A e C, e da linhagem selvagem (*WT*) na resposta a agentes genotóxicos indutores de *crosslink*. As linhagens mutadas nas proteínas de AF apresentaram maior sensibilidade aos agentes indutores de dano, através de ensaio de azul de tripan e XTT. Também encontramos maior número de células em G1 nas linhagens *FANCA*<sup>-</sup> e *FANCC*<sup>-</sup> após tratamento com agentes genotóxicos, comparadas com a linhagem controle, através de citometria de fluxo. A deficiência de proteínas da via de Fanconi também aumenta o índice de dano no DNA, avaliado através do ensaio cometa. Nós também encontramos maior produção de ROS e dano à membrana mitocondrial nas linhagens deficientes *FANCA*<sup>-</sup> e *FANCC*<sup>-</sup> através de ensaio de DCF e rodamina-123, por citometria de fluxo. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura atual, fortalecendo a ligação da deficiência das proteínas de Fanconi com a suscetibilidade a danos no DNA e disfunção mitocondrial. Sabe-se até agora que a disfunção mitocondrial tem importante papel para o acúmulo de ROS e morte celular, que leva a apoptose e piora do quadro clínico da doença, com falha da hematopoiese e leucemia, entre outros tipos de câncer. A melhor compreensão da via de Fanconi, dos mecanismos funcionais dessas proteínas e o *crossstalk* com outras vias de reparo podem ajudar na compreensão e desenvolvimento de métodos para a prevenção do câncer.

**Palavras-chave:** anemia de Fanconi; *crosslink*; dano ao DNA; *crossstalk*; disfunção mitocondrial.

## ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare disease characterized by chromosomal instability, progressive bone marrow failure, and cancer susceptibility. Nineteen proteins from Fanconi pathway are encoded and responsible for DNA damage signaling. The aim of this study was to analyze cell survival, DNA damage, and cell cycle profile of lymphoblasts mutated in complementation groups A and C, and of wild type (WT) in response to genotoxic crosslink-inducing agents. Both strains mutated in the FA proteins had higher sensitivity to damage-inducing agents by trypan blue test and XTT. We also found a greater number of cells in G1, when evaluated these lines compared with the control strain by flow cytometry. Deficiency of proteins from Fanconi pathway also increases the DNA damage index, assessed by the comet assay. We also find and increased production of ROS damage to mitochondrial membrane of deficient strains via DCF assay and 123-rhodamine by flow cytometry. The results obtained with the applied methodologies are in accordance with the literature and are well described in other studies, strengthening the connection between the deficiency of Fanconi proteins with susceptibility to DNA damage and mitochondrial dysfunction. It is known by now that mitochondrial dysfunction plays an important role in the accumulation of ROS and cell death that leads to apoptosis and worsening of clinical outcome of the disease, with failure of hematopoiesis and leukemia, among other cancers. A better understanding of Fanconi pathway, the functional mechanisms of these proteins and crosstalk with other repair pathways might help in the comprehension and development of methods for the prevention of cancer.

**Keywords:** Fanconi anemia; crosslink; DNA damage; crosstalk; mitochondrial dysfunction.

## 1. INTRODUÇÃO

As lesões no DNA podem levar a alterações estruturais nas bases nitrogenadas, purinas e pirimidinas. Essas alterações podem ser consequência da exposição solar ou à radiação ionizante, ação de espécies reativas do oxigênio (ROS) ou pela interação com substâncias químicas de origem natural ou sintética. Além disso, o processo de replicação do DNA, na divisão celular, é propenso a erros devido à quantidade de bases incorretas adicionadas pela DNA polimerase, sendo um importante fator na determinação da taxa de mutação espontânea de um organismo. Apesar da DNA polimerase ter capacidade para reconhecer e corrigir estes erros, algumas bases incorretamente pareadas permanecem, gerando mutações. Importante ressaltar que, embora, estes erros possam introduzir mutações no genoma, também contribuem para a variabilidade genética e vantagem evolutiva (CHURCHILL *et al.* 2016).

Danos na estrutura do DNA podem ser por formação de sítios abásicos (sítios AP), quebras simples (SSBs - *single strand breaks*) ou duplas (DSBs - *double strand breaks*) na fita, entre outro. Os sítios abásicos são gerados espontaneamente, pela formação de adutos instáveis na base ou pelo reparo por excisão. As quebras podem ocorrer pela interação de agentes químicos ou físicos diretamente à ligação fosfodiéster, pelo bloqueio no processo de replicação ou pela ação de enzimas específicas com funções de reparação ou que atuam no metabolismo geral do DNA (CALDECOTT 2008; KASS e JASIN, 2010). Alguns trabalhos descrevem que existe menor toxicidade das SSBs, associada com a rápida reparação desses danos. Já a deficiência no reparo desse tipo de lesão pode levar a ocorrência de patologias, como a ataxia espinocerebelar, entre outros processos neurodegenerativos (EL-KHAMISY e CALDECOTT 2007; CALDECOTT, 2008). As lesões do tipo DSBs são consideradas mais tóxicas para a célula e quando não reparadas corretamente podem originar mutações e rearranjos cromossômicos, características da instabilidade genética, podendo acarretar na perda de cromossomos e na morte celular. Além disso, as DSBs podem surgir como intermediários nos processos de reparo de outras lesões (DUDÁS e CHOVANEC, 2004).

Modificações das bases são as alterações mais comuns encontradas na molécula de DNA e podem ser graves quando não reparadas corretamente. Esse tipo de lesão é originado através da interação do agente com a molécula de DNA. As bases modificadas mais prevalentes são a O-6-metilguanina e timina-glicol, além de oxidação, redução e perda de bases, geradas por ROS, radiação ionizante e compostos químicos. Alguns agentes químicos são capazes de formar ligações covalentes entre diferentes bases (adutos). Estes adutos são compostos eletrofílicos com afinidade por centros nucleofílicos de macromoléculas orgânicas e muitas vezes são considerados carcinogênicos. As lesões causadas pela formação deste tipo de lesão podem ser

do tipo: (i) adutos monofuncionais, quando o agente interage com apenas um centro nucleofílico no DNA, e (ii) bifuncionais (ou multifuncionais) quando os agentes apresentam dois grupamentos reativos capazes de reagir com dois sítios no DNA. Essa reação pode ocorrer na mesma fita, sendo chamada de intracadeia (*intrastrand*) ou em fitas diferentes, recebendo o nome de intercadeia (*interstrand*), formando ligações ou pontes cruzadas conhecidas como *crosslinks* ou ICLs (SCHÄRER, 2005).

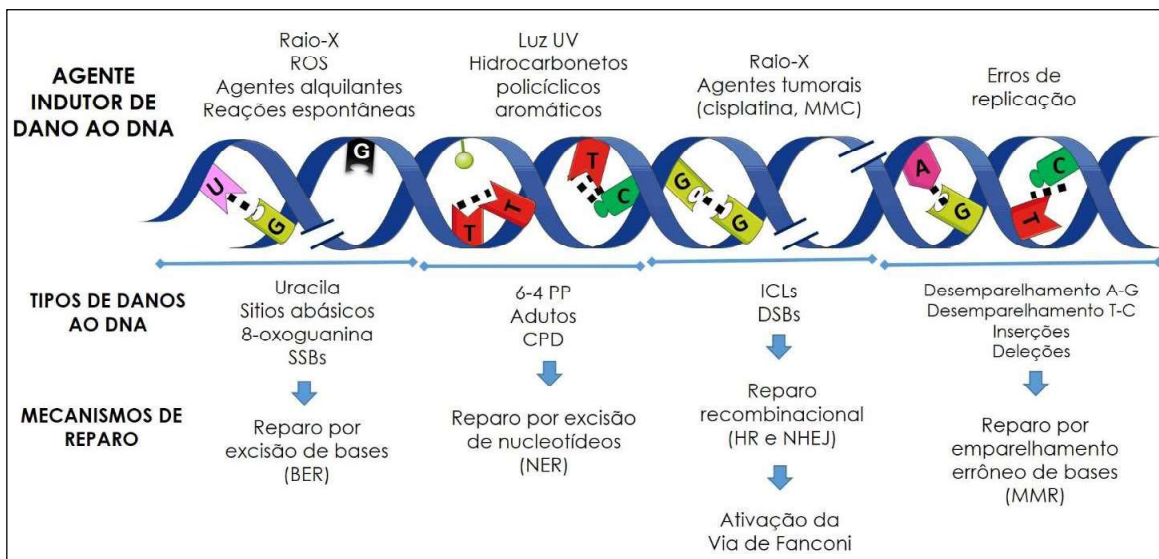
Agentes alquilantes, como o metil metanosulfonato (MMS), poluentes ambientais e alguns compostos de importância médica, como cisplatina (CIS), diepoxibutano (DEB) e mitomicina C (MMC) têm a capacidade de gerar uma série de adutos de DNA, incluindo ligações cruzadas ou ICLs. Apesar de todos os tipos de adutos afetarem no metabolismo celular, as ICLs são particularmente mais citotóxicas porque impedem a separação da dupla fita, levando ao bloqueio de processos essenciais como a transcrição e a replicação de DNA. Apesar de representarem uma pequena parcela de todos os adutos formados por esses agentes, elas acabam sendo fisiologicamente mais importantes, e sua reparação é extremamente necessária para a sobrevivência e manutenção da homeostase celular (FU, CALVO E SAMSON, 2012).

As vias de reparo atuam de maneira coletiva, modulando a sensibilidade aos agentes alquilantes por meio de uma sobreposição de substratos, vias de compensação, processamento intermediários, rotas alternativas ou através da interação direta entre vias. Tendo em vista essas características, agentes como a CIS e as nitrosuréis são amplamente empregadas na terapia anticâncer (KELLAND, 2007; CARRILLO e MUNOZ, 2012). No entanto, a resistência tumoral a esses agentes tem sido encontrada em pacientes em tratamento crônico com quimioterápicos, em grande parte devido às vias de reparo de adutos de DNA e tolerância a lesões. A CIS pode ligar-se a molécula de nitrogênio da posição 7 de purinas, formando adutos do tipo ligação cruzada, levando ao bloqueio da replicação e transcrição, parada de ciclo, que pode resultar em morte celular por apoptose (GALLUZZI *et al.* 2012).

### **1.1 Reparo de danos no DNA**

O reparo de danos no DNA é um processo bioquimicamente complexo, pois envolve inúmeras proteínas com funções distintas. Esses mecanismos de reparação celular possuem várias etapas e são capazes de remover rapidamente diversos tipos de lesões da molécula de DNA. Em eucariotos, existe uma sobreposição funcional entre as vias de reparação, dessa forma vários complexos ou conjuntos de proteínas atuam ao mesmo tempo em diferentes tipos de danos. A conexão e interdependência entre essas vias garantem maior agilidade no reparo de lesões (SCHÄRER, 2003; TELL e WILSON 2010).

Da mesma forma que diferentes tipos de danos no DNA ocorrem e são reparados de formas distintas, também existem vias de reparação que atuam de acordo com o tipo de lesão. Certas lesões podem ser removidas por processos simples, como na reparação direta por enzimas. Danos que levam a modificações na estrutura de DNA podem ser reparadas por mecanismos de excisão da fita de DNA, como no reparo por excisão de nucleotídeos (NER – *nucleotide excision repair*), o reparo por excisão de bases (BER – *base excision repair*), e o reparo do emparelhamento errôneo de bases (MMR – *mismatch repair*). Os danos do tipo quebras simples e dupla de DNA são normalmente reparados através da recombinação homóloga (HR – *homologous recombination*) ou não homóloga (NHEJ – *non-homologous end joining*) (MORAES *et al.* 2012). Outras lesões, como as ICLs, necessitam da atuação de duas ou mais vias de reparo atuando simultaneamente, isso inclui a ativação das proteínas da via de Fanconi, NER, HR e síntese translesão (TLS – *translesion synthesis*) (McCABE, OLSON E MOSES, 2009). Estão representadas na Figura 1 as principais vias de reparo de DNA associadas ao tipo de lesão.



**Figura 1.** Representação esquemática dos mecanismos de reparo existentes em relação as lesões causadas ao DNA e os principais agentes indutores. A figura ilustra os danos ao DNA mais comuns gerados por diferentes agentes e seus respectivos mecanismos de reparo, exceto o mecanismo de reparo direto. Sabe-se que o processo de reconhecimento da lesão até seu reparo abrange mecanismos complexos e a integração de diferentes vias, sendo impossível representar toda a complexidade desse sistema no esquema acima. Figura adaptada de Hoeijmakers (2001).

O primeiro grupo de mecanismos de reparo é o processo de reparo direto, onde a enzima reconhece e converte a lesão. Esse grupo inclui a fotoreativação, catalisada por enzimas pertencentes à família de fotolases, responsáveis pelo reparo direto de lesões causadas por luz ultravioleta (UV), como os dímeros de pirimidina e 6,4 - fotoprodutos (6,4 – PP) (CHARTON *et*

al, 2015), e a reversão de bases alquiladas, catalisadas por enzimas DNA-metiltransferases, como a DNA metilguanina metiltransferase (MGMT) (CHRISTMANN *et al.* 2003).

As fotoliasas são enzimas conservadas em três domínios de classificação dos organismos vivos, não estando presentes em todas as espécies, diferentemente da MGMT, cuja distribuição é quase universal na natureza. Os mamíferos placentários, embora não apresentem fotoliasas, possuem duas proteínas com semelhança de sequência e estrutura, mas sem função de reparo. Estas proteínas são denominadas de criptocromos e funcionam como fotorreceptores para regular o ciclo circadiano nesses animais (RASTOGI *et al.* 2010). A enzima fotoliase liga-se as lesões, como dímeros de pirimidina ou 6-4PPs, monomeriza o anel de ciclobutano da pirimidina, utilizando a energia da luz visível, dessa forma protege o genoma dos efeitos deletérios da radiação UV (ESSEN e KLAR, 2006). A MGMT tem papel importante no metabolismo de agentes alquilantes, sendo responsável por reparar lesões no DNA intermediárias do metabolismo desses agentes (KAINA *et al.* 2007). Alguns agentes alquilantes são utilizados como quimioterápicos para o tratamento de diferentes tipos de câncer e a atividade e expressão alterada de MGMT, em tumores, tem sido associada à resistência tumoral a essas drogas (KAWAI *et al.* 2006; JOHANNESSEN e BJERKVIG, 2012).

O segundo grupo abrange os mecanismos de reparo baseados no processo de excisão da fita como o NER, que atua no reconhecimento e na remoção de lesões que provocam distorções na hélice (ROUILLON e WHITE, 2011). Deste grupo, ainda fazem parte o BER, que remove bases alteradas; e o reparo por NHEJ, que age monitorado e removendo bases pareadas defeituosamente. O NER é dividido em Reparo do Genoma Global (GGR – *Global Genomic Repair*), que remove lesões presentes em regiões não transcritas do genoma, e o Reparo Acoplado à Transcrição (TCR – *Transcription Coupled Repair*), que atua em regiões lesadas do DNA que possuem genes ativos transcricionalmente. A maior diferença entre essas vias ocorre durante o reconhecimento da lesão. No GGR, o reconhecimento da lesão é realizado pelo complexo proteico XPC-hHR23B, aliado à ação da XPE-DDB2. No TCR, o reconhecimento é feito através do bloqueio da RNA polimerase II ao encontrar a lesão, e pela ação das proteínas CSA e CSB, que atuam reconhecendo a distorção do DNA e dissociando a RNA polimerase II da região do dano, para em seguida recrutar outras moléculas da via NER. Após, ocorre o recrutamento XPA, XPG, TFIIH e RPA para a região da lesão, formando o complexo pré-incisão. As proteínas XPD e XPB também se unem a esse complexo e atuam como helicases na abertura das fitas. A próxima etapa envolve a excisão das fitas pelas endonucleases ERCC1-XPF (direção 5'-3') e XPG (3'-5'). A síntese do DNA excisado utilizando a outra fita como molde ocorre em seguida e depende da atividade de RPA, RFC, PCNA e das DNA polimerases  $\epsilon$  e  $\delta$ , este

processo é completado pela ação da DNA ligase I responsável pela ligação das fitas (VERMEULEN, 2011).

O BER é iniciado por uma glicosilase que remove a base modificada formando um sítio abásico AP (AP-apurínicos/apirimídicos) no DNA. As glicosilases são específicas para o reconhecimento de bases oxidadas ou reduzidas, bases desaminadas, alquiladas (geralmente pelo grupo metila), ausentes ou pareadas erroneamente. Após remover a base, uma AP endonuclease reconhece a região e cliva a cadeia em locais adjacentes à base perdida. Uma DNA polimerase é recrutada para preencher a região clivada, de acordo com a informação fornecida pela fita complementar íntegra. Por fim, a fita corrigida é selada por uma DNA ligase (Robertson *et al.* 2009).

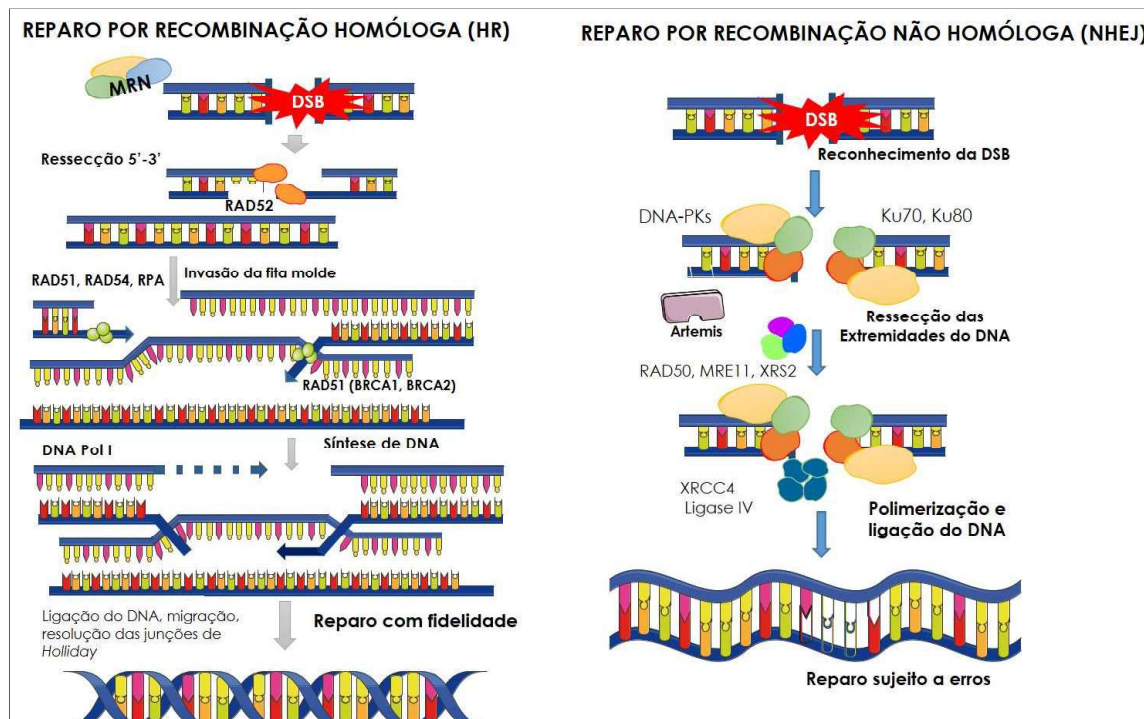
O MMR é responsável por corrigir bases mal pareadas que são introduzidas por erros de replicação do DNA. Tanto as vias de reparação direta quanto a de excisão são essenciais para a remoção de bases modificadas e adutos formados por agentes alquilantes, de forma que respondem por grande parte da atividade de reparação do DNA na célula (MEMISOGLU e SAMSON, 2000). Mesmo apresentando alta fidelidade na replicação de DNA, algumas bases são emparelhadas incorretamente de forma espontânea ou por metilação, oxidação, desaminação ou erros de replicação. Esse mecanismo também está envolvido no reparo de bases mal pareadas induzidas por agentes químicos. Com a finalidade de preservar a íntegridade do DNA, o MMR atua exclusivamente na fita nova que está sendo sintetizada, por isso a diferenciação entre esta e a fita molde é essencial. Essa diferenciação ocorre tanto em procariotos quanto em eucariotos. Em procariotos, ocorre através de uma endonuclease inicial no processo de metilações presentes na fita molde. Já nos eucariotos, a identificação da nova fita ocorre através da identificação dos fragmentos de Okazaki, que não estão na fita molde (SAFFI *et al.* 2003; IYAMA e WILSON, 2013).

Os mecanismos recombinacionais, HR e NHEJ, atuam no reparo de quebras duplas na fita de DNA. A decisão sobre qual via irá atuar está ligada ao tipo de dano e com o a fase do ciclo celular em que a célula se encontra (COSTES e LAMBERT, 2012). Durante a HR, a molécula de DNA da cromátide irmã íntacta é utilizada como molde para reparar com fidelidade as DSBs que se formam nas células mitóticas, em consequência do colapso da forquilha de replicação de DNA, ou em decorrência de mecanismos de reparo de bases modificadas ou adutos (COSTES e LAMBERT, 2012). Essa também é uma via importante para a manutenção dos telômeros durante a meiose, sendo indispensável na conexão física entre cromossomos homólogos, garantindo a disjunção correta dos mesmos na primeira divisão meiótica. Além disso, contribui na geração de variabilidade genética observada nos gametas, através da alta frequência de

recombinação meiótica nessas células (KROGH e SYMINGTON, 2004). A HR atua preferencialmente nas fases S e G2 do ciclo, quando uma fita molde está disponível, enquanto que a via NHEJ é atuante em todas as fases do ciclo, principalmente em G1, quando a cromátide irmã não está disponível para HR (HAKEM, 2008).

A via de HR, representada na Figura 2, inicia-se pela etapa de reconhecimento da lesão, através da proteína sensora de danos ATM e pelo complexo MRN (Mre11/Rad50/Nbs1). Em seguida, ocorre o recrutamento de moléculas para o local da lesão e a ATM fosforila a histona H2AX e outros substratos incluindo a Mdc1, Nbs1, p53 e Chk2. Proteínas envolvidas no controle de ciclo celular são ativadas gerando a parada no ciclo. Há então o processamento da extremidade 3' pela ressecção da fita na direção 5' – 3', promovida pelo complexo MRN. Ocorre à formação de extremidades livres invasivas, que serão usadas na procura de uma molécula homóloga a ser usada como molde. Quando as extremidades de fita simples 3' estão disponíveis, a proteína Rad51 liga-se e inicia-se o evento de invasão de uma fita homóloga, mediada por Rad54 e RPA, responsáveis pela eliminação de estruturas secundárias na região terminal 3'. Uma DNA-polimerase adiciona nucleotídeos na região 3' terminal da fita danificada, com base nas informações da fita intacta. Após a extensão, as extremidades livres são reunidas pela DNA-ligase I. Esse processo gera junções, chamadas de "*Holliday junction*" (junções Holliday), que necessitam ser clivadas para o reparo completo (SCHÄRER, 2003; KROGH e SYMINGTON, 2004). A resolução das junções *Holliday* é realizada pelas endonucleases Mus81 e Mus4, que clivam essas regiões e ligam as fitas para a restauração completa da molécula de DNA. O resultado final da resolução dessas junções pode ser ou não a permuta de fitas (*crossover*), especialmente durante o processo de recombinação meiótica (KROGH e SYMINGTON, 2004). As proteínas BRCA1 e BRCA2 também atuam em HR, mas o papel dessas proteínas ainda é discutido. Em resposta às DSBs, a proteína BRCA1 é ativada através da fosforilação por ATM, ATR (ataxia-telangiectasia associada a Rad3) e Chk2, e atua sobre outras proteínas de reparo. BRCA2 se liga a Rad51, auxiliando na atividade dessa proteína (LOMONOSOV *et al.* 2003). NHEJ ao contrário de HR, não necessita de um molde homólogo e parece ser a via predominante para o reparo de DSBs em mamíferos (Figura 2). A via NHEJ é iniciada pelo heterodímero Ku70/Ku80, que seletivamente se liga à extremidade do DNA e recruta a proteína quinase DNA-PK. Essa proteína é capaz de fosforilar a si mesma e a outros substratos, incluindo Ku70/Ku80, Xrcc4 e p53. O complexo Ku70/Ku80 protege as extremidades do DNA contra a degradação e sinaliza a região de dano para os demais componentes da via. A ligação entre as duas extremidades do DNA requer a presença dos complexos MRN e Xrcc4/DNA-ligase IV, podendo ambos interagir com o complexo Ku70/ku80. O reparo é finalizado com o processamento da fita

e ligação das extremidades, através da ação das proteínas *Flap* endonuclease 1, Artemis, Xrcc4 e a DNA ligase IV (MILNE *et al.* 1996; JACKSON, 2002).



**Figura 2.** Esquema das vias de reparo de DSBs por HR e NHEJ em eucariotos superiores. Na HR o dano é reconhecido e a extremidade 3' é ressectada pelo complexo MRN (Rad50/Mre11/Nbs1). Uma molécula de DNA homóloga é pareada e após invadida por Rad51, que interage com a BRCA1 e BRCA2. A síntese e a ligação do DNA ocorrem com a formação de junções *Holliday*, que serão resolvidas através da ação de Mus81. Em NHEJ, o processo também se inicia pelo reconhecimento do dano pelas proteínas KUs, que se ligam a fita e recrutam as cinases DNA-PKs. Após Xrcc4, juntamente com a DNA-ligase IV, se reúne ao complexo proteína-DNA. Xrcc4 é fosforilada pelas DNA-PKs. A DNA-ligase IV promove a religação entre as extremidades do DNA livre. O complexo Mre11/Rad50/Nbs1 pode atuar no processamento após a ligação. Figura adaptada de Jackson (2002).

## 1.2 Sinalização de danos - via da anemia de Fanconi

Além das vias já mencionadas, existe ainda uma via adjacente responsável pelo reparo de lesões do tipo ICL, chamada de via de Fanconi. Adicionalmente, o reparo de ICL envolve diferentes mecanismos de reparo, como NER, HR e TLS. A fase crucial para o reparo dessas lesões parece ser a fase de Síntese (S), pois nela ocorre a replicação do DNA e a passagem da maquinaria de replicação pela região do dano está associada ao mecanismo inicial de reconhecimento das ICLs (MUNIANDY *et al.* 2010).

A replicação do DNA de maneira fiel exige vários fatores, incluindo as proteínas da via de Fanconi. Com a passagem da maquinaria de replicação é gerado um sítio de alta instabilidade genética, levando a formação de DSBs através de processos ainda não bem elucidados. Ocorre a excisão das fitas pela ação das enzimas XPF/Ercc1 e, possivelmente, outras nucleases podem atuar nessa etapa, como a Mus81-Eme1. Após a etapa de reconhecimento e incisão, ocorre a formação de DSBs, que podem ser reparadas por diferentes processos, envolvendo reparo por recombinação ou a TLS. O recrutamento dessas vias parece ser dependente da atuação de proteínas da via de Fanconi (CROSSAN E PATEL, 2012). Deficiências em proteínas desta via estão associadas com a Anemia de Fanconi (AF), doença caracterizada pela alta frequência de ICLs espontâneos, instabilidade cromossômica e falha progressiva da medula óssea (PICHIERRI *et al.* 2003).

Até o momento 19 genes (FANCA-T), com seus respectivos grupos de complementação, estão associados com o desenvolvimento da AF, constituindo a via de Fanconi, que sinaliza danos do tipo ICLs, principalmente durante a replicação (Figura 3). As proteínas podem ser organizadas dentro de três grupos: I – complexo ou núcleo de Fanconi; II – complexo FA-ID, e III – proteínas com função na jusante de FANCD2 (Rocco *et al.*, 2014).

O grupo I é formado por oito proteínas, FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF/XRCC9, FANCG, FANCL/PHD9 e FANCM, além de três proteínas associadas a FAAP20, FAAP24 e FAAP100, sendo todas subunidades do complexo chamado de núcleo de Fanconi (FA core). As proteínas do núcleo de Fanconi interagem entre si e esta interação é necessária para manutenção da estabilidade deste complexo. As proteínas FANCA, FANCE, FANCG e FANCM junto com FANCT/UBE2T e a FANCL, essas duas associadas a jusante de FANCD2, fazem parte do complexo da ligase E3, através do domínio de FANCL, e são fosforiladas em resposta a dano no DNA e encaminhadas para a região da lesão. A fosforilação é dependente de ATR, uma cinase de controle de ciclo celular, que é ativada por estresse de replicação. Uma das principais funções deste complexo é ubiquitinar as proteínas FANCD2 e FANCI, sendo este o passo principal da via da AF (CROSSAN e PATEL, 2012; BOISVERT e HOWLETT, 2014; HODSON *et al.* 2011; HODSON *et al.* 2014; SCHWAB *et al.* 2015). A proteína FANCM inicia a via, formando um complexo com a FAAP24 e MHF1 e MHF2. As histonas MHF1 e MHF2 facilitam a associação da FANCM à cromatina, bem como a sua migração ao longo da fita de DNA. O complexo formado por FANCM - FAAP24 - MHF1 - MHF2 desempenha vários papéis na ativação da via, reconhecendo a lesão do DNA e recrutando o núcleo de proteínas AF, estabilizando a forquilha de replicação parada e recrutando a proteína ATR para mediação do *checkpoint* (SCHWAB *et al.* 2010).

O grupo II é formado pelas proteínas FANCD2 e FANCI, as quais interagem entre si para formar o complexo FA-ID. Uma vez que o complexo principal é ativado, pela detecção de uma ligação cruzada no DNA pela FANCM, ele passa a exercer a sua função principal que é a ubiquitinação das proteínas FANCD2 e FANCI.

A ubiquitinação ocorre através das enzimas E1, E2, E3. A enzima E1 ativa a molécula de ubiquitina através da hidrólise de ATP e transfere esta molécula para E2, que é uma ubiquitina conjugase. A enzima E3 tem atividade ubiquitina ligase e é capaz de transferir à molécula de ubiquitina conjugada para o substrato, conferindo também especificidade a ligação. A E2 ubiquitina conjugase que leva à ubiquitinação da FANCD2 é a enzima UBE2T (Ubiquitine-conjugating Enzyme 2T) e a proteína FANCL apresenta o domínio PHD tipo "*RING finger*", que tem atividade E3 ligase. A associação de E3 com FANCL permite a transferência direta da ubiquitina conjugada com a E2 (UBE2T) para o domínio específico do substrato, que é a FANCD2. Após ubiquitinado, o complexo FA-ID tem a capacidade de reconhecer as estruturas de DNA que vão sendo liberadas da forquilha de replicação e a ubiquitinação específica de FANCD2, é um sinal para o recrutamento das proteínas com afinidade pela ubiquitina que atuam na jusante, diretamente no reparo do DNA (KOTTEMANN, SMOGORZEWSKA, 2013; LONGERICH *et al.* 2014).

Após a ubiquitinação, o complexo FA-ID é localizado nas regiões de dano do DNA, onde coordena o reparo da ICL junto com outras proteínas acopladas a jusante (FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP1, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51c, FANCP/SLX4). Alguns trabalhos sugerem que a ubiquitinação de FANCD2 é necessária para o processo de reparo de ICLs, enquanto a ubiquitinação de FANCI providencia um mecanismo regulador da via, acentuando a capacidade de reparo (BOGLIOLO *et al.* 2007). Entre as proteínas de reparo que são recrutadas após a ubiquitinação de FANCD2, estão NBS1 e RPA, envolvidas em mecanismos de recombinação homóloga, e REV1, envolvida na atividade da TLS (WANG e D'ANDREA 2004).

Várias nucleases, como a FAN1 (nuclease 1 associada a AF) e a FANCP/SLX4 se ligam a região da lesão afim de iniciar a incisão nucleotídica. Estas proteínas contêm um domínio de ligação de ubiquitina única (UBD) chamado a UBZ4 que pode reconhecer especificamente a porção ubiquitina da FANCD2 (HUANG E D'ANDREA 2010; YAMAMOTO *et al.* 2011). Associada a nuclease FANCP/SLX4, o complexo ERCC1- MUS81-EME1 promove o desengate do gancho das ligações transversais (CICCIA *et al.* 2008). O processo de desengate converte a forquilha de replicação paralisada em uma DSB de DNA. A DSB é então reparada por HR, enquanto que o NER atua sobre os adutos restantes. As proteínas da via de Fanconi ligadas a jusante da fita, FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP1, FANCN/PALB2 e FANCS/BRCA1 têm um papel importante no

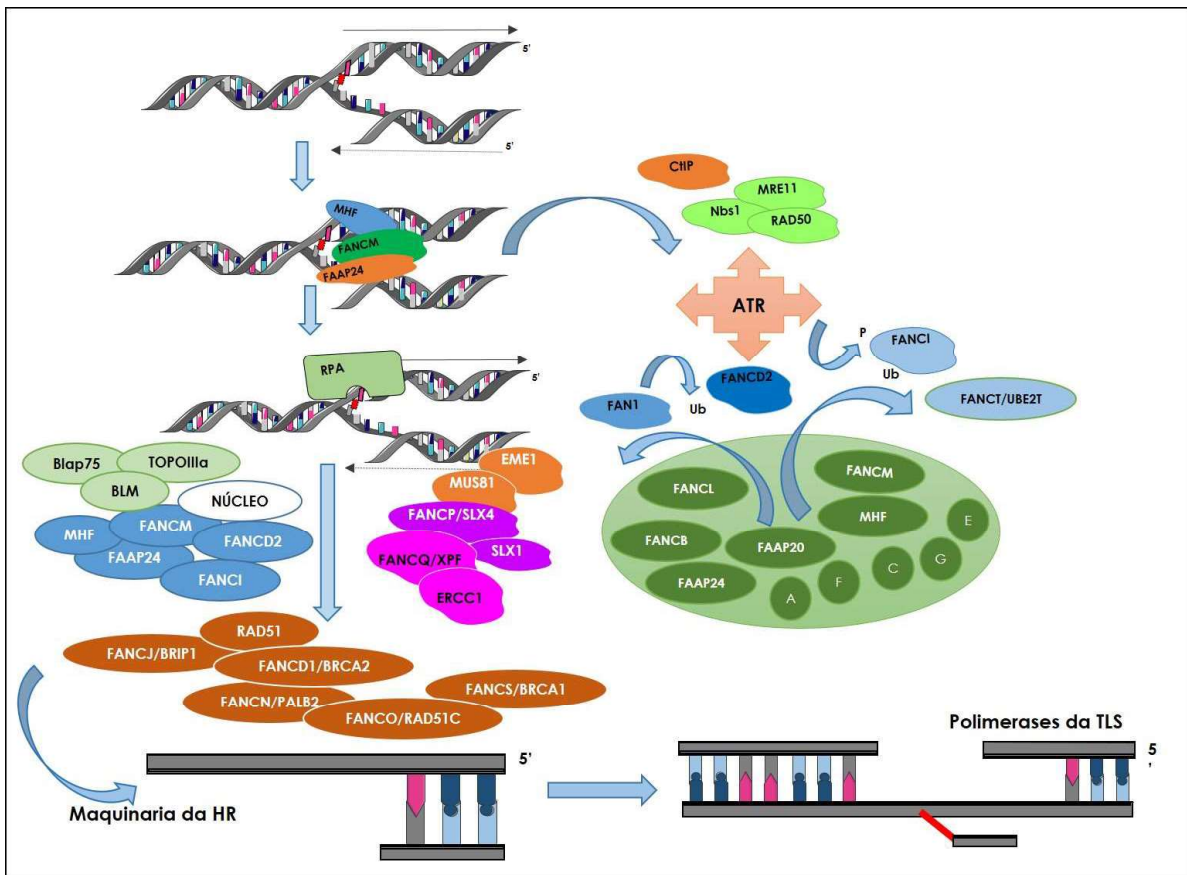
processo HR. Algumas destas proteínas, como mencioando anteriormente, auxiliam a proteína RAD51. Para finalizar, o complexo FA – ID é desubiquitinado pela enzima USP1 (ubiquitina-1 peptidase específica) (NIJMAN *et al.* 2005; KIM *et al.* 2013).

Da mesma forma, alguns membros do núcleo de Fanconi, FANCD2 e FANCI podem ser fosforiladas pelas proteínas de sinalização ATR e ATM (SMOGORZEWSKA *et al.* 2007; KOTTEMANN e SMOGORZEWSKA, 2013; BOISVERT e HOWLETT, 2014). A proteína FANCD2 ubiquitinada atua no recrutamento de outras proteínas envolvidas em processos de reparação de DNA para este local ou foco de reparação de DNA, tais como Rad51, Nbs1 e RPA, envolvidas em mecanismos de recombinação homóloga e Rev1, envolvida em mecanismos de TLS (WANG e D'ANDREA, 2004; BOGLIOLO *et al.* 2007; LONGERICH *et al.* 2014). Alguns estudos já demonstraram que FANCD2 está localizada em sítios de parada de forquilha de replicação e que este posicionamento é dependente de  $\gamma$ H2AX, forma fosforilada da histona modificada H2AX, a qual especificamente se associa as regiões no DNA com quebra dupla (BOGLIOLO *et al.* 2007; KALB *et al.* 2007; NAKANO *et al.* 2009; SHEN *et al.*, 2009).

O grupo III é formado pelas proteínas FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP1, FANCN/PALB2, FANCR/RAD51 e FANCS/BRCA1. Células que são defectivas em algumas dessas proteínas apresentam ubiquitinação normal de FANCD2, indicando que estas proteínas funcionam a jusante do complexo ID ou em uma via paralela (WANG, 2007; SAWYER *et al.* 2015). Uma importante característica do grupo III é sua conexão com câncer de mama. A primeira evidência para isso foi à identificação de que o gene FANCD1 é na verdade BRCA2. BRCA2, juntamente com BRCA1/FANCS, representam os dois principais genes supressores de tumores, sendo que mutações nos mesmos estão correlacionadas a câncer de ovário e mama (GAMBINO *et al.* 2015; PRAKASH *et al.* 2015). Acredita-se que as proteínas FANCD1 e FANCN/PALB2 participem do processo de recombinação homóloga em função da sua interação com a proteína RAD51/FANCR (JACQUEMONT E TANIGUCHI, 2007). Esta interação parece induzir a formação de oligômeros de RAD51 sobre a fita simples de DNA, um passo chave na recombinação homóloga (KAGAWA *et al.* 2014).

A exata função da via de Fanconi após danos no DNA e a parada da forquilha de replicação ainda é incerta. Entretanto, como descrito acima, fica claro que esta via atua na coordenação de vários aspectos em resposta a danos no DNA, incluindo processamento enzimático direto de DNA, recrutamento de proteínas envolvidas em recombinação homóloga e síntese translesão e também na ativação de parada de ciclo celular (MUNIANDY *et al.*, 2010; KIM e D'ANDREA, 2012). As proteínas FANCI e FANCM contêm domínios de helicase e podem interagir diretamente com o DNA, auxiliando no processamento de lesões. Além disso, a proteína FANCD2 ubiquitinada se

co-localiza com a proteína NBS1, um componente do complexo MRN, formado pelas proteínas MRE11, RAD50 e NBS1, requerido para o processamento de DNA no reparo por HR. Adicionalmente, algumas evidências sugerem que a proteína FANCC, auxilia na correta montagem sub-nuclear do complexo MRN por interação com a proteína MRE11 (PICHIERRI *et al.* 2002; CHU *et al.*, 2009). Alterações da via de Fanconi estão associadas com falha do complexo MRN para formar sítios onde ocorre dano no DNA (PICHIERRI *et al.* 2002; BOISVERT *et al.* 2014).



**Figura 3.** Esquema mostrando as etapas mais importantes na sinalização da via de Fanconi. A sinalização começa com o recrutamento de FANCM, FAAP24, e MHF com a parada da forquilha de replicação devido a DSB. FANCM remodela a forquilha e recruta de RPA, a proteína de ligação de simples fita de DNA. RPA acoplada ao DNA ativa ATR que fosforila vários alvos, incluindo as componentes do complexo de MRN, FANCD2 e FANCI. Os associados ao complexo MRN está CtIP, que auxilia na ressecção das fitas. O núcleo de FA ainda inclui: FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM, FAAP20, FAAP24 e MHF, usando FANCM, FAAP24 e MHF se vincular ao DNA. O núcleo de Fanconi estimula FANCL na ubiquitinação de FANCD2 e FANCI. Dessa forma, MUS81-EME1 e ERCC1-XPF / FANCP / SLX4 são recrutados para A região do dano através da interação com FANCP / SLX4. O núcleo de Fanconi e FANCD2- FANCI são recrutados para a cromatina onde facilitam a resolução do reparo por intermédio das polimerases TLS (REV1-POL $\zeta$ -

POL $\eta$ ) e da maquinaria da HR (FANCI / BIP1 / Bach1, FANCD1 / BRCA2, RAD51, FANCN / PALB2, FANCO / RAD51C e BRCA1).

Em resposta a danos no DNA, após o processamento de danos do tipo pontes intercadeias por nucleases têm-se a geração de quebras duplas no DNA, que podem ser reparadas por recombinação homóloga. Como já mencionado no parágrafo anterior, FANCD2 ubiquitinada se co-localiza com  $\gamma$ H2AX um marcador de quebras duplas no DNA, indicando um papel para via de Fanconi no reparo deste tipo de dano no DNA. Além disso, FANCD2 ubiquitinada associa-se com BRCA1, BRCA2/FANCD1, FANCR/RAD51 e NBS1, proteínas envolvidas diretamente no mecanismo de HR (HUSSAIN *et al.* 2004; HOWLETT *et al.* 2005). A TLS pode ser uma alternativa à recombinação homóloga em ordem para restabelecer a forquilha de replicação ou pode trabalhar em conjunto com a via de recombinação homóloga na resolução de certos tipos de danos no DNA. Sabe-se que a polimerase translesão REV1 e FANCD2 ubiquitinada estão co-localizadas no núcleo, o que sugere uma possível interação entre elas. Outra evidência é que a via de TLS e a via da AF terminam pela ação da mesma enzima de desubiquitinação, USP1, indicando uma possível regulação coordenada (LEE *et al.* 2010). O envolvimento da via de AF no controle do ciclo celular é representado pela resposta à parada da forquilha de replicação, que envolve primeiramente a fosforilação de cinases de resposta a danos no DNA, como CHK1, mediada pela proteína ATR. Como dito anteriormente, ATR atuaria fosforilando as proteínas FANCD2 e FANCM, e CHK1 seria responsável pela ativação de proteínas do núcleo de Fanconi. Existem evidências que a via de Fanconi atue também em um segundo ponto de checagem da fase S, o intra-S-checkpoint. Nesta via, ATM atuaria fosforilando FANCD2, em um processo que também depende de NBS1, membro do complexo MRN, mas independente da ubiquitinação de FANCD2 (LEE *et al.* 2010; LUKE-GLASER *et al.* 2010).

Nos últimos anos, muito se tem estudado sobre a via de Fanconi no reparo de DNA. Muitos desses estudos esclareceram o caminho e a função dos 19 grupos de complementação na via de sinalização de danos, porém a forma como essas proteínas traduzem os diferentes fenótipos da doença ainda não foi esclarecida (DONG *et al.* 2015; PAGANO *et al.* 2014; SHYAMSUNDER *et al.* 2015)

### **1.3 Anemia de Fanconi (AF) e grupos de complementação**

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara descrita inicialmente pelo médico suíço Guido Fanconi em 1927. O padrão de herança é autossômico recessivo na maioria dos casos, sendo raramente ligado ao cromossomo X, associado ao grupo B (FANCB). Pacientes

com AF apresentam uma grande heterogeneidade clínica, apresentando anomalias físicas constitucionais como a pigmentação cutânea anômala (manchas do tipo “café com leite” – 58,4 % dos casos), déficit pondero-estatural (60,9%), anomalias estruturais do eixo radial (51%), microcefalia (37%) e microftalmia (38,1%). Esses sintomas invariavelmente são acompanhados de pancitopenia ou falha progressiva na medula óssea com eventual progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) ou outras neoplasias (SMITH E WAGNER, 2012).

Cerca de 20% dos casos de AF não apresenta defeitos congênitos. A instalação da sintomatologia hematológica frequentemente ocorre na primeira década de vida e, raramente, no primeiro ano de vida. A falência da medula óssea envolve os três tipos celulares (série vermelha, megacariócitos e série branca) e tende a progredir para uma pancitopenia medular, com uma medula óssea escassa de células e ocupada por fibrose e tecido gorduroso.

A doença já foi descrita em várias populações e a frequência mais aceita é de 1:350.000 nascimentos. Em alguns grupos étnicos a frequência aumenta, como *africâners* (1:20.000 nascimentos) e judeus *Ashkenazi* (1:30.000 nascimentos) (ROSENBERG, TAMARY, ALTER, 2011; KUTLER & AUERBACH, 2012).

Durante a primeira década de vida, pelo menos 20% dos portadores desenvolvem algum tipo de câncer, sendo os mais comuns, leucemia mielóide aguda e síndrome mieloplásica, além de risco aumentado de desenvolvimento de tumores sólidos, particularmente carcinoma de células escamosas (CCE) de cabeça e pescoço, podendo ocorrer também CCE de reto, vagina, cérvix, esôfago, cavidade bucal, faringe ou pele, devido à instabilidade cromossômica, característica predominante em todas as fases da doença (ROCCO *et al.* 2014; KOTTEMANN e SMOGORZEWSKA, 2013; AUERBACH, 2015; DONG *et al.* 2015).

A identificação das mutações em células germinativas é importante para confirmar o diagnóstico. Porém, uma série de problemas adicionais pode ocorrer nos procedimentos tornando o diagnóstico mais complicado. O primeiro obstáculo é que mesmo o rastreio dos genes mais frequentemente mutados, como FANCA, FANCC e FANCG, que juntos respondem por aproximadamente 80% dos pacientes com AF, não será bem-sucedida em pelo menos 20%. Em segundo lugar, há um amplo espectro de mutações, a definição da mutação específica que causa a disfunção de determinado gene é tão importante quanto à definição do grupo de complementação, no acompanhamento clínico do paciente. Em terceiro lugar, um teste negativo ou inconclusivo de quebras cromossômicas pode ocorrer em pacientes com mosaicism, levando a reversão do fenótipo celular da AF (MOLDOVAN E D'ANDREA, 2009; ROCCO *et al.* 2014).

Os portadores de AF apresentam maior frequência de LMA e tumores sólidos de cabeça e pescoço, esôfago ou vulva, quando comparados à população geral. Os tumores hepáticos, normalmente não apresentam malignidade e são associados à terapia hormonal prolongada que esses indivíduos fazem uso. Além disso, três mecanismos podem predispor os pacientes com AF ao desenvolvimento de neoplasias: o defeito na sinalização de danos no DNA, o defeito na detoxificação de ROS e a imunodeficiência. As células dos pacientes apresentam sensibilidade aumentada a mutágenos como radiação e agentes alquilantes, assim como maior suscetibilidade à transformação pelo vírus símio 40 (SV40) (ROSSELLI, BRIOT E PICHIERRI, 2003).

O início das manifestações hematológicas, principalmente trombocitopenia e pancitopenia, e o grau de gravidade das mesmas, varia desde o nascimento até a idade adulta. As variações também são observadas na presença e no tipo de malformações congênitas. A diversidade da expressão clínica deve-se aos vários produtos gênicos (demonstrados pelos estudos de complementação), e que também estão envolvidos nas vias de reparo descritas anteriormente (ROSSELLI, BRIOT E PICHIERRI, 2003).

O tratamento da AF é focado na prevenção das complicações da doença e no alívio dos sintomas, mas depende da precocidade do diagnóstico. As anormalidades passíveis de serem corrigidas cirurgicamente devem ser realizadas o mais cedo possível, idealmente antes da ocorrência de citopenias periféricas devido ao pior prognóstico resultante. No entanto, a grande chave para o tratamento da AF passa pelo tratamento das complicações hematológicas decorrentes da doença, como a falha progressiva da medula óssea. A grande estratégia de tratamento ainda é o transplante de medula óssea (TMO), associado a terapêutica com androgênios e/ou citocinas (WALDEN e DEANS, 2014).

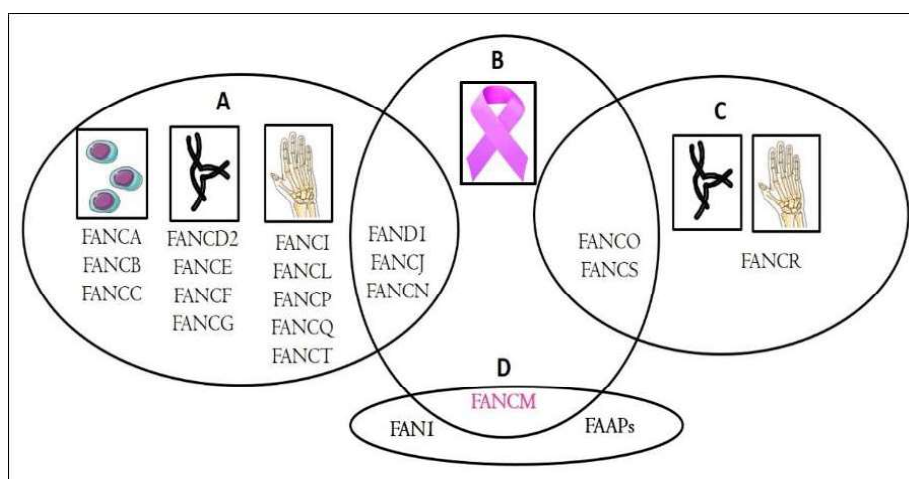
Discute-se hoje o emprego do tratamento precoce, ou seja, o transplante de medula óssea antes da ocorrência de qualquer citopenia em crianças diagnosticadas com AF devido a melhores resultados terapêuticos obtidos. Porém, submeter o portador da doença a um tratamento extremamente agressivo e com taxas de mortalidade significativas, gera conflitos éticos devido à alta mortalidade dessa modalidade terapêutica. O tratamento do paciente com AF consiste em procedimentos paliativos e de suporte, os quais melhoram e prolongam suas condições de vida. Esses procedimentos incluíam a reposição dos derivados do sangue, administração de andrógenos ou corticosteroides para estimular a medula óssea, o uso de antibióticos de amplo espectro e a prevenção à exposição a agentes que são potencialmente responsáveis por sangramento ou infecção (WALDEN e DEANS, 2014).

O TMO pode eliminar as manifestações hematológicas da doença que são as principais determinantes da sobrevida do paciente, independente do grupo de complementação. Uma

alternativa seria a transdução retroviral de um gene AF em células tronco hematopoéticas, opção bastante viável e que vem sendo estudada por vários centros. Apesar de úteis, os estudos de transferência gênica assim como o TMO, não interferem com as anormalidades do desenvolvimento ou com o risco de câncer em tecidos não hematopoéticos. Assim, o melhor conhecimento dos genes e proteínas AF, poderão trazer maiores esclarecimentos sobre seu papel em outros aspectos clínicos da AF, como a suscetibilidade ao câncer (WALDEN e DEANS, 2014).

A AF apresenta grande variabilidade fenotípica e seu diagnóstico clínico exige a complementação diagnóstica através de métodos laboratoriais. Diversos estudos contribuíram para a caracterização da AF. Entre as mais importantes estão à instabilidade cromossômica espontânea e a hipersensibilidade das células dos pacientes AF ao efeito indutor de quebras cromossômicas de agentes clastogênicos, como a MMC, CIS e o DEB. Com base nestas características foram desenvolvidos métodos de indução de quebras cromossômicas, como o Teste de Sensibilidade ao DEB, que é o método de referência para o diagnóstico da AF (AUERBACH, 2010). Como já mencionado neste trabalho, estudos moleculares da AF mostram que as células apresentam defeitos nos processos de reparo do DNA, que ocorrem normalmente durante a fase S do ciclo celular ou em resposta a algum dano ao DNA. Mutações que ocorrem nos genes que codificam as proteínas da via da AF e provocam alterações no mecanismo de reparo, resultam nas características fenotípicas da doença (AUERBACH, 2010). Os genes AF somente foram identificados a partir da década de 80, com o desenvolvimento de um sistema de seleção (complementação funcional). Atualmente, já é possível associar os genes ligados a AF com o fenótipo clínico e/ou suscetibilidade a outras doenças, como demonstrado na Figura 3.

O método para diagnóstico da doença consiste na transfecção de DNA normal em células AF, que depois são selecionadas com DEB ou MMC. Somente as células AF cuja hipersensibilidade a estes agentes foi corrigida, tem a capacidade de crescer e serem isoladas por técnicas moleculares. A maioria dos pacientes AF pertence aos grupos de complementação FA-A (65%), FA-C e FA-G (8 e 10 %, respectivamente).



**Figura 4.** Relação entre os genes ligados a anemia de Fanconi com as características clínicas mais encontradas em portadores da doença. Portadores de AF com alterações nos genes listados no grupo A, apresentam, em sua maioria, falência da medula óssea, maior sensibilidade a mutágenos e consequentemente maior instabilidade cromossômica, além de malformações ósseas. Alterações em genes listados no grupo B, estão ligadas com a maior predisposição ao câncer de mama, ovário, útero e formação de tumores sólidos em menor frequência. Até o momento, alterações em genes listados no grupo C, apresentam associação com a presença de instabilidade cromossômica e malformações ósseas. Alterações em FANCM, junto com as proteínas FAN1 e FAAPs, tem sido associadas com a maior predisposição ao câncer, semelhante ao que ocorre no grupo B. Adaptado de Bogliollo e Surralles (2015).

Esta frequência é variável entre diferentes grupos étnicos. Os riscos associados a cada subtipo da AF, especialmente os mais frequentes, têm sido investigados por meio de estudos de correlações entre o genótipo e o fenótipo. Aparentemente a definição da mutação específica que o paciente apresenta parece ter uma maior relevância no acompanhamento clínico do que somente a definição do grupo de complementação (KUTLER *et al*, 2003).

### 1.3.1 Grupo de complementação FA-A

O gene *FANCA* localiza-se no cromossomo 16q34.3, entre os marcadores D16S121 e D16S303. O gene *FANCA* consiste de 43 exons, que variam de 34 a 188pb, com um total de 4368 nucleotídeos. Localiza-se predominantemente no citoplasma, embora desempenhe funções no núcleo junto com a proteína FANCG, por meio da sua porção N-terminal, e indiretamente com a proteína FANCC (DEAKYNE E MAZIN, 2011).

Segundo Birkeland e colaboradores (2011), e de acordo com o IFAR (*International Fanconi Anemia Registry*), o grupo de complementação FA-A representa aproximadamente 63% de todos

os indivíduos afetados, por ser FANCA um gene altamente polimórfico e hipermutável, com mais de 100 tipos de mutações diferentes identificadas, muitas delas pequenas inserções/deleções, que determinam a produção da proteína alterada. Porém, existem deleções maiores que representam 40% das mutações encontradas neste gene e resultam na ausência total de expressão da proteína (mutação nula). Os pacientes do grupo FA-A homocigotos para mutações nulas manifestam uma doença bastante agressiva, com anemia severa em idade precoce e maior incidência de leucemia, quando comparados com pacientes cuja mutação produz uma proteína FANCA alterada (SOLOMON *et al.*, 2015).

Relembrando, que a proteína FANCA é um componente do núcleo proteínas de AF. Esse núcleo ativa as proteínas FANCD2 e FANCI por um processo chamado ubiquitinação e forma o complexo proteína FANCD2-FANCI (ID). No núcleo de AF encontram-se proteínas de sinalização de reparo do DNA que migram para o local de dano, para que a replicação do DNA possa prosseguir (SOLOMON *et al.* 2015).

### **1.3.2 Grupo de complementação FA-B**

No início das pesquisas com AF, acreditava-se que o gene FANCB seria uma variante alélica a partir de uma mutação do gene BRCA2, resultando numa menor quantidade do produto deste gene (GUIDUGLI *et al.* 2015). Mais tarde o gene FANCB foi identificado através de estudos de transfecção e complementação. Esta proteína possui 853 aminoácidos (95kDa) e seu gene está localizado no cromossomo Xp22.31, portanto manifesta-se somente no sexo masculino. A associação de um gene ligado ao X e com associação a AF é importante para o diagnóstico e aconselhamento genético, porém este é um subtipo raro, frequência menor que 1%, e poucos casos com mutações em FANCB foram identificados até o momento (McCAULEY *et al.* 2011).

### **1.3.3 Grupo de complementação FA-C**

O gene FANCC foi o primeiro a ser clonado e está localizado no cromossomo 9q22.3. É formado por 14 exons e codifica uma proteína, não homóloga a outras proteínas, com 558 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 63 kDa, de localização citoplasmática (CASSADO *et al.* 2005). FANCC apresenta domínios funcionais estruturalmente separados, garantindo sua multifuncionalidade, como atuação na tolerância aos agentes indutores de ICLs no DNA em conjunto com as demais proteínas AF no núcleo celular. Além disso, FANCC também apresenta papel importante no controle de celular, no transporte de proteínas, na transdução de sinais e na regulação da detoxificação no citoplasma (BOGLIOLO *et al.* 2002).

A proteína FANCC, bem como as outras proteínas AF, atuam em atividades que protegem as células dos danos causados pelo estresse oxidativo, decorrente de alta tensão de oxigênio, radiação gama, radiação UV ou drogas que geram o radical hidroxila reativo (OH<sup>-</sup>). Esses fatores mutagênicos geram lesões nos cromossomos e na dupla fita do DNA. Após a redução do oxigênio ocorre a produção de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroxila (OH<sup>-</sup>) radical livre e oxigênio *singlet* (O<sub>2</sub>). Essas ROS podem causar lesões cromossômicas através da interação química direta com a cromatina resultando em danos. O O<sub>2</sub> deverá ser removido pela enzima superóxido dismutase (SOD), a qual, por sua vez, gera o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que depois será detoxificado pela catalase (BOGLIOLO *et al*, 2002; BOGLIOLO e SURÁLLES, 2015). Alguns trabalhos já demonstraram a participação de FANCC no metabolismo dependente de citocromo P450 e na interação com a glutathione S transferase P1 (GSTP1). As proteínas da superfamília P450 são responsáveis por catalisar a oxidação de diversas substâncias endógenas e xenobióticas. Nas células FA-C a detoxificação é anormal, demonstrando que FANCC atua como regulador negativo da atividade redutase, dessa forma, a maior atividade das redutases pode levar a produção de ROS influenciando a sobrevivência das células (BOGLIOLO *et al*, 2002; BOGLIOLO e SURÁLLES, 2015).

Até o momento poucas mutações foram descritas para esse gene, sendo duas as mais frequentes. A primeira é uma mutação de ponto que resulta na substituição de uma leucina por uma prolina na posição 554. A segunda mutação descrita foi a IVS4 + 4 A > T, encontrada com maior frequência (80%) na população de judeus *Ashkenazi*. Estas duas mutações estão associadas a um fenótipo grave da doença. Outras duas mutações, como R548X e 322delG e R185X, são mais frequentes em indivíduos com origem ancestral do norte da Europa e estão associadas a fenótipos mais leves da doença (ROSENBERG, TAMARY, ALTER, 2011; KUTLER & AUERBACH, 2012).

#### **1.3.4 Grupo de Complementação FA-D1**

O grupo de complementação D foi descrito por Whitney *et al.* (1995), que identificou mutações deletérias no gene que caracteriza a linhagem celular PD20, que é incapaz de complementar a linhagem HSC62, modelo de estudo para o grupo FA-D. Através de fusão cromossômica microcelular mapeou-se o gene FANCD localizado no cromossomo 3p22-26, introduzindo regiões do cromossomo 3p em uma linhagem celular FANCD, sensível a MMC, isso resultou na resistência a MMC.

Em 2001, pesquisadores demonstraram que este grupo apresentava diversidade genética ao identificarem mutações nas linhagens celulares do gene FANCD2 (PD20, VU008 e PD 733)

de três famílias, não relacionadas, pertencentes ao grupo D e concluíram que o gene mutado nas linhagens FANCD é distinto do FANCD2 e não está localizado no cromossomo 3, sendo designado FANCD1 (TIMMERS *et al.* 2001). Após o trabalho de Timmers e colaboradores (2001), o gene FANCD1 foi reconhecido como sendo idêntico ao gene de suscetibilidade ao câncer de mama, o BRCA2, mapeado em 13q12-13 (GUIDUGLI *et al.*, 2013). A proteína BRCA2 (3418 aminoácidos com 380kDa) está associada a inúmeras funções, a mais descrita é ligada a regulação do reparo do DNA por HR mediante o controle da recombinase RAD51, bem como participa da estabilização da estabilização da dupla fita do DNA (LEVRAN *et al.*, 2005).

Pacientes AF com mutações bialélicas em BRCA2 apresentam maior risco no desenvolvimento de leucemia aguda durante os cinco primeiros anos de vida, e indivíduos heterozigotos têm elevado risco de desenvolver tumores sólidos. A presença dessas mutações requer um monitoramento mais frequente que permita intervenções terapêuticas precoces (WAGNER *et al.*, 2004).

### **1.3.5 Grupo de Complementação FA-D2**

O gene FANCD2 está localizado no cromossomo 3p25.3. Este foi o primeiro gene da AF com homologia a genes de vegetais e invertebrados (*Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*). Este gene contém 44 exons e codifica uma proteína com 1451 aminoácidos, com duas isoformas da proteína após a tradução: uma curta denominada FANCD2-S com 155 kDa e uma longa, FANCD2-L com 162 kDa. A isoforma longa resulta da adição de uma molécula de ubiquitina a lisina 561 (GARCIA-HIGUERA *et al.*, 2001).

A FANCD2 é fosforilada pela proteína ATM na serina da posição 222. O gene ATM codifica uma proteína-cinase que, na presença de danos induzidos por radiação ionizante, fosforila e ativa proteínas envolvidas nos pontos de checagem do ciclo celular, como a NSB1, a BRCA1 e a FANCD2. Dentre as mutações no gene FANCD2 estão a deleção do exon 17 e a transição de A→G no nucleotídeo 376, a qual resulta na substituição de uma serina por uma glicina no resíduo 126 (TIMMERS *et al.*, 2001; DONG *et al.* 2015).

### **1.3.6 Grupo de Complementação FA-E**

O gene FANCE localiza-se no cromossomo 6p21-22, na região indicada pelos marcadores D6S422 e D6S1610 (WAISFISZ *et al.*, 1999). É composto por 10 exons e produz uma proteína com 536 aminoácidos (60kDa) com dois sinais de localização nuclear. A FANCE faz parte do complexo ou núcleo de Fanconi, formado pelas proteínas da via AF. Ela é necessária para que

a FANCC permaneça no interior do núcleo e, em alguns trabalhos, e devido a sua capacidade de ligar-se a FANCD2, é conhecida pelo recrutamento dessa ao substrato do complexo principal (PACE *et al.*, 2002; D'ANDREA. 2006; DONG *et al.* 2015).

### **1.3.7 Grupo de Complementação FA-F**

O gene FANCF foi identificado por complementação e não apresenta íntrons, codifica um polipeptídeo de cerca de 374 aminoácidos (42kDa), homólogo à uma proteína de ligação ao RNA em procariontes, sugerindo que a proteína FANCF pode apresentar um domínio com ligação direta com o DNA. FANCA interage com a FANCC / FANCE através de sua subunidade N-terminal. Dessa forma, FANCF atua como estabilizadora da ligação entre as proteínas do núcleo de AF e FANCD2 ubiquitinada. Já foi demonstrado que o silenciamento epigenético de FANCF está associado a leucemias, câncer de ovário, do cólo de útero e bexiga, e a inibição de FANCF mediada por RNA de interferência pode promover a sensibilidade de células de tumor à droga (ZHAO *et al.* 2014).

Este gene foi mapeado no cromossomo 11p15 entre os marcadores microssatélites D11S1359 e D11A929. Algumas variantes alélicas de FANCF, que resultam em ausência de expressão desta proteína foram descritas, devido à deleção dos nucleotídeos 230-252 até a mutação 484-485del, que resulta da deleção de somente dois pares de bases (LI *et al.* 2012; ZHAO *et al.* 2014).

### **1.3.8 Grupo de Complementação FA-G**

O gene FANCG foi descrito por Saar e colaboradores (1998) e está localizado no cromossomo 9p13 entre os marcadores D9S1678 e D9S175. FANCG é idêntico ao XRCC9, com atividade na regulação do ciclo celular ou no reparo pós-replicação (SAAR *et al.* 1998). Junto com outras proteínas, como FANCA, B, C, E, F, G e FAAP100, FANCG forma um sub-complexo proteico, que é recrutado para a cromatina pelo heterodímero FANCM-FAAP24 para ativar o núcleo central da via de AF. FANCG interage diretamente com FANCA e FANCF e intervem na interação de FANCA e FANCF. A ativação do núcleo das proteínas da via AF é importante para a ubiquitinação interdependente das proteínas FANCD2 e FANCI, essa ativação não ocorre na ausência de FANCG e outras proteínas do sub-complexo (WILSON *et al.* 2010).

Alguns trabalhos descrevem que após a replicação e o final da fase S, a proteína FANCG seja fosforilada por cinases do próprio ciclo, e que essa fosforilação inicie a remoção do complexo de proteínas AF que estava ligado a cromatina, para reparo de danos no DNA na replicação (CONSTANTINOU, 2012). FANCG atua na ligação de FANCA à FANCC e as 3 se ligam ao

núcleo com as demais proteínas. Outra função de FANCG, é interagir de forma independente com BRCA2, em na presença de danos no DNA. Essa interação entre as duas proteínas comprova a atuação de FANCG como importante proteína para o reparo por HR (WILSON *et al.* 2010; CONSTANTINO, 2012).

### **1.3.9 Grupo de Complementação FA-I**

A existência do grupo de complementação FA-I foi estabelecida por Levitus e colaboradores (2004), estando este gene localizado no cromossomo 15q26.1 (LEVITUS *et al.* 2004; DORSMAN *et al.* 2007; DONG *et al.* 2015). FANCI é uma proteína de 1328 aminoácidos e massa molecular de 149 kDa. Esta proteína possui regiões com domínio amino-terminal formado por leucinas, que medeiam a interação entre proteínas e proteína e DNA. Esse domínio leucina de FANCI não se liga diretamente ao DNA, mas auxilia na estabilidade da proteína (BOISVERT e HOWLETT, 2014).

A proteína FANCI se une a FANCD2 para formar o complexo FA-ID, e ambas são fosforiladas pela ATR/ATM (ataxia telangiectasia e Rad3-relacionadas/ataxia telangiectasia mutada) na presença de dano no DNA. A fosforilação de FANCI parece funcionar como um interruptor molecular para ligar os mecanismos de reparo através da via de AF. A ubiquitinação de FA-ID é depende do núcleo das proteínas de Fanconi, e a ubiquitinação da FANCI baseia-se na ubiquitinação de FANCD2 (YUAN *et al.* 2009).

### **1.3.10 Grupo de Complementação FA-J**

*FANCI*, também descrito como *BRIP1*, está localizado no cromossomo 17q22-24, possuindo 1249 aminoácidos (130kDa). Essas enzimas processam junções *Holliday*, formadas durante HR, ou estruturas estendidas a partir de forquilhas de replicação. A proteína FANCI (BRIP1), é semelhante a uma RecQ helicase que destorce o DNA na direção 5'→3' e está associada com o reparo do DNA (LEVITUS *et al.* 2005; DONG *et al.* 2015).

### **1.3.11 Grupo de Complementação FA-L**

O gene FANCL está localizado no cromossomo 2p16.1 e codifica uma proteína com 375 aminoácidos (43kDa) (MEETEI *et al.*, 2003). Os mesmos autores, também identificaram que FANCL apresenta homologia com o componente do complexo principal PHF9 (PHD *finger protein* 9) que possui atividade com a E3 ubiquitina ligase. O gene FANCL/PHF9 codifica três repetições de WD40, que são conhecidas por facilitar interações proteína-proteína. Além disso, FANCL/PHF9 é uma ubiquitina ligase com sítio específico de atividade da E3 ubiquitina ligase,

envolvida na ubiquitinação de FANCD2 (HODSON *et al.* 2011; HODSON *et al.* 2014; SCHWAB *et al.* 2015).

### **1.3.12 Grupo de Complementação FA-M**

FANCM está localizado no cromossomo 14q21.2 e seu produto é uma proteína de 2048 aminoácidos (250kDa). Essa proteína é descrita como uma translocase, junto com as proteínas FAAP24 e MHF1/2, juntas reconhecem a parada da forquilha de replicação e ativam a via de AF. FANCM então recruta o complexo central (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG (XRCC9), FANCL (PHF9) e as proteínas associadas FAAP20 e FAAP100 (ROHLEDER *et al.* 2016).

A função principal do complexo de proteínas é a ubiquitinação do complexo FA-ID, através da FANCL (PHF9) integrada a E3 ubiquitina ligase e a FANCT (UBE2T) conjugada com E2 ubiquitina ligase (UBE2T). A ubiquitinação desse complexo FA-ID interage com FANCS (BRCA1), FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1) e FANCN (PALB2), e desencadeando reações de reparo junto da fita de DNA, envolvendo FANCO (RAD51c), FANCR (RAD51), FANCP (SLX4) e FANCL (XPF). As demais etapas de remoção das ICLs permanecem não bem elucidadas (ROHLEDER *et al.* 2016).

### **1.3.13 Grupo de Complementação FA-N**

A proteína FANCN é codificada pelo gene PALB2, composto por 13 exons, estando presente no cromossomo 16p12.2 Essa proteína interage com FANCD1 (BRCA2) no núcleo, e atua à jusante da ubiquitinação de FANCD2, facilitando suas funções na via de reparo. De acordo com Tischkowitz e Xia (2011), uma mutação bialélica em PALB2, pode ser uma das causas da AF e a introdução da sequência sem erro em PALB2 em células destes pacientes normaliza a associação de FANCD1/BRCA2 à cromatina, facilita a formação de *foci* de RAD51 e a sensibilidade à MMC.

As mutações em PALB2 representam maior gravidade do fenótipo clínico de portadores de AF, principalmente em relação ao tempo para o estabelecimento da doença e o ao alto risco de câncer na infância, de maneira semelhante aos pacientes com mutações bialélicas em FANCD1/BRCA2, já sendo demonstrado que uma exerce atividade sobre a outra no reparo do DNA e na supressão de tumores. Alguns trabalhos, em princípio, a consideram uma proteína supressora de tumor (REID *et al.*, 2007; TISCHKOWITZ e XIA, 2011).

#### **1.3.14 Grupo de Complementação FA-O**

O gene FANCO é conhecido oficialmente como RAD51c. Até agora, foram analisadas cerca de 14 mutações em FANCO/RAD51c (MEINDL *et al.* 2010; DONG *et al.* 2015). Arking e colaboradores (2006) analisaram 1.100 famílias alemãs com histórico de neoplasia ginecológica e identificaram 6 mutações monoalélicas em RAD51c, mostrando que alterações nesse gene confere risco aumentado para câncer, principalmente de mama e ovário. Mutações em RAD51c podem ser inserções, que levam a alteração do quadro de leitura, mutações de emenda local e duas mutações *missense* não funcionais. Este foi o primeiro trabalho a relacionar especificamente FANCO/RAD51 à maior predisposição de câncer (ARKING *et al.* 2006). De acordo com Hashimoto e colaboradores (2010), FANCO juntamente com FANCD1, FANCI e FANCF, tem a função de encaminhar o reparo de ICLs para a HR, após a sinalização feita pelas demais proteínas AF (HASHIMOTO *et al.* 2010).

#### **1.3.15 Grupo de Complementação FA-P**

FANCP/SLX4 é uma proteína com cerca de 200 kDa e múltiplos domínios (Kim *et al.* 2013). Apesar de não ter domínios catalíticos reconhecíveis, FANCP/SLX4 participa de diversas vias de manutenção genoma. Trabalhos recentes demonstraram que a depleção de Slx4p em *Drosophila melanogaster*, homólogo a FANCP/SLX4, sensibiliza células para os efeitos citotóxicos de ICLs. Portadores de AF com mutação em FANCP/SLX4 apresentam, além do fenótipo típico da doença, maior predisposição ao câncer em células escamosas, principalmente de língua (CYBULSKI e HOWLETT, 2011).

Trata-se de uma proteína que apresenta interação direta com diversos fatores de manutenção do genoma, incluindo MSH2-MSH3, PLK1, TRF2, XPF-ERCC1, MUS81-EME1 e SLX1. Além disso, essa proteína apresenta dois domínios ligados a ubiquitina e acredita-se que esses são importantes para o recrutamento da mesma para as regiões de ICLs. Já foi demonstrado que FANCP/SLX4 desempenha funções versáteis na manutenção da estabilidade do genoma, orquestrando o reparo de ICLs, a resolução de Junções *Holliday*, restauração das forquilhas de replicação paralisadas e manutenção dos telômeros (KIM, 2014).

#### **1.3.16 Grupo de Complementação FA-Q**

FANCF também conhecida como XPF e ERCC1, é um componente essencial do reparo por NER, pois insere-se na cadeia 5' de DNA envolvida na lesão, desempenhando papel crucial na reparação de ICLs junto com FANCP/SLX4. Trabalhos já demonstraram que células sem FANCF (XPF<sup>-/-</sup>) são muito mais sensíveis aos agentes indutores de lesões do que as células

que pertencem a outros grupos de complementação, isso porque ocorre falha de incisão nucleotídica, contribuindo significativamente para fenótipos atípicos de XPF (HASHIMOTO *et al.* 2015).

A interação física entre FANCP/SLX4 e FANCD1/BRCA2 é crítica para a resolução de ICL, pois se acredita que o recrutamento de FANCP seja feito por FANCD1. Embora as mutações XPF *missense*, na maioria das vezes, leve ao fenótipo de *Xeroderma pigmentosum* (XP), outras mutações causam fenótipos complicados ou raros como síndrome progeroide, AF e variantes de XP (KASHIYAMA *et al.* 2013; HASHIMOTO *et al.* 2015). Apesar de importante, a interação física entre FANCP/SLX4 e FANCD1/BRCA2, ainda não foi caracterizada detalhadamente (HASHIMOTO *et al.* 2015). Sabe-se que a interação ocorre através do aminoácido 4500 de FANCP/SLX4 e o 558 de FANCD1/BRCA2 e que linhagens com defeito nessa interação não são capazes de restaurar a resistência a citotoxicidade causada por MMC. De acordo com Hashimoto e colaboradores (2015), do ponto de vista quimioterapêutico do câncer o desenvolvimento de uma pequena molécula que se liga a esta região de FANCP/SLX4 pode melhorar a eficácia dos agentes quimioterápicos indutores de *crosslink* (HASHIMOTO *et al.* 2015).

### **1.3.17 Grupo de Complementação FA-R**

FANCD1, mais conhecida como RAD51 localiza-se no cromossomo 15q15.1. Essa proteína codifica uma recombinase essencial para a HR. É uma proteína ligadora de DNA fita simples (ssDNA) formando um filamento de adenosina trifosfato (ATP), capaz de invadir a fita dupla de DNA em busca de homologia (AMEZIANE *et al.* 2015). Além disso, FANCD1/RAD51 atua na proteção da nova fita de DNA, essa função também pode ser regulada por FANCD1/BRCA2. Outra informação importante é que o gene RAD51 codifica também a proteína FANCD1/UBE2T, enzima conjugada a ubiquitina, que tem função de, junto com FANCL/E3 ubiquitina ligase, ubiquitinar o complexo FA-ID (AMEZIANE *et al.* 2015; DONG *et al.* 2015; HASHIMOTO *et al.* 2015).

Portadores de AF com o subtipo R, apresentam microcefalia e retardo mental, e normalmente atingem a idade adulta sem a típica falência da medula óssea e histórico de tumores malignos na infância, porém apresentam uma maior predisposição a tumores sólidos na vida adulta (AMEZIANE *et al.* 2015).

### **1.3.18 Grupo de Complementação FA-S**

BRCA1 (câncer da mama 1, início precoce) foi recentemente identificado como um dos 19 grupos de complementação presentes na AF, codificando a proteína FANCS, uma proteína

importante na manutenção da integridade do genoma (HILL *et al.* 2014). Apesar de descrito como integrante da via de AF, foi previamente impedido de ser designado como um gene desse grupo devido à falta de mutações bialélicas relatados em pacientes com a doença (DONG *et al.* 2015; SAWYER *et al.* 2015).

Recentemente, novos casos foram descritos, descrevendo indivíduos com mutações deletérias em FANCS/BRCA1. Com esses novos casos, foi possível detalhar a sensibilidade celular e o fenótipo dos portadores de AF com esse subtipo, demonstrando que portadores da mutação nesse grupo de complementação são mais suscetíveis ao câncer de ovário (DOMCHEK *et al.* 2013; SAWYER *et al.* 2015). A frequência de mutação em FANCS/BRCA1 ainda não está bem estabelecida para várias populações. Sabe-se que há maior frequência dessa mutação em aproximadamente 1,5% na população judaica *Ashkenazi* para as mutações 185delAG e 5382insC (*Human Genome Variation Society*). Além disso, um estudo anterior, descreveu que essas alterações em FANCS/BRCA1 na mesma população estão diretamente associadas a presença de câncer hereditário, principalmente câncer de ovário (DOMCHEK *et al.* 2013; ROSENBERG, TAMARY, ALTER, 2011; SHAKYA *et al.* 2011).

### **1.3.19 Grupo de Complementação FA-T**

FANCT está associada à UBE2T, ligada a uma proteína ubiquitina ligase E2, que é essencial para a ubiquitinação da proteína FANCD2 tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Existe a descrição de UBE2T como oncogene no desenvolvimento do câncer, principalmente de bexiga, pulmão e próstata (HIRA *et al.* 2015; WEN *et al.* 2015). Diversos trabalhos já demonstraram que FANCT/UBE2T com ubiquitina ligase E2 é específica para a ubiquitinação de FANCI e que não exige a participação de FANCL/PHF9 com a ubiquitina ligase E3, responsável pela ubiquitinação de FANCD2. Porém, acredita-se que tanto a FANCT/UBE2T ubiquitina ligase E2, quanto FANCL/PHF9 ubiquitina ligase E3 desenvolvam funções biológicas adicionais ao complexo FA-ID (JOO *et al.* 2011; LONGERICH *et al.* 2014; SMOGORZEWSKA *et al.* 2007).

Apesar do crescente aumento de estudos sobre as proteínas da via da AF, algumas importantes questões permanecem sem respostas. Entre elas, por que pacientes com AF apresentam anormalidades no desenvolvimento, anemia aplástica e predisposição a neoplasias? Além disso, há várias lacunas nesta rede de sinalização, como por exemplo, a conexão entre as proteínas ubiquitinadas FANCD2 e FANCI com as proteínas pertencentes ao grupo III: BRCA2, FANCN e FANCI; as exatas interações entre as proteínas da via de Fanconi e proteínas de reparação de DNA; como é feito o recrutamento das proteínas FANCD2-Ub e FANCI-Ub para a

cromatina no sítio de dano de DNA e como este complexo ativa efetores dos processos de reparação de DNA a jusante, incluindo polimerases da TLS e enzimas da HR.

#### **1.4 Via da anemia de Fanconi e Recombinação Homóloga**

Linhagens deficientes em qualquer uma das proteínas da AF são incapazes de encaminhar o reparo por HR. Quando ubiquitinado, o complexo FA-ID se liga ao local da lesão no DNA e associa-se com as demais proteínas atuantes na jusante, como FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C, FANCI/BACH1, FANCP/SLX4 e FANCG/ERCC4 (LONG et al., 2011).

O complexo principal de proteínas, que atua a montante da ubiquitinação do complexo FA-ID, se faz necessário para que o reparo por HR ocorra. O reparo errôneo de HR, gerado por danos em uma destas proteínas, é menos grave quando comparado à perda de função de uma das proteínas de atuação a jusante. Tanto o complexo principal, quanto o complexo intermediário exercem funções dentro da via da AF interagindo entre si. No entanto, as proteínas que atuam a jusante, além de atuarem com proteínas da via, interagem com outras proteínas reparadoras de danos no DNA de outras vias de reparo, como BRCA1 e RAD51 (LONG et al., 2011). Pacientes com mutações bialélicas nos genes FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2 apresentam fenótipos mais graves, desenvolvem leucemia mais precocemente e tumores embrionários nos dois primeiros anos de vida (KOTTEMANN e SMOGORZEWSKA, 2013).

#### **1.5 Síntese translesão e reparo por excisão nucleotídeos**

Além de participarem do mecanismo de HR, as proteínas da via da AF também participam do reparo por excisão de nucleotídeos e síntese translesão de DNA, durante o reparo de ICLs. Está claro, que para o reparo de danos no DNA ocorre o desbloqueio da forquilha de replicação e separação das duas fitas do DNA que contém a ligação cruzada. Isso acontece, porque uma das fitas é removida pela ação de endonucleases, liberando a ligação cruzada e permitindo o reparo do dano. Após a excisão de uma das fitas, ocorre a TLS, sendo este um mecanismo que tolera erros e onde atuam polimerases de baixa fidelidade, pois ignoram regiões danificadas (MOLDOVAN e D'ANDREA, 2009).

As endonucleases recrutadas para a remoção de ICLs são a MUS81-EME1, o complexo FANCG/XPF, FAN1, FANCP/SLX4 e SLX1. As endonucleases FANCP/SLX4 e FANCG/XPF também atuam no reparo do DNA após a ubiquitinação da FANCD2 (BOGLIOLO et al., 2013). Existem proteínas associadas que interagem com as demais proteínas da via de AF, tais como FAAP20, FAAP24, FAAP100 e as histonas MHF1 e MHF2, associadas à FANCM. Ensaios *in*

*vitro*, demonstraram que linhagens deficientes nessas proteínas apresentam o fenótipo mais clássico da AF, a sensibilidade aumentada a agentes indutores de ICLs. No entanto, ainda não se identificou portadores de AF que apresentem mutações nestes genes, razão pela qual estes não recebem a designação FANC, na sua nomenclatura (KEE e D'ANDREA, 2012). A Tabela 1 apresenta os subtipos genéticos da AF conhecidos, os respectivos genes, a localização nos cromossomos e os produtos gerados.

### **1.6 Disfunção mitocondrial na AF**

Um fator importante e ainda pouco descrito é a disfunção mitocondrial presente nas células de portadores de AF. Alguns estudos têm mostrado que os acúmulos causados por ROS, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, levam a uma maior sensibilidade. Alterações em proteínas atuantes em vias redox, como é o caso FANCC associada com NADPH no citocromo P450 e GST, deixam a célula mais suscetível ao ataque de ROS (PAGANO *et al.* 2015).

Algumas drogas utilizadas antes do TMO são biotransformadas, formando derivados alquilantes tóxicos e esta toxicidade está relacionada aos efetores redox, tais como a glutatona (GSH). Esse desequilíbrio redox está intimamente relacionado com anormalidades mitocondriais, como as já descritas em alguns subtipos genéticos da AF (A, C, D2 e G), apontando para a ligação entre disfunção mitocondrial e o fenótipo celular da AF. Uma das anormalidades mitocondriais mais conhecidas é a mudança na morfologia mitocondrial, que se apresenta com membranas danificadas, formas anômalas, e que isso possivelmente leve a mitofagia, evento causado pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial (DCM) e superprodução de ROS, presente em células AF (PAGANO *et al.* 2015).

A análise de RNA obtido a partir de células de medula óssea de pacientes com AF e indivíduos saudáveis, mostraram alterações na expressão de genes com atividade antioxidante e/ou de metabolização, como o citocromo P450, e envolvidos nas vias de bioenergia, como glicólise e metabolização de lipídios nas células com AF. Nordenson e colaboradores (1976) descreveram que a maior atividade das enzimas SOD e CAT pode ser associada ao menor número de quebras de cromossômicas, induzidas por radiação ionizante em linfócitos humanos. Essas enzimas, provavelmente, apresentam essa atividade porque são capazes de interferir na produção do radical hidroxil (NORDENSON *et al.* 1976).

**Tabela 1.** Subtipos genéticos da anemia de Fanconi.

<b>Proteínas AF</b>	<b>Gene (NCBI Gene ID)</b>	<b>Função associada</b>	<b>Localização Cromossômica</b>	<b>Referência</b>
FANCA	<i>FA-H</i>	Ubiquitinação do complexo FA-ID	16q24.3	<i>Deakne e Mazin, 2011</i>
FANCB	<i>FAAP90, FAB</i>	Ubiquitinação do complexo FA-ID	Xp22.31	<i>McCauley et al. 2011</i>
FANCC	<i>FA3, FAC</i>	Ubiquitinação do complexo FA-ID	9q22.3	<i>Bogjiolo et al. 2002</i>
FANCD1	<i>BRCA2, FANCD</i>	Mediador da HR, ativado pelo complexo FA-ID	13q13.1	<i>Whitney et al. 1995</i>
FANCD2	<i>FA-D2, FA4</i>	Ubiquitinado após dano no DNA	3p25.3	<i>Timmers et al. 2001</i>
FANCE	<i>FACE, FAE</i>	Ligação direta a FANCD2 ubiquitinado	6p21.22	<i>Waistisz et al. 1999</i>
FANCF	<i>FAF</i>	Ubiquitinação do complexo FA-ID	11p15	<i>Zhao et al. 2014</i>
FANCG	<i>FAG, XRCC9</i>	Ubiquitinação do complexo FA-ID	9p13	<i>Saar et al. 2010</i>
FANCI	<i>KIAA1794</i>	Ubiquitinado após dano no DNA	15q26.1	<i>Levitus et al. 2004</i>
FANCI	<i>BRIP1</i>	Helicase, ativado pelo complexo FA-ID	17q23.2	<i>Dong et al. 2015</i>
FANCL	<i>PHF9, E3</i>	Associada a E3 ligase na ubiquitinação do complexo FA-ID	2p16.1	<i>Schwab et al. 2015</i>
FANCM	<i>FAAP250,</i>	Helicase, localiza o complexo principal ao DNA	14q21.3	<i>Rohleder et al. 2016</i>
FANCN	<i>PALB2, PNCA3</i>	Ativado pelo complexo FA-ID	16p12	<i>Tischkowitz e Xia, 2011</i>
FANCO	<i>RAD51c</i>	Ativado pelo complexo FA-ID	17q23	<i>Hashimoto et al. 2010</i>
FANCP	<i>SLX4, MUS312</i>	Ativado pelo complexo FA-ID	16p13.3	<i>Kim et al. 2013</i>
FANCQ	<i>XPF, ERCC4</i>	Atividade não elucidada, sabe-se que interage com FANCP	16p13.12	<i>Hashimoto et al. 2010</i>
FANCR	<i>RAD51</i>	Responsável pela proteção da nova fita de DNA	15q15.1	<i>Dong et al. 2015</i>
FANCS	<i>BRCA1, BRCC1</i>	Proteína de suscetibilidade ao câncer	17q21.31	<i>Hill et al. 2014</i>
FANCT	<i>UBE2T, E2</i>	Associada a E2 ubiquitinase, envolvida na ubiquitinação do complexo FA-ID	1q32.1	<i>Wen et al. 2015</i>

\*Adaptado de Dong et al. (2015) e Crossan e Patel (2012).

Pacientes com AF apresentam maior número de células em apoptose, isso leva ao desenvolvimento de anemia, neutropenia, trombocitopenia e, conseqüentemente, falha da medula óssea. Além disso, apresentam altos níveis de marcadores de estresse oxidativo, que sinalizam alterações estruturais e funcionais em mitocôndrias e lesões na membrana celular, defeitos no reparo de DNA, e expressão alterada de TNF- $\alpha$  e de outras citocinas são reconhecidas características do fenótipo AF. Células de AF exibem morfologia alterada, com núcleos, mitocôndrias e retículo sub celular, expressão alterada e processamento de proteínas e defeitos estruturais metabolismo respiratório e energia (PAGANO *et al.* 2013).

Estudos ainda têm fornecido evidências para um papel do estresse oxidativo no fenótipo da AF. De acordo com a teoria do "estado pró-oxidante", o defeito fenotípico leva a danos endógenos, como danos ao DNA e anormalidades nas vias redox representando o fenótipo clínico da AF, ou seja, comprometimento da medula óssea, a suscetibilidade ao câncer, malformações, diabetes mellito e pigmentação cutânea (USAI *et al.* 2015).

### **1.7 Alternativa terapêutica utilizando a via da AF**

Novas estratégias para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas utilizando a via de AF podem se viabilizar com o melhor entendimento da interação dessas proteínas com as diversas vias de reparo. Em teoria, algumas alternativas vêm sendo bastante estudadas, como a técnica de reprogramação direta de células somáticas de AF em células pluripotentes induzidas (iPS). Mesmo a terapia com células reprogramadas apresentando falhas no reparo e, conseqüentemente, acúmulo de danos ao DNA, essa ainda é a alternativa terapêutica mais estudada para a doença e as pesquisas têm se focado na resolução dos obstáculos à reprogramação celular para métodos mais seguros (KEE e D'ANDREA, 2012).

Já é bem descrito que as células reconhecem, reparam e até mesmo desenvolvem resistência a agentes indutores de ligações cruzadas do DNA, como a cisplatina e com isso podem levar a falha de resposta ao tratamento. Algumas pesquisas têm sido feitas para identificar moléculas inibidoras da via da AF, isso poderia sensibilizar as células resistentes ao tratamento quimioterápico (JENKINS, KAN e HOATLIN, 2012).

A análise de linhagens linfoblásticas de AF e linhagens sem a doença, permitiria a caracterização dessas células frente ao tratamento com agentes indutores ICLs, ao passo de que, não se sabe como as linhagens de cada subtipo da doença reagem a indução de dano

durante o teste diagnóstico da doença e para o tratamento de tumores sólidos, frequentes em grande parte dos desses subtipos. Avaliar a sobrevivência celular, os danos ao DNA, perfil de ciclo celular e estado redox de linhagens, com e sem AF, permitiria um maior entendimento destas frente a agentes mutagênicos como a CIS e a MMC.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a sobrevivência celular, o dano ao DNA, perfil de ciclo celular e perfil redox das linhagens de linfoblastos mutadas nos genes FANCA e FANCC e da linhagem de linfoblasto selvagem (WT), na resposta a agentes genotóxicos indutores de ICL.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sobrevivência celular das linhagens *FANCA*, *FANCC* e *WT* expostas a agentes genotóxicos indutores de pontes intercadei (ICL), utilizando os ensaios de XTT e exclusão por azul de trypan.

- Analisar o índice de dano no DNA das linhagens *FANCA*, *FANCC* e *WT* quando expostas aos agentes genotóxicos indutores de pontes intercadei (ICL), utilizando o ensaio cometa alcalino.

- Caracterizar o perfil de ciclo celular das linhagens *FANCA*, *FANCC* e *WT*, utilizando marcação com o iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo.

- Avaliar o estado redox das linhagens *FANCA* e *WT* após tratamento com agentes genotóxicos indutores de pontes intercadei (ICL), por medida da atividade das enzimas SOD e CAT, oxidação de DCF e avaliação da função mitocondrial pela incorporação de rodamina 123.

Os resultados obtidos durante o mestrado foram agrupados e serão apresentados na forma de um manuscrito de revisão contendo dados, intitulado "*Strains of assessment lymphoblastic Fanconi anemia in response to effect chemotherapeutic agents*", que será submetido à revista *Mutagenesis*.

### 3. CAPÍTULO I – ARTIGO DE REVISÃO COM INCLUSÃO DE DADOS

**Strains of assessment lymphoblastic Fanconi anemia in response to effect chemotherapeutic agents**

Artigo a ser submetido à revista *Mutagenesis*

**Strains of assessment lymphoblastic Fanconi anemia in response to effect chemotherapeutic agents**

*Helen Tais da Rosa<sup>1</sup>; Luiza Steffens<sup>1</sup>; Bruna Immich<sup>1</sup>;  
Jeferson Gustavo Henn<sup>1</sup>; Jenifer Saffi<sup>1</sup>; Dinara Jaqueline Moura<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

\*To whom correspondence should be addressed. Laboratório de Genética Toxicológica, Rua Sarmento Leite, 245, Prédio 3, sala 714; Centro Histórico, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: 55 51 33038861; Email: [dinaram@ufcspa.edu.br](mailto:dinaram@ufcspa.edu.br)

## **Abstract**

Fanconi anemia (FA) is a rare disease characterized by increased chromosomal instability induced by spontaneous DNA cross-links, progressive pancytopenia and cancer susceptibility. Nineteen encoded proteins are responsible for the important signaling of damage during DNA replication. In this review, we sought the most recent work on the disease, the pathway of FA, and its molecular crosstalk with other pathways of DNA damage repair, as well as the involvement of mitochondrial dysfunction in this disease. In addition, we aimed to understand the involvement of these proteins in response to ICL inducers with emphasis in sensitivity, DNA damage, cell cycle control and oxidative profile. It is now known that the FA proteins act in signaling and repair, promoting stability of the DNA molecule, and these pathways are crucial for understanding and developing methods for cancer prevention.

## Introduction

Fanconi anemia is an autosomal recessive disease characterized by bone marrow deficiency, congenital malformations such as skeletal and kidney deformities, increased skin pigmentation and impaired growth. The incidence of malignancy is increased in patients with FA and their families. The predominant feature of FA is the chromosomal and cellular hypersensitivity to agents that induce cross-linking (ICL) of DNA, which is used as a tool for research and diagnosis of genetic heterogeneity of the disease (1).

FA proteins are responsible for maintaining genomic stability. These proteins act mainly in DNA ICL repair processes. When not repaired correctly, ICLs cause genomic instability that can lead to cancer. However, the toxicity generated by this instability makes it a chemotherapeutic potential. Congenital genetic disorders are usually clinically complex, as is the FA. To date, 19 proteins, each referred to as complementation groups, are known, which leads to genetic heterogeneity, with an important clinical variability generated by genetic variation, mutation and/or environmental factors (2,3).

The 19 genes, or complementation groups, FANCA-T are described in Table I. The proteins encoded by these genes are important for signaling DNA damage during replication. When any of these genes is mutated biallelically, except for the X-linked FANCB, phenotypic characteristics of FA will present. The prevalence of FA has been estimated for different populations as 1:100.000 births, but in *Ashkenazi* Jews this rate may be as high as 1:10.000. In general, it is diagnosed between 7 and 10 years of age, but due to the heterogeneity of clinical presentation, FA may remain unknown until adulthood (2,19). Clinical manifestations such as short stature, skeletal deformities and café-au-lait spots on the skin can help in diagnosis. Early diagnosis is important for clinical management, given that FA patients are predisposed to various

diseases, especially cancer. The progressive depletion of bone marrow progenitor cells affects the process of hematopoiesis. This clinical signs may be confused with leukemia, but the analysis shows no malignancy (2).

The genes are phylogenetically related and were grouped and named with the acronym FANC, that stands for Fanconi Anemia Complementation Group. Mutations in the encoded proteins can all lead to a common phenotype: cellular hypersensitivity to agents that cause ICL of DNA (Figure 1). Information on genetic mutations is available to the public at the Fanconi Anemia Mutation Database (<http://www.rockefeller.edu/fanconi/>) (13).

Increasing evidence suggests that the FA proteins work in a DNA damage response pathway as signal transducers and processing machines. The diagnostic chromosome breakage test is based on the exposure of a patient's cells to low doses of chemotherapeutic drugs, such as Mitomycin C (MMC), Cisplatin (CIS) and the Diepoxybutane (DEB); the latter is considered the gold standard. FA patients have 20% increased risk of cancer compared to people not affected. Acute myeloid leukemia (AML) is the most common cancer, followed by squamous cell carcinoma and brain tumors and soft tissue of the affected gene is associated with disease severity (22).

### **The FA pathway**

The pathway FA coordinates reactions that signal DNA damage ICLs. Eight proteins (FANCA, B, C, E, F, G, L and M) form the FA core, plus at least four FA-associated proteins, FAAP16, FAAP20, FAAP24 and FAAP100 (3). The critical step in Fanconi pathway activation is the formation of FA-ID (FANCI and FANCD2) complex. The ubiquitination of FA-ID complex is performed by enzymes E1, E2, and E3. E1 activates the ubiquitin molecule by

hydrolysis of ATP and transfers this molecule to E2, which is also mixed ubiquitin. E3 ubiquitin ligase enzyme has activity and is capable of transferring ubiquitin molecule coupled to the substrate, also conferring binding specificity. The UBE2T enzyme (Ubiquitine-conjugating enzyme 2T) acts in FANCD2 ubiquitination. Also, FANCL protein has the domain PHD type "RING finger", which has E3 ligase activity. The association with FANCL with E3 allows direct transfer of ubiquitin-conjugated E2 (UBE2T) for the specific area of the FANCD2 substrate (3).

After ubiquitination, the FA-ID complex localizes to sites of DNA damage, where it coordinates the repair of the ICL along with other proteins coupled downstream (FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP1, FANCD3/PALB2, FANCD4/RAD51C, FANCD5/SLX4). Some work suggests that FANCD2 ubiquitination is required to the ICLs repair process, while ubiquitination of FANCI provides a regulatory mechanism, accentuating the repair capacity (23).

The active ID complex relocates to the damaged DNA in an ATR- and BRCA1-dependent manner (23), promotes nucleolytic cleavage of the 3' and 5' sites of DNA to unhook the ICL and, successively, induces translesion polymerases REV1 and Pol  $\zeta$  (18). These reactions extend the leading DNA strand above and past the unhooked ICL to produce a substrate that is processed by the homologous recombination (HR) pathway (2). In this work, we present in Table 1 the known genetic subtypes of FA, their genes and location on chromosomes, and the activity of each protein in this pathway. The FA pathway interacts with various DNA repair mechanism, such as HR and translesion synthesis (TLS) (4).

According to Nalepa and Wade (24), biallelic mutations in FANCD1/BRCA2 lead to premature bone marrow failure and hematopoietic malignancies with greater predisposition to childhood brain tumors and other solid tumors. This has been an indication that FA proteins can be related to DNA repair signaling in cancer cells (5,6).

The FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP1, FANCN/PALB2, FANCR/RAD51 and FANCS/BRCA1 proteins form the third group of FA proteins. Cells defective in some of these proteins have normal FANCD2 ubiquitination, indicating that these proteins function either downstream of the ID complex or in a parallel pathway (25,26). An important feature of this group of proteins is their connection to breast cancer. The first evidence for this was the identification that the FANCD1 gene is actually BRCA2. BRCA2, along with BRCA1/FANCS, represent the two major tumor suppressor genes, and mutations in them are correlated with ovarian and breast cancer (27). It is believed that the FANCD1 and FANCN/PALB2 proteins participate in the process of homologous recombination due to their interaction with RAD51/FANCR (28), which appears to induce the formation of RAD51 oligomers on single DNA strand, a key step in HR (29).

FA cells sensitivity to ICLs is attributed to DNA repair deficiency, since the first reports date back to the mid-1970s, in analogy with other genetic disorders categorized by DNA repair defects. ICLs are the most toxic form of DNA damage that can occur in a proliferating cell, and can result in apoptosis; consequently, proliferating cells and tissues are committed (16-18). After ICLs formation, in an attempt to solve this problem, the signaling pathways and DNA damage repair proteins are recruited by cells. In this sense, HR, non-homologous end joining (NHEJ), nucleotide excision repair (NER) and TLS work in collaboration with FA, in an effort to maintain genomic integrity (4,5,7,8).

## **Crosstalk between FA network and DNA repair pathways**

### *Homologous recombination*

It is a fact that many FA proteins are involved in HR. Firstly, BRCA2, the protein required for RAD51 loading onto ssDNA, is FANCD1. This evidence of link between the pathways is supported by the observation that BRCA1 loss induces a decrease in FANCD2 foci formation in the nucleus, but does not alter FANCD2 ubiquitination (9).

FANCM play a role in HR independently of the FA network, because depletion of this protein reduces RPA foci formation at ICL, whereas depletion of the FA core (excluding FANCM) didn't present a similar response (11). Besides, FANCM is needed for proper recruitment of C-terminal binding protein interacting protein (CtIP) and MRN end resection at the site of ICL for HR (8).

FANCM, along with BRCA2/FANCD1, also participate in HR by working as a binding partner in regulating the function of BRCA2. On the other hand, PALB2 (FANCN) and BRIP1 (FANCI/BACH1) are regulators of BRCA1. It has been shown that BRCA2 interacts directly with FANCG, allowing FANCG to co-localize with RAD51 after DNA damage (11). Moreover, the inactivation of FANCG decreases HR (12). These studies suggest that FA pathway activation is required to provide a crosstalk between the FA network and the HR pathway. FANCD2 participates in the recruitment of Pol  $\eta$ , FANCD2 expression increases HR by 2-fold, and the ubiquitination site of FANCD2 is required for this action (14), which indicates that the integration between FANCD2 and Pol  $\eta$  plays a role in HRR. Furthermore, loss of CtIP leads to a decrease in FANCD2 accumulation at the ICL site (10). This suggests that BRCA1 and CtIP play a role downstream of the FA core complex allowing for FANCD2 foci formation at the site of damage (15).

### *Nucleotide excision repair*

In a common ICL repair pathway, after the damage recognition and FA core complex recruitment, FANCD2-FANCI heterodimer is ubiquitinated by FANCL and UBE2T, allowing the nucleolytic incision and unhook of the ICL. These steps are performed by NER endonucleases, and as example of this interaction, several studies have suggested that NER-deficient cell lines are sensitive to ICL agents. The NER protein most cited as implicated in ICL repair is ERCC4 (encoded by FANCO), which coordinates nucleolytic incisions in the ICL repair and is mutated in FA patients, meanwhile other NER components, like XPA and XPC, appear to be involved in FA core complex formation (29,30). In addition, a study revealed that UBE2T and FANCM are functionally linked to NER, since knockout cells for their genes demonstrated sensitivity to UV-induced DNA damage, and genetic dissections suggested that both of them collaborate in NER protection of cells exposed to UV (30). Furthermore, Pol  $\eta$  (or XPV), a TLS polymerase recruited by FANCD2 and responsible for replicating DNA across UV light photoproducts, when deficient, results in functional NER and impaired TLS, indicating a role of FANCD2-Pol  $\eta$  interaction in the regulation of a crosstalk among FA pathway, NER and TLS (30,31).

### *Translesion synthesis*

Several studies had demonstrated the crosstalk between translesion synthesis and Fanconi Anemia pathways, but the sequence of events between NER and TLS are still under investigation. During the ICL repair, the formation of FANCI/FANCD2 and subsequent ligation of these proteins at the ICL allow the recruitment of endonucleases in order to remove the ICL through NER; then, the ICL nucleotide tethered to the complementary strand is bypassed by

translesion synthesis polymerases such as REV1 and DNA polymerase  $\zeta$  (REV3-REV7)1. After the low fidelity TLS polymerases have been recruited and filled in the gap, ligation restores an intact DNA duplex, which functions as a template for homologous recombination (HR). Low fidelity translesion synthesis polymerases are recruited to ICL by the ubiquitinated PCNA recognition and this recruitment is facilitated by the FA core complex through the interaction of FAAP20 with REV1 (2,3).

It is important to note that the step of insertion is responsible for most of the point mutations that are observed at sites of ICL repair, whereas the approach and extension steps are almost completely error-free (2). The proteins that carry out insertion are still unknown, albeit there are some probable candidates such as Pol  $\eta$ , the TLS polymerase capable of extending D-loop structures formed during HRR, and Pol  $\nu$ . FANCD2 participates in recruiting of Pol  $\eta$ , and Pol  $\nu$  also interacts with FANCD2 and FANCR/RAD51 (13,19).

It would be interesting to investigate whether the depletion of either TLS polymerases abrogates the insertion step in the ICL repair. Once the ICL has been unhooked from one of the DNA strands, the TLS polymerases carry out lesion bypass by incorporating nucleotides opposite the lesion, and extending the strand, but this can introduce mutations in the genome. The exact function of the FA pathway after DNA damage and replication fork stalling is still uncertain. However, as described above, it is clear that this pathway act in coordinating various aspects during DNA damage response, including direct enzymatic DNA processing, recruitment of proteins involved in HR and TLS, and also in cell cycle arrest (18,32). The Figure 2 shows the main steps of the pathway Fanconi.

### **Immortalized cells as model FA study**

Studies describe that the bone marrow deficiency in patients with FA is due to dysfunction and depletion of hematopoietic stem cells (HSC). This is because these patients have lower levels of CD34 + and progressive impairment of HSC, which is connected to the DNA damage response mediated by p53/p21 proteins. Knockdown of FA genes in human cells, especially for genes encoding the FANCA and FANCD2 protein, lead to a significant reduction in production of HSCs and differentiation of progenitor cells in vitro. Assays using FA immortalized cell lines help in understanding the conditions for chromosomal instability and interactions between FA proteins; it was shown that the reduction in the number of hematopoietic cells is due to a DNA damage repair deficiency, which leads to increased apoptosis (33).

HSCs are capable of self-renewing, have a high risk of accumulating mutations and, thus, may require fewer events to become senescent or transformed. In addition, HSC aging can be assessed in a quantitative fashion with well-established assays. Since senescence can cause stem cell depletion, which can conceivably lead to organismal aging, such studies may yield important insights to the mechanisms of aging. Functional failure of HSCs can result in the decrease in number and function of HSCs and progenitor cells leading to the development of anemia, neutropenia and thrombocytopenia, and has been implicated in hematologic diseases such as bone marrow (BM)-failure diseases such as FA, myelodysplastic syndromes (MDS) and aplastic anemia (34).

Using immortalized lymphoblasts, Zanier et al (35) demonstrated that cells deficient in AF FANCA and FANCC were also sensitive to the inducing agent ICLs compared with the proficient strains. In the same study the analysis of gene expression, such as TGF- $\beta$ , MMP7 and

IPL in FA cells showed that these and other genes had low or absent expression (34). We also work with immortalized lymphoblasts lines deficient in more frequently complementation groups of FA, *FANCA* and *FANCC*. In Figure 3, the sensitivity to MMC and CIS of the defective strains in complementation groups A and C, *FANCA* and *FANCC*, compared with the wild type (WT) line, which shows normal expression of these proteins, using trypan blue and XTT assays.

In order to study the sensitivity of these cells to different concentrations of ICLs-inducing agents, FA strains can be used to understand the mechanisms of DNA damage and repair, using simple techniques such as comet assay. Much of the work that analyzes DNA damage in the FA through the comet assay used peripheral blood of patients with the disease or knockout animals for one of the complementation groups. Yuan et al. (35), using *FANCF* and *FANCD2* silenced cells treated with MMC after 24 hours and analyzed by alkaline comet assay, showed that the MMC treatment led to increased DNA damage and delayed DNA repair after drug withdrawal (35).

In this regard, in vitro studies have led to different conclusions about the radiosensitivity of these cells that have sometimes been explained by the different assays, cell lines or complementation groups used in the studies. At the molecular level, discrepant results have also been obtained regarding the involvement of FA proteins in homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). Again, the use of cells corresponding to different species or to different complementation groups, or the use of experimental models in which DNA damage was produced in plasmids previously transfected in mammalian cells, could account for the different conclusions of these studies (36).

Other works using lymphoblasts from FA patients used the comet assay to assess DNA damage after treatment with radiation and/or antineoplastic drugs. The results showed increased

DNA damage in FA lymphoblasts when compared to controls. But this was not a significant result when comparing the damage of FA lines before and after radiation; this is due to the large initial number of breaks in the DNA generated by normal FA (33,34). In this sense, using the antineoplastic agent cisplatin, we treated the mutated lymphoblasts, *FANCA* and *FANCC*, and WT cell, with different cisplatin concentrations for 24 hours (Figure 4). Our results showed a dose-dependent increase in DNA damage in all strains, including WT strains (Figure 4). Mohseni Meybodi & Mozdarani (37) describe that under the conditions tested, the comet assay could be used as a differential test in the diagnosis of bone marrow failure, because AF lymphoblasts have high baseline compared to control line (38). The persistently increased basal damage may reflect exposure to carcinogens or deficient repair of DNA damage (36). Our results are in disagree with this possibility, and our suggestion is that maybe the comet assay can be used to kinetics study in FA deficient cells.

DNA repair that occurs in the G2 phase is related to revision and DNA repair before progression into mitosis. Many studies have demonstrated that repair in the G2 phase of FA cells occurs later than in cells from control groups. FA cells in G2 arrest are increased when they are exposed to clastogenic agents or high oxygen tension (37,38). This can be explained by the fact that these cells fail to carry out DNA repair and therefore remain in the G2 phase of cell cycle. Therefore, flow cytometry can be used to identify FA cells exposed to clastogenic agents by quantification of their arrested frequency in the G2 phase of the cell cycle, with the same efficiency of cytogenetics. In addition, flow cytometry is already used in the diagnosis of the FA. In the literature, DEB, MMC and CIS clastogenic agents are used for FA cell cycle analysis (38).

We used flow cytometry to characterize our lymphoblast strains after CIS and MMC treatment. In our analysis of the cell cycle (Figure 5), the results indicate that the absence of

Fanconi proteins (FANCA and FANCC) leads to a cell cycle progression that is similar to that of untreated cells, suggesting a possible lack of control of cycle progression after damage induction. In WT line there is an increased S cell cycle population in comparison with untreated cells, whereas after treatment with MMC, there was an increase in the G1 population, indicating that for both treatments there is likely a cell cycle arrest in order to repair DNA damage induced by these genotoxic agents. On the other hand, the Fanconi deficient cells show no significant differences between cells distribution per phase of the cell cycle, which may indicate a lack of cell cycle progression control. This absence of progression control may result in the death of these cells, as shown in Figure 3.

### **Mitochondrial dysfunction in FA**

Mitochondrial dysfunction is an important feature of FA cells. Some studies have shown the accumulation of damage induced by ROS, resulting in a higher sensitivity. Changes in redox active proteins in the process, as with FANCA and FANCC associated with the P450 and NADPH cytochrome GST, leave the cell more susceptible to attack by ROS (39). In special, the redox imbalance is closely related to mitochondrial abnormalities already described in some FA genetic subtypes (A, C, D2 and G), pointing to the link between mitochondrial dysfunction and cellular phenotype of FA. One of the mitochondrial abnormalities related to FA is mitochondrial morphology change, such as membranes damage and anomalous shapes, which can lead to mitophagy, an event caused by a decrease of the mitochondrial membrane potential and overproduction of ROS (39).

The analysis of RNA obtained from bone marrow cells of patients with FA and healthy subjects have shown alterations in the expression of genes with antioxidant and/or metabolizing

activity. The enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) have been shown to decrease the frequency of chromosome breaks induced by ionizing radiation in vitro in human lymphocytes (39,40). These enzymes probably protect against radiation damage by interfering with the production of highly reactive hydroxyl radical (HO•) (39). Our group evaluated the antioxidant activity of catalase in *FANCA* deficient and WT lines. The *FANCA* line showed a sharp decrease in the catalase activity after treatment with CIS when compared to the WT (Figure 6).

In FA patients, high apoptosis rates and reduced growth ability may result in the development of anemia, neutropenia, thrombocytopenia and bone marrow failure. Elevated basal oxidative stress, DNA repair defects, altered expression of TNF-alpha and other cytokines are recognized hallmarks of the FA phenotype. The majority of the phenotype-related manifestations in FA can be linked to redox alteration. FA cells display altered morphology at nuclei, mitochondria and subcellular reticula, altered expression and processing of selected structural proteins and defects in the respiratory and energy metabolism (39,40).

Other studies have provided evidence for a role of oxidative stress in FA phenotype. According to the 'pro-oxidant state' theory, a major defect in FA phenotype reflects endogenous DNA damage related to abnormalities in redox pathways accounting for the FA clinical phenotype, that is, bone marrow impairment, cancer proneness, malformations, type II diabetes mellitus and anomalies in cutaneous pigmentation (39,41). These are common hallmarks of diseases where impaired oxygen metabolism and mitochondrial damage play a role.

Evidence supporting this model comes from a number of in vivo and in vitro studies, including (i) excess oxidative DNA damage in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposed FA cells and in white blood cells from patients with FA; (ii) increased sensitivity to oxygen and free iron; (iii) protective effects of

low-molecular-weight antioxidants, antioxidant activities or hypoxia that have been reported to correct chromosomal instability, apoptotic responses and cell-cycle defects in FA cells (42,43).

ROS excess can damage the mitochondria leading to ATP synthesis decrease, carbonylation and deactivation of various proteins from mitochondrial membrane and also a decrease in the number of mitochondria. Previous studies report the toxicity of chemical ICL-inducing agents in FA cells, raising the importance of knowing how the ROS formed by these agents induce mitochondrial and DNA damage (41,42,43). In accordance to this, our results showed that after CIS treatment *FANCA* deficient lymphoblast cells showed an increase in radical species formation, measured by DCF fluorescence assay (Figure 7A), and higher percentage of mitochondrial depolarization measured by rhodamine-123 incorporation (Figure 7B), when compared to WT line. Bogliolo et al. (6) demonstrated that mitochondrial function was challenged in *FANCA* and *FANCC* defective lymphoblastoid cells with rhodamine-123 and doxycycline. They observed that FA cells, unlike control cells, were not affected by these treatments, which resulted in lowered levels of ATP and in an increased number of cells undergoing apoptotic cell death. On the other hand, FA cells were very sensitive to 2-deoxy-d-glucose and iodoacetic acid, two inhibitors of the glycolytic metabolism and the findings suggested that FA cells had adapted to withstand mitochondrial stress while relying on glycolytic metabolism (6).

As demonstrated by Kumari et al.(42), toxicity of agents that cause ICLs in FA cells may be due to accumulation of ROS in mitochondria. Oxidative stress seems to further extend the functional change in *FANCA* cells. In our work, the increased production of ROS and higher depolarization of the mitochondrial membrane occurred in a CIS dose-dependent manner in *FANCA* cells. This data may be associated with the widespread use of NADH or availability of

complex I of the mitochondrial respiration. The difference in ROS tolerance may be a functional mutant proteins characteristic of FANCA. Nevertheless, since the relationship between structure and function of FANCA is not yet clear, it is not possible to relate it to the results we found. It has been demonstrated that the cytoplasmic expression of FANCA protein has no functional correlation between genotype and phenotype (4,19,42,43).

### **Final considerations**

FA is a rare disease characterized by increased chromosomal instability induced by spontaneous and DNA ICL agent. Patients with FA have progressive pancytopenia and cancer susceptibility. It is known that the FA proteins are associated with the signaling and DNA repair reactions coordinates that indicate ICLs of DNA damage. The FA proteins crosstalk with other repair pathways, such as NER, TLS and HR (1,2).

Consistent with the observations that cells derived from FA patients are intolerant to oxidative stress, it has been reported that FA proteins, particularly the complementation groups A and C (FANCA and FANCC proteins, respectively), play a crucial role in oxidative stress signaling in a variety of cell types, including hematopoietic cells (34).

Lymphoblasts of FA can be a good objects work model in studies of the disease. Previous sStudies have describeddescribing the cell deficiency in bone marrow FA, due to dysfunction and depletion of hematopoietic stem cells, increased apoptosis, because of deficiency inof repair DNA damageDNA damage repair. As in other studies, we found in FANC-A and FANC-C deficient lines, after treatment with CIS and MMC, a decrease in cell viability, an increase in DNA damage, absence of cell cycle arrest, and increase in ROS formation and mitochondrial depolarization . It was previously reported that cells with mutations

in FANCA and FANCC can be basedrely in part on glycogenolytic metabolism, usually associated with transformation strategy and resistance to co-factors that interfere with mitochondrial electron transport chain (44,45,46).

Oxidative stress, defined as an imbalance between the production of ROS and anti-oxidant defense, is associated with many disease states, including FA, which is arguably the only human genomic instability syndrome that is uniquely sensitive to oxidative stress. FA oxidant hypersensitivity has been documented in many studies using primary and immortalized cell cultures, as well as ex vivo materials from patients. While FA murine models do not recapitulate some of the major FA clinical manifestations such as bone marrow failure and leukemia, cells from FA-deficient mice exhibit extreme oxidant sensitivity. All the observations indicated that the altered redox state in these FA mice was responsible for an impairment of cell proliferation or survival (43,44,45).

Despite the many studies on the FA, we are still not sure about the mechanisms that lead to FA and the different phenotypes that it presents. We believe that the interaction between the FA proteins, repair pathways and mitochondrial function may be the key factor. Mitochondrial dysfunction present in FA is little known, but it is known their importance to the variety of ROS and antioxidant activity of low-present in these cells (45,46,47).

An involvement of ROS in the FA phenotype, far from unique, is acknowledged as other disorders, including mitochondrial dysfunction and other genetic diseases. This DNA damage signaling system is evolutionarily conserved in order to defend the stability of the genome. The same should be adapted after the aerobic period of the post-Cambrian, where the damage caused by atmospheric oxygen, the second element more reactive non-metal must be constantly

repaired. Thus, it was thought that the FA protein function in DNA repair must be connected to handle i) oxygen toxicity, ii) elimination of endogenous and exogenous excess molecules through redox oxygen routes, such as cytochrome P450 (46,47,48).

Clinical phenotypes of FA suggest disfunctions of mitochondria, the organelle responsible for altered cellular energy metabolism, and also serving as an important producer and the most susceptible target from ROS. Therefore, changes in the mitochondria FA may be a clue to the susceptibility of FA cells to oxidative agents. High levels of ROS have been implicated in cellular antioxidant defense avoidance mechanisms and thereby cause mitochondrial damage. This damage is compounded when the network systems and endogenous antioxidants are overwhelmed repair as observed in FA. There protein interactions reports and the involvement of FA protein functions related to redox FA. Thinking about it, we prepared a model taking into account DNA damage, mitochondrial dysfunction, and ROS production over the course of the disease (Figure 8). The influence redox states in FANCA were demonstrated by their ability to form disulfide bonds in the FA complex. Deficiency in the FANCA gene stimulated a response to oxidative DNA damage and a growth arrest dependent on p53. It was demonstrated that ROS induced in response FANCA p53 - / - cells was probably due to accumulation of unrepaired DNA damage (47,48). There are also reports suggesting that p53 activation leads to increased levels of ROS, leading to cell death likely to interfere with mitochondrial function and / or integrity and that the levels of ROS in turn by an ancillary feedback mechanism for p53 stabilization and therefore contribute to the increased activity. Recently, the occurrence of mitochondrial defects was demonstrated by Kumari et al. (43,47,48).

The alternative may be the use of antioxidants with degradable potential just inside the mitochondria. Mediation of ROS in mitochondria in FA is a challenging strategy. Eventually,

mitochondrial activity and metabolism appears as an important point in the pathological manifestations of FA. Unfortunately, there are few data on the mechanisms involved in mitochondrial dysfunction, apoptosis deregulation in common with the FA. Elucidation of these can help in the development of new therapeutic strategies for this and other diseases associated with these activities (13,39,46).

### **Experiments presented in this work**

- Cell Lines and Culture Conditions. The Epstein-Barr virus (EBV)-transformed normal and mutant (FA) lymphoblast lines were generously supplied by Filippo Rosselli (Villejuif, France) and have been previously described (7,51). All lymphoblast lines were maintained as suspension cultures in RPMI medium 1640 supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum. They were grown at 37°C in a humidified, 5% CO<sub>2</sub>-containing atmosphere. In XTT and cell cycle experiments, strains were treated with MMC and CIS for 24 hours. For the other tests, the strains were treated for 24 hours with CIS.
- Viability assays. MTT reduction was performed according to Denizot and Lang (1986) and TB exclusion as previously described by Uliasz and Hewett (2000) (52,53).
- Comet assay. The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. (1988) with minor modifications (Hartmann and Speit, 1997) (54,55).
- Cell cycle profile. After treatment cells were washed with saline solution and then stained with 16 µg/mL propidium iodide (Sigma) in the presence of 0.1 mg/mL RNase A (Invitrogen). Samples were analyzed on a FACS Calibur flow cytometer (BD PharMingen) using the CellQuest program suite.

- Catalase activity. The CAT activity was determined by the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) decomposition rate, according to Aebi (1984) (56).
- Reactive oxygen species (ROS) detection and mitochondrial function analysis. Levels of intracellular ROS and mitochondrial function were estimated following treatment using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA, Sigma) and Rhodamine-123 as, as a fluorescent probes, respectively. Cells were analyzed using a FACS Calibur flow cytometer with CellQuest program suite.

### **Acknowledgments**

This research was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant no. 86205/2013-4) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **References**

1. Smith, A.R. and Wagner, J.E. Current clinical management of Fanconi anemia (2012). *Expert. Rev. Hematol.* 1; 5(5):513–22.
2. Auerbach, A.D. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis (2015). *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 85:8.7.1–8.7.17
3. Walden, H. and Deans, A. The Fanconi Anemia DNA Repair Pathway: Structural and Functional Insights into a Complex Disorder (2014). *Ann. Rev. Biophys. Annual.* 43(1):257–78.

4. Deakyne, J., Mazin, A. Fanconi anemia: at the Crossroads of DNA repair. *Biochem Mosc.* 2011;76 (1):36–48.
5. McCauley, J., Masand, N., McGowan, R., Rajagopalan, S., Hunter, A (2011). X-linked VACTERL with hydrocephalus syndrome: further delineation of the phenotype caused by FANCB mutations. *Am. J. Med. Genet. A* 155:2370–80.
6. Bogliolo, M., Borghini, S., Abbondandolo, A., Degan, P. Alternative metabolic pathways for energy supply and resistance to apoptosis in Fanconi anaemia(2002). *Mutagenesis* 17(1):25-30.
7. Whitney, M.A., Saito, H., Jakobs, P.,M., Ra, G., Moses, R., Grompe, M.(1993) A common mutation in the FANCC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nature Gen.* 4(2) 202-205.
8. Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., Thayer, M., Cox, B., Olson S., D'andrea, A.D., Moses, R., Grompe, M(2001). Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol. Cell.*7, 241-248.
9. Waisfisz, Q., Saar, K., Morgan, N.V., Altay, C., Leegwater, P.A., De Winter, J.P., Komatsu, K. The Fanconi anemia group E gene FANCE, maps to chromosome 6p. (1999). *Am. J. Hum. Genet.* 64(5) 1400-1405.
10. Zhao, L., Li, N., Yu, J.K., Tang, H.T., Li, L., He, M., Yu, Z.J., BaI, X.F., Zheng, Z.H. RNAi-mediated knockdown of FANCF suppresses cell proliferation, migration, invasion, and drug resistance potential of breast cancer cells (2014). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 47(1): 24-34.

11. Saar, K., Schindler, D., Wegner, R., Reis, A., Wienker, T., Hoehn, H., Joenje, H.  
Localization of Fanconi anaemia gene to chromosome 9p (1998). *Eur. J. Hum. Genet.*  
6(5) 501-508.
12. Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B., Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.,  
Elghalbzouri-Maghrani, E. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia  
complementation group J (2005). *Nat. Genet.* 37 (9) 934-935.
13. Dong, H., Nebert, D., Bruford, E., Thompson, D., Joenje, H., Vasiliou, V (2015). Update  
of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum. Gen.* 9 (1):32.
14. Schwab, R.A., Nieminuszczy, J., Shah, F., Langton, J., Martinez, D.L., Liang, C.C.,  
Cohn, M.A., Gibbons, R.J., Deans, A.J., Niedzwiedz, W. The Fanconi Anemia Pathway  
Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription (2015). *Mol.*  
*Cell.* 2015, 60 (3) 351-261.
15. Rohleder, F., Huang, J., Xue, Y., Kuper, J., Round, A., Seidman, M., Wang, W., Kisker,  
C. FANCM interacts with PCNA to promote replication traverse of DNA interstrand  
crosslinks (2016). *Nucleic Ac Res* 20 ; 44(7): 3219–3232.
16. Tischkowitz, M., Xia, B. PALB2/FANCN - recombining cancer and Fanconi anemia  
(2010). *Cancer Res*, 1;70(19): 7353–7359.
17. Hashimoto, Y., Chaudhuri, A.R., Lopes, M., Costanzo, V. Rad51 protects nascent DNA  
from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis (2010).  
*Nat. Struct. Mol. Biol.* 7:1305–1311.
18. Kim, H., D'Andrea, A.D. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi  
anemia/BRCA pathway (2012). *Genes Dev.* 1;26(13):1393-408.

19. Rosenberg, P.S., Tamary, H., Alter, B. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States American and Israel (2011). *Am J Med Genetics* 11(3-4):241–8.
20. Hill, S.J., Rolland, T., Adelmant, G. Systematic screening reveals a role for BRCA1 in the response to transcription-associated DNA damage (2014). *Genes Devl.* 28:1957–1975.
21. Wen, M., Kwon, Y., Wang, Y., Mao, J.H., Wei, G. Elevated expression of UBE2T exhibits oncogenic properties in human prostate cancer (2015). *Oncotarget.* 6 (28): 25226- 25239.
22. Fu, D., Calvo, J.A., Samson, L.D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents (2012). *Nature Rev. Cancer* 12: 104-20.
23. Bogliolo, M., LykhJovich, A., Calle, E., Castella, M., Cappelli, E., Ramirez, M., Surralles, J. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability (2007). *EMBO J* 26 (5): 1340-1351.
24. Nalepa, G., Clapp, D.W. Fanconi anemia and the cell cycle: new perspectives on aneuploidy (2014). *F1000Prime Rep.* 2014, 6:23; 1-10
25. Wang, X.Z, D’Andrea, A.D. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response (2004). *DNA Repair* 3 1063–1069.
26. Sawyer, S.L., Tian, L., Kähkönen, M., Schwartzenruber, J. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype (2015). *Cancer Disc.*
27. Gambino, G., Tancredi, M., Falaschi, E., Aretini, P., Caligo, M.A. Characterization of three alternative transcripts of the BRCA1 gene in patients with breast cancer and a

- family history of breast and/or ovarian cancer who tested negative for pathogenic mutations (2015). *Int. J. Mol. Med.* 35:950–6.
28. Jacquemont, C., Taniguchi, T. The Fanconi anemia pathway and ubiquitin (2007). *BMC Biochem* 8 (1):10.
29. Kagawa, W., Arai, N., Ichikawa, Y. Functional analyses of the C-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein (2014). *Nucleic Acids Res.* 42:941–51.
30. Kelsall, I.R., Langenick, J., MacKay, J., Patel, K.J., Alpi, A.F. The Fanconi Anaemia Components UBE2T and FANCM Are Functionally Linked to Nucleotide Excision Repair (2012). *PLOS One* 7 (5): 1-10.
31. Moldovan, G.L., D'Andrea, L.D. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome (2009). *Annu. Rev. Genet.* 43:223–49.
32. Muniandy, P.A., Liu, J., Majumbar, A., Liu, S.T., Seidman, M.M. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step (2010). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Bio.* 45: 23–49.
33. Longerich, S., Kwon, Y., Tsai, M., Hlaing, S.S., Sung, P. Regulation of FANCD2 and FANCI monoubiquitination by their interaction and by DNA (2014). *Nucleic Acid. Res.* 42:5657–70.
34. Zhang, X., Sejas, D. P., Qiu, Y., Williams, D.A., Pang, Q. Inflammatory ROS promote and Cooperate with the Fanconi anemia mutation for hematopoietic senescence (2007). *J Cell Sci.* 5 (1) 120(Pt 9): 1572–1583.

35. Zanier, R., Briot, D., du Villard, J.A., Sarasin, A., Rosselli, F. Fanconi anemia C gene product regulates expression of genes involved in differentiation and inflammation (2004). *Oncogene*, 24;23(29):5004-13.
36. Yuan, F., El Hokayem, J., Zhou, W., Zhang, Y. FANCI protein binds to DNA and interacts with FANCD2 to recognize branched structures (2009). *J Biol Chem* 84:24443–24452.
37. Casado, J.A., Callén, E., Jacome, A. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network (2007). *J. f Medical Genetics*. 2007;44(4):241-249.  
doi:10.1136/jmg.2006.044719.
38. Mohseni-Meybodi A, Mozdarani H, Mozdaran S. DNA damage and repair of leukocytes from Fanconi anaemia patients, carriers and healthy individuals as measured by the alkaline comet assay(2009). *Mutagenesis*, 24(1 ) 67–73.
39. Moreira, C.F.A., Brito Júnior, L.C., Lemos, J.A.R. Flow cytometry for diepoxybutane test analysis (2008). *Gen. Mol. Res* 7 (4): 1353-1359.
40. Pagano, G., Talamanca, A. A., Castello, G., Cordero, M. D., d'Ischia, M.,Gadaleta, M. N., Pallardó, F. V., Petrović, S., Tiano, L. & Zatterale, A. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction across broadranging pathologies: toward mitochondria-targeted clinical strategies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 541230.
41. Nordenson, I. Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia (1977). *Hereditas* 86:147-150.

42. Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells (2012). *Cell Stem Cell* 11(1):36–49
43. Kumari, U., Ya, W., Jun, B., Huat, B., Lyakhovich, A. Evidence of mitochondrial dysfunction and impaired ROS detoxifying machinery in Fanconi Anemia cells (2012). *Oncogene* 1–8.
44. Richter, C., Kass, G.E. Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation (1991). *Chem. Biol. Interact.* 77: 1–23.
45. Li, J., Sipple, J., Maynard, S., Mehta, P.A., Rose, S.R., Davies, S.M., Pang, Q. Fanconi Anemia Links Reactive Oxygen Species to Insulin Resistance and Obesity (2012). *Antioxid. Redox Signal* 15;17(8): 1083–1098.
46. Dirmeier, R., O'Brien, K.M., Engle, M., Dodd, A., Spears, E., Poyton, R.O. Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress. Implications for the induction of hypoxic genes (2002). *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 34773–34784
47. Shyamsunder, P., Verma, R.S., Mukhopadhyay, S.S., Lyakhovic L. Involvement of mitochondria in the pathology of Fanconi anemia (2015). (1): 1-24.
48. Cuccarolo, P., Viaggi, S., Degan, P. New insights into redox response modulation in Fanconi's anemia cells by hydrogen peroxide and glutathione depletors (2012). *FEBS J.* 279: 2479–2494.
49. D'andrea, A.D., Grompe, M. The Fanconi anemia/BRCA pathway (2003). *Nat. Rev. Cancer*, 3: 23-24.

50. Pagano, G., Talamanca, A. A., Castello, G., Pallardó, F. V., Zatterale, A. & Degan, P. Oxidative stress in Fanconi anaemia: from cells and molecules towards prospects in clinical management (2012). *Biol. Chem.*, 393, 11–21.
51. Strathdee, C. A., Gavish, H., Shannon, W. R., Buchwald, M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation (1992) *Nature (London)* 356, 763-767.
52. Denizot, F., Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability (1986). *J. Immunol. Meth.* 89, 271–277.
53. Uliasz, T.F., Hewett, S.J. A microtiter trypan blue absorbance assay for the quantitative determination of exocytotoxic neuronal injury in cell culture (2000). *J. Neurosci. Meth.* 100, 157–163.
54. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Scheider, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells (1988). *Exp. Cell Res.* 175 (1), 184–191
55. Hartmann, A., Speit, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay) (1997). *Toxicol. Lett.* 90, 183–188.
56. Aebi H. Catalase in vitro (1984). *Methods Enzymol.* 105:121-6.

### Figure Legends:

**Fig. 1.** Prevailing features in the cells of FA patients. These individuals have high levels of oxidative stress, increased susceptibility to ICLs, due to the sensitivity that these cells present to ROS. They also display bone marrow failure, congenital abnormalities and increased risk of cancer. FAAF cells are more susceptible to exogenous DNA damage caused by ROS attack due to deficiency of the antioxidant system. Furthermore, the DNA of these cells is constantly attacked, leading to the formation of ICLs (orange frames). Due to the defect in DNA damage repair mechanisms, such as repair ICLs, these cells consistently suffer leads to apoptosis (not shown), resulting in bone marrow failure, congenital abnormalities and, in most cases, cancer.

**Figure 2.** Scheme showing the most important steps in FA pathway. The first step involves the recruitment of FANCM, FAAP24 and MHF after replication fork stop. FANCM reshapes the fork and recruit RPA (single-stranded DNA binding protein). RPA coupled to DNA activates ATR, which phosphorylates several targets, including the components of the MRN complex, FANCD2 and FANCI. The MRN complex is associated with the CtiP, which help in strand resection. The FA core includes FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FAAP20, FAAP24 and MHF. The FA core stimulates FANCL in FANCD2 and FANCI ubiquitination. Thus, MUS81-EME1 and ERCC1-XPF/FANCO are recruited to the region of the damage by interacting with FANCP/SLX4. The FA core and FANCD2- FANCI are recruited to chromatin, which facilitates the resolution of the repair through the TLS polymerases (REV1-POL $\zeta$ -POL $\eta$ ) and/or HR machinery (FANCI/BIP1 / Bach1, FANCD1/BRCA2, RAD51, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C and BRCA1).

**Figure 3.** Sensitivity assay with MMC and Cis, in *WT*, *FANCA* and *FANCC* strains, by trypan blue (A) and XTT (B) assays. For both tests of sensitivity and with both drugs tested (MMC and CIS), cell lines deficient in the FA proteins showed higher sensitivity compared to wild type *WT*.

**Fig. 4.** DNA damage index of *FANCA* (A), *FANCC* (B) and *WT* (C) strains, after treatment with CIS for 24 hours at various concentrations. The significant results presented  $p < 0.005$ . There was no significant statistical difference between the strains used.

**Figure 5.** Cell cycle analysis of strains *FANCA*, *FANCC* and *WT*, after 24 hours of treatment with CIS and MMC. The absence of Fanconi proteins (FANCA and FANCC) leads to cell cycle progression very similar to that seen in untreated cells, suggesting a possible lack of control of cycle progression after damage induction. The *WT* strain, after treatment with CIS, showed increased population in S phase compared to untreated cells (negative control), whereas after treatment with MMC, there was an increase of the population in G1, indicating that for both treatments there is likely a cell cycle arrest in order to repair DNA damage induced by these genotoxic agents.

**Figure 6.** Measurement of catalase activity in *WT* (A) and *FANCA* (B) strains, after treatment with CIS. *FANCA* strain showed a sharp decrease in the catalase activity after treatment with Cis when compared to the control strain (*WT*). The significant results presented  $p < 0.005$ . There was no significant statistical difference between the strains used.

**Figure 7.** ROS production was examined by flow cytometry with DCF (2',7'-dichlorofluorescein) and Rhodamine-123 staining. After CIS treatment, FANCA deficient lymphoblasts showed an increase in free radical species formation, measured by DCF fluorescence assay, and higher percentage of mitochondrial depolarization measured by rhodamine-123 incorporation, when compared to wild type strain. The significant results presented  $p < 0.005$ . There was no significant statistical difference between the strains used.

**Figure 8.** Relationship between mitochondrial dysfunction, ROS production, and DNA damage over the course of the disease. The deficiency in FA proteins leads to accumulation of ICL and replication fork arrest. The absence of FA proteins also affect the functionality of the antioxidant system, therefore resulting in excessive production of ROS. Excess ROS leads to inability of mitochondria to detoxify ROS, causing disruption of mitochondrial membrane and fragmentation, and consequently, decrease the production of oxygen (O<sub>2</sub>), lower production of ATP and reduced activity of mitochondrial superoxide dismutase (SOD2). Damage and dysfunction in this organelle are so significant that lead to cytotoxicity. Cells with mitochondrial dysfunction may be directed to apoptosis, causing the classical clinical symptoms of the disease, bone marrow failure, leukemia and formation of solid tumors. Adapted from Kumari *et al.* (43) and Pagano *et al.* (50).

**Table I.** Genetics subtypes genes of Fanconi Anemia.

<b>FA proteins</b>	<b>Gene (NCBI Gene ID)</b>	<b>Function associated</b>	<b>Chromosomal location</b>	<b>Reference</b>
FANCA	<i>FA-H</i>	Ubiquitination of the FA-ID complex	16q24.3	(4)
FANCB	<i>FAAP90, FAB</i>	Ubiquitination of the FA-ID complex	Xp22.31	(5)
FANCC	<i>FA3, FAC</i>	Ubiquitination of the FA-ID complex	9q22.3	(6)
FANCD1	<i>BRCA2, FANCD</i>	Mediator of HR, activated by FA-ID complex	13q13.1	(7)
FANCD2	<i>FA-D2, FA4</i>	Ubiquitination after DNA damage	3p25.3	(8)
FANCE	<i>FACE, FAE</i>	Direct FANCD2 ubiquitinated	6p21.22	(9)
FANCF	<i>FAF</i>	Ubiquitination of the FA-ID complex	11p15	(10)
FANCG	<i>FAG, XRCC9</i>	Ubiquitination of the FA-ID complex	9p13	(11)
FANCI	<i>KIAA1794</i>	Ubiquitination after DNA damage	15q26.1	(12)
FANCI	<i>BRIP1</i>	Helicase, activated by FA-ID complex	17q23.2	(13)
FANCL	<i>PHF9, E3</i>	Associated with E3 ligase in the FA-ID complex ubiquitination	2p16.1	(14)
FANCM	<i>FAAP250,</i>	Helicase, which activates the main complex of proteins	14q21.3	(15)
FANCN	<i>PALB2, PNCA3</i>	Activated the FA-ID complex	16p12	(16)
FANCO	<i>RAD51c</i>	Activated the FA-ID complex	17q23	(17)
FANCP	<i>SLX4, MUS312</i>	Activated the FA-ID complex	16p13.3	(18)
FANCQ	XPF, ERCC4	Activity not been elucidated, it is known that interacts with FANCP	16p13.12	(17)
FANCR	<i>RAD51</i>	Responsible for protecting the new DNA strand	15q15.1	(19)
FANCS	<i>BRCA1, BRCCI</i>	Susceptibility to cancer protein	17q21.31	(20)
FANCT	<i>UBE2T, E2</i>	Associated E2 ubiquitin and FA-ID complex ubiquitination	1q32.1	(21)

Figure 1.

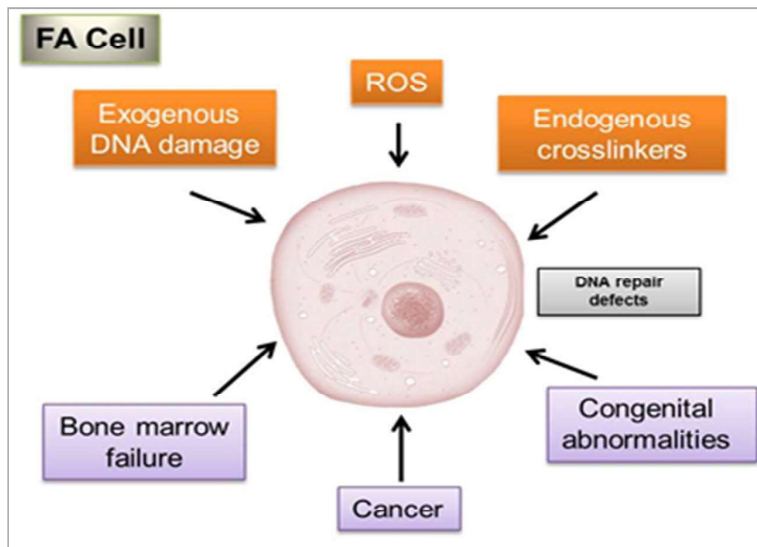


Figure 2.

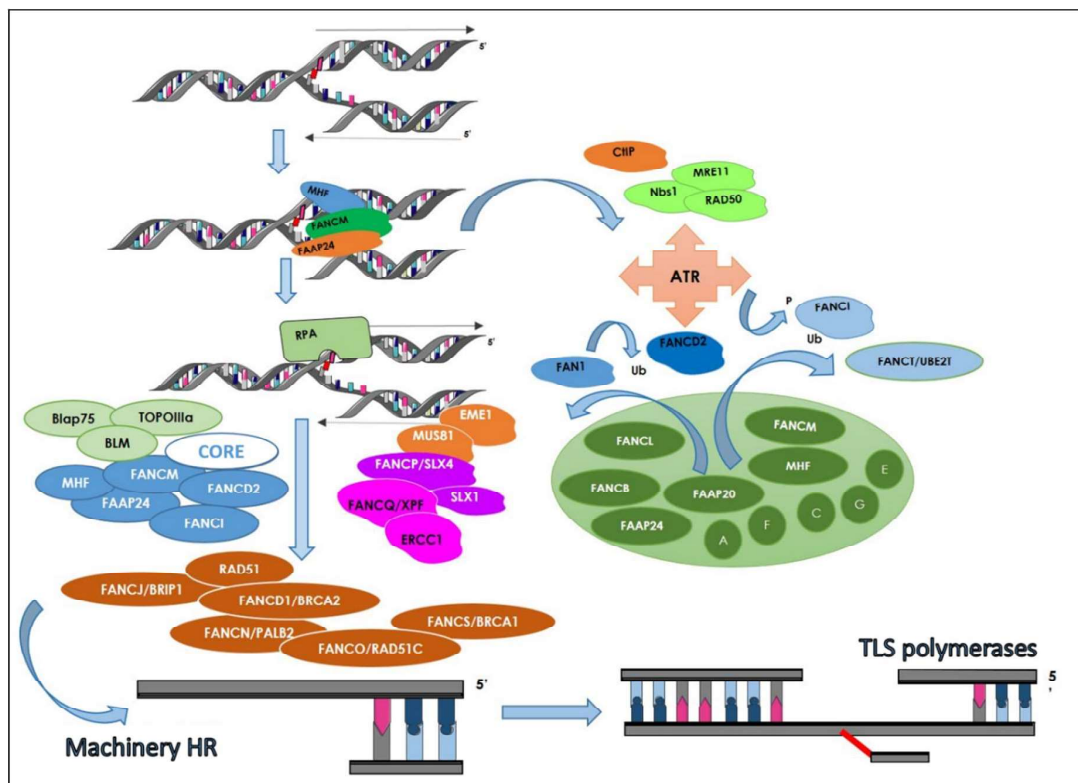


Figure 3.

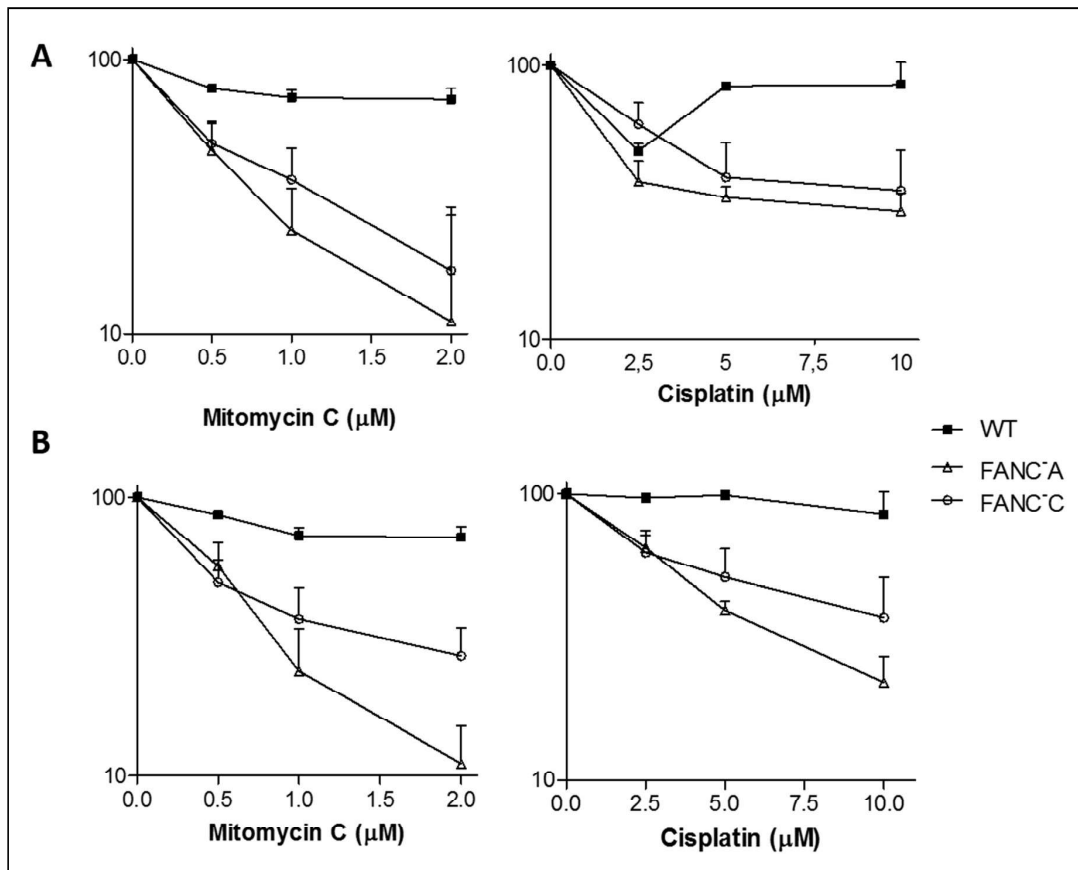


Figure 4.

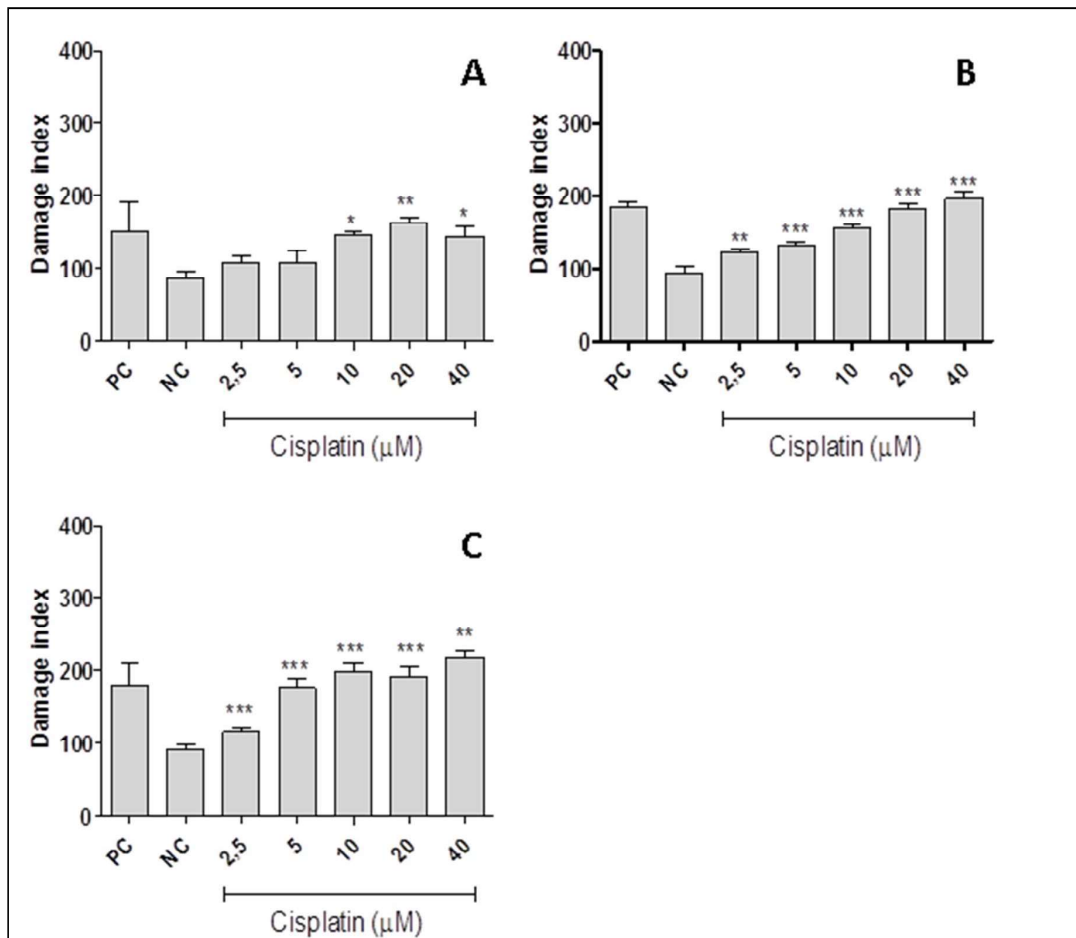


Figure 5.

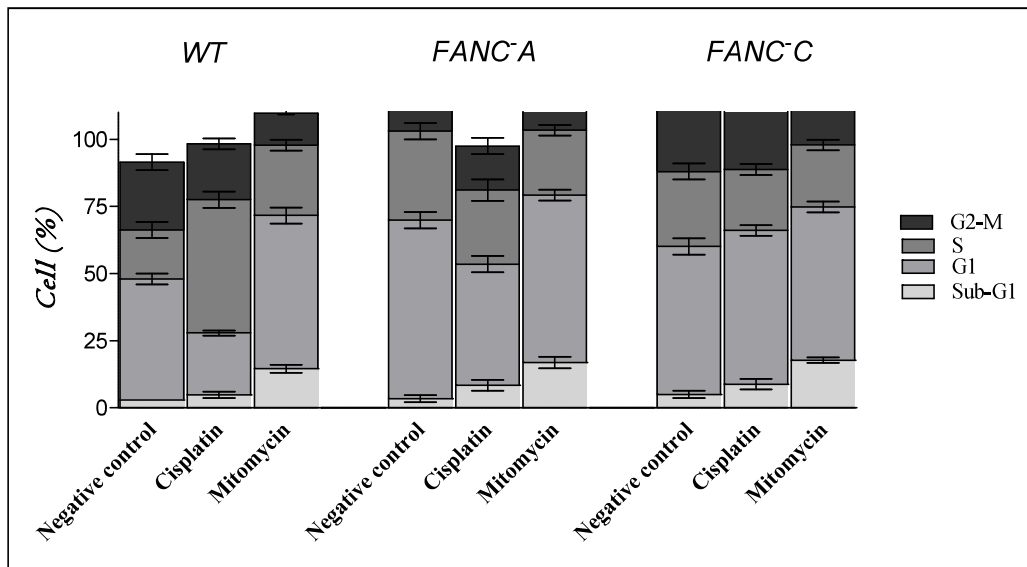
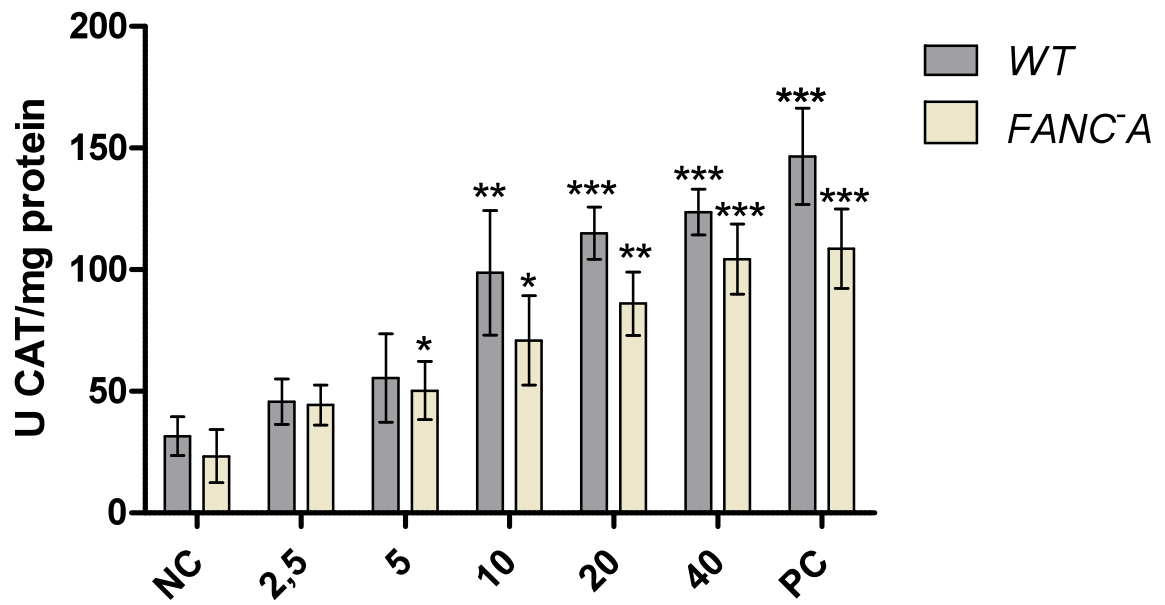
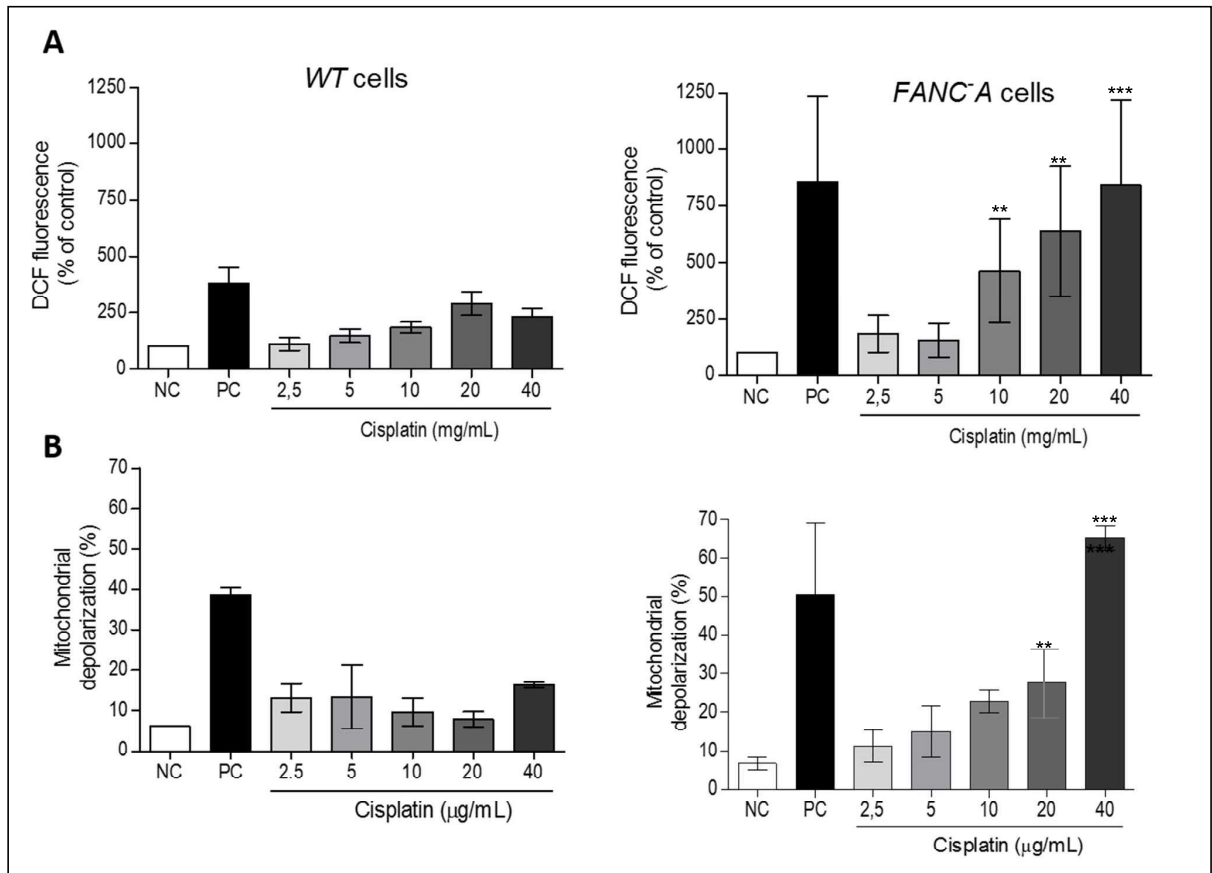


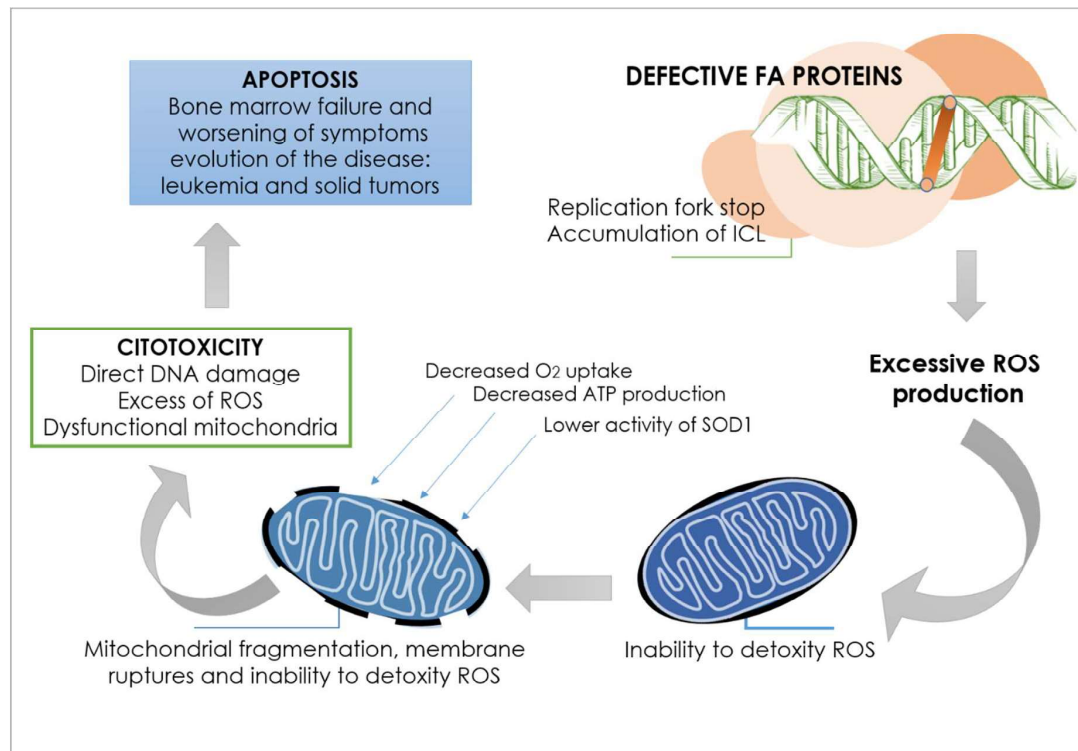
Figure 6.



**Figure 7.**



**Figure 8.**



#### 4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi avaliação de linhagens linfoblásticas de anemia de Fanconi em resposta ao tratamento com agentes quimioterápicos indutores de interstrand-crosslink (ICL). Sabendo-se que células derivadas de pacientes com AF são intolerantes ao estresse oxidativo e apresentam instabilidade cromossômica induzida por agentes que causam *crosslinks* no DNA, utilizou-se como ferramenta de estudo linfoblastos imortalizados deficientes nos grupos de complementação A e C. Ambas linhagens foram tratadas com agentes indutores de dano e os resultados foram comparados a linhagem selvagem (WT).

A fim de determinar a sensibilidade dessas linhagens aos agentes antineoplásicos (mitomicina C e cisplatina), utilizou-se os ensaios de azul de tripan e XTT, após tratamento com diferentes concentrações por 24 horas. As linhagens deficientes nas proteínas de AF, *FANCA* e *FANCC*, demonstraram sensibilidade dose-dependente, quando comparadas a linhagem WT.

É conhecido que esses agentes são capazes de causar danos na molécula de DNA. Com esse intuito, nós tratamos as linhagens deficientes nas proteínas de AF, *FANCA* e *FANCC*, e a linhagem WT por 24 horas com diferentes concentrações do antineoplásico cisplatina. As três linhagens apresentaram perfil de dano no DNA semelhante, sendo as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  estatisticamente significativas.

Também utilizando tratamentos de 24 horas com mitomicina C e cisplatina, analisamos o perfil de ciclo celular das três linhagens utilizadas nesse trabalho. As linhagens deficientes nas proteínas de AF, *FANCA* e *FANCC*, quando tratadas com agentes indutores de ICL apresentaram perfil de ciclo celular semelhante às células não tratadas (controle negativo). Isso sugere uma possível falta de controle da progressão de ciclo celular após a indução de danos no DNA. A linhagem selvagem apresentou aumento da população em S, após tratamento com CIS, e em G2 após tratamento com MMC, quando comparadas com as células não tratadas (controle negativo), indicando que após estes tratamentos há uma parada do ciclo celular a fim de reparar os danos no DNA induzidos por esses agentes genotóxicos.

Utilizando a linhagem deficiente em *FANCA* e WT, nós analisamos a atividade de catalase após tratamento com cisplatina por 24 horas. A linhagem *FANCA* apresentou decréscimo na atividade de catalase, quando comparada a linhagem WT.

Avaliamos também a produção de ROS e a polarização de membrana mitocondrial através de citometria de fluxo. Nos dois ensaios tratamos as linhagens por 24 horas com

cisplatina. Após o tratamento, foi observado um incremento na formação de ROS e despolarização da membrana mitocondrial na linhagem deficiente *FANCA*, quando comparada a linhagem *WT*.

O desequilíbrio causado entre ROS e o sistema antioxidante, é associado com o estado redox da AF. A hipersensibilidade encontrada nas células da AF é descrita em diversos estudos que utilizaram culturas de células primárias imortalizadas. Enquanto que modelos animais de AF não são capazes de mimetizar algumas das principais manifestações clínicas da doença, como a falha da medula óssea e leucemia. Porém, assim como em linfoblastos humanos, ensaios utilizando modelos animais também demonstraram diminuição da proliferação celular ou sobrevivência (DIEMEIER *et al.*, 2002; SHYAMSUNDER *et al.*, 2015).

Apesar dos muitos estudos, os mecanismos que levam à doença e os diferentes fenótipos que ela apresenta ainda não são bem esclarecidos. A interação entre as proteínas da via de AF, as vias de reparo de danos no DNA e a função mitocondrial dessas células pode ser o fator chave. A disfunção mitocondrial presente na AF é pouco conhecida, mas é um importante sinal quando analisado o excesso de ROS e a baixa atividade antioxidante presente nas linhagens de AF (CUCCAROLO *et al.*, 2012; D'ANDREA & GROMPE, 2003; SHYAMSUNDER *et al.*, 2015). Portanto, as alterações nas mitocôndrias de células de AF podem ser uma pista para a sensibilidade dessas células a agentes oxidantes. Estudos já demonstraram o envolvimento das proteínas da via de AF na funcionalidade de enzimas antioxidantes com superóxido dismutase e catalase (CUCCAROLO *et al.*, 2012; D'ANDREA & GROMPE, 2003; DONG *et al.*, 2015).

Nós acreditamos que uma alternativa viável para controlar a disfunção mitocondrial pode ser a utilização de moléculas capazes de neutralizar ROS e que sejam degradadas especificamente nas mitocôndrias, porém essa é uma estratégia desafiadora. Ainda há escassez de trabalhos que abordem, detalhadamente, os mecanismos envolvidos na disfunção mitocondrial e a apoptose, estudos com esse enfoque podem auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta doença.

## **Perspectivas**

- Avaliar a expressão de proteínas da via de Fanconi e de possíveis parceiras moleculares, envolvidas na sinalização celular e em vias de reparo de DNA, nestas linhagens de linfoblastos deficientes nas proteínas FANCA e FANCC.
- Analisar a co-localização das proteínas de Fanconi com proteínas parceiras nas diferentes etapas de resposta a danos do tipo ICL em célula selvagem, proficiente em todas as proteínas da via de Fanconi.
- Determinar os mecanismos de disfunção mitocondrial e de morte celular após o tratamento com agentes indutores de ICL nas células deficientes em proteínas da via de Fanconi.
- Quantificar a atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase nestas linhagens de linfoblastos deficientes nas proteínas FANCA e FANCC.
- Quantificar marcadores de função mitocondrial nestas linhagens de linfoblastos deficientes nas proteínas FANCA e FANCC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelfalk C, Lorenz M, Serra V, von Zglinicki T, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Accelerated telomere shortening in Fanconi anemia fibroblasts - a longitudinal study. *FEBS Lett.* 2001 Sep 28;506(1):22-6.

Ameziane N, May P, Haitjema A, et al. A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nature Comm* 2015, 6:8829.

Auerbach A. *Current Protocols in Human Genetics*. Curr Protoc Hum Genetics Editor Board Jonathan L Haines Et Al. Wiley; 2015. p. 8.7.1–8.7.17.

Auerbach AD. A test for Fanconi's anemia. *Blood.* 1988 Jul;72(1):366-7.

Auerbach, A.D. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis (2015). *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 85:8.7.1–8.7.17

Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids.* 2010, 20-10

Bogliolo M, Borghini S, Abbondandolo A, Degan P. Alternative metabolic pathways for energy supply and resistance to apoptosis in Fanconi anaemia. *Mutagenesis* 2002, 17(1):25-30.

Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet.* 2013 May 4;92(5):800–6.

Bogliolo, M., Borghini, S., Abbondandolo, A., Degan, P. Alternative metabolic pathways for energy supply and resistance to apoptosis in Fanconi anaemia(2002). *Mutagenesis* 17(1):25-30.

Bogliolo, M., LykhJovich, A., Calle, E., Castella, M., Cappelli, E., Ramirez, M., Surralles, J. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability (2007). *EMBO J* 26 (5): 1340-1351.

Boisvert RA, Howlett NG. The Fanconi anemia ID2 complex: dueling saxes at the crossroads. *Cell Cycle* 2014 ;13:2999–3015.

Caldecott K. Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays*. 2001; 23 (5): 447–55.

Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Review Genetics*. 2008 (9): 619 – 31.

Capanni C, Bruschi M, Columbaro M, Cuccarolo P, Ravera S et al. Changes in vimentin, lamin A/C and mitofilin induce aberrant cell organization in fibroblasts from Fanconi anemia complementation group A (FA-A) patients. *Biochimie*. 95: 1838–47.

Cappelli, E., Ravera, S., Vaccaro, D., Cuccarolo, P., Bartolucci, M., Panfoli, I., Dufour, C. & Degan, P. (2013). Mitochondrial respiratory complex I defects in Fanconi anemia. *Trends Mol. Med.*, 19, 13–514.

Carrillo JA, Munoz CA. alternative chemotherapeutic agents: nitrosoureas, cisplatin, irinotecan. *Neurosurgery Clinics of North American* 2012, 23: 297-306.

Casado, J.A., Callén, E., Jacome, A. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network (2007). *J. f Medical Genetics*. 2007;44(4):241-249. doi:10.1136/jmg.2006.044719.

Castella M, Pujol R, Calle'n E, Trujillo JP, Casado JA et al. (2011) Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood*. 117: 3759–69.

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

Charton R, Guintini L, Peyresaubes F, Conconi A. Repair of UV induced DNA lesions in ribosomal gene chromatin and the role of “Odd” RNA polymerases (I and III). *DNA Repair (Amst)*. 2015 Dec 2; 36:49–58.

Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003, 193, 3-34.

Chu PC, Wang TY, Lu YT, Chou CK, Yang YC, Chang MS. Involvement of p29 in DNA damage responses and Fanconi anemia pathway. *Carcinogenesis*. 2009 Oct;30(10):1710-6.

Churchill CD, Eriksson LA, Wetmore SD. DNA Distortion Caused by Uracil-Containing Intrastrand Cross-Links. *J Phys Chem B*. 2016

Ciccia A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR, Laghmani EH, Joenje H, McDonald N, Winter JP, Wang W, West SC. Identification of FAAP24, a Fanconi Anemia Core Complex Protein that Interacts with FANCM. *Molecular Cell* 2007, 25 (9): 331–343.

Constantinou A. Rescue of replication failure by Fanconi anaemia proteins. *Chromosoma* 2012, 121:21–36.

Costes A, Lambert SA. Homologous recombination as a replication fork escort: fork-protection and recovery. *Biomolecules* 2012 Jan;3(1):39–71.

Crossan G, Patel K. The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. *Journal Pathology*. Wiley; 2012;226(2):326–37.

Cuccarolo, P., Viaggi, S., Degan, P. New insights into redox response modulation in Fanconi's anemia cells by hydrogen peroxide and glutathione depletors (2012) *FEBS J*. 279: 2479–2494.

Cybulski KE, Howlet NG. FANCP/SLX4: A Swiss army knife of DNA interstrand crosslink repair *Cell Cycle* 2011, 10(11): 1757-1763.

D'andrea AD, Grompe M. The Fanconi anemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 2003, 3: 23-24.

Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal Pharmacology* 2014, 740:364–78.

Deakne, J., Mazin, A. Fanconi anemia: at the Crossroads of DNA repair. *Biochem Mosc*. 2011;76 (1):36–48.

Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Meth*. 1986 89 271–277.

Dirmeier R, O'Brien KM, Engle M, Dodd A, Spears E, Poyton RO. Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress. Implications for the induction of hypoxic genes. *J Biol Chem* 2002; 277: 34773–34784

Domchek SM, Tang J, Stopfer J. *et al.* Biallelic Deleterious BRCA1 Mutations in a Woman with Early-Onset Ovarian Cancer. *Cancer Discov* 2013, 3(4): 399–405.

Dong, H., Nebert, D., Bruford, E., Thompson, D., Joenje, H., Vasiliou, V (2015). Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum. Gen.* 9 (1):32.

Dudás A, Chovanec M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutation Research* 2004 (566) 131-167.

EI-Khamisy SF, Caldecott KW. DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Neuroscience* 2007,145(4):1260–6.

Essen LO, Klar T. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and Molecular of Life Sciences* 2006, 63: 1266-77.

Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Review Cancer* 2012, 12: 104-20.

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of the cisplatin resistance. *Oncogene* 2012, 31: 1869-83.

Gambino G, Tancredi M, Falaschi E, Aretini P, Caligo MA. Characterization of three alternative transcripts of the BRCA1 gene in patients with breast cancer and a family history of breast and/or ovarian cancer who tested negative for pathogenic mutations. *Int. J. Mol. Med.* 2015 ;35:950–6.

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn Ms, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'andrea Ad. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in common pathway. *Mol Cell*, v.7, p.249-262, 2001.

Gari K, Constantinou A. The role of the Fanconi anemia network in the response to DNA replication stress. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2009.

German J, Schonberg S, Caskie S, Warburton D, Falk C, Ray JH. A test for Fanconi's anemia. *Blood*. 1987 Jun;69(6):1637-41.

Guidugli L, Carreira A, Caputo S, Ehlen A, Galli A, Monteiro ANA, Neuhausen SL, Hansen TVO, Couch FJ, Vreeswijk MPK. Functional assays for analysis of variants of uncertain significance in BRCA2. *Hum Mutat* 2014, 35 (2):151-164.

Hakem R. DNA damage repair: the good, the bad and the ugly. *EMBO Journal* 2008, 27:589-605.

Hashimoto K, Wada K, Matsumoto K, Moriya M. Physical interaction between SLX4 (FANCP) and XPF (FANCD1) proteins and biological consequences of interaction-defective missense mutations. *DNA Repair* 2015, 35: 48–54

Hashimoto Y, Chaudhuri AR, Lopes M, Costanzo V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 2010, 17:1305–1311.

Hill, S.J., Rolland, T., Adelmant, G. Systematic screening reveals a role for BRCA1 in the response to transcription-associated DNA damage (2014). *Genes Devl.* 28:1957–1975.

Hira A, Yoshida K, Sato K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K. *et al.* Mutations in the Gene Encoding the E2 Conjugating Enzyme UBE2T Cause Fanconi Anemia. *Am J Hum Gen* 2015, 96(4): 1001–1007.

Hodson C, Cole A, Lewis L, Miles J, Purkiss A, Walden H. Structural Analysis of Human FANCL, the E3 Ligase in the Fanconi Anemia Pathway. *J Biol Chem.* *highwire* 2011;286(37):32628–37.

Hodson C, Purkiss A, Miles JA, Walden H. Structure of the Human FANCL RING-Ube2T Complex Reveals Determinants of Cognate E3-E2 Selection. *Structure* 2014, 22 (2): 337–344.

Hoeijmakers JHJ. DNA repair mechanisms. *Maturitas.* 2001 38: 17-23

Howlett NG, Taniguchi T, Durkin SG *et al.* The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum Mol Genet.* 2005 Mar 1;14(5):693-701.

Huang Y, Leung JWC, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huong D, Takata M, Chen J, Li L. Modularized Functions of the Fanconi Anemia Core Complex. *Cell Reports* 2014, 7(6): 1849-1857.

Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, Davies A, Masson JY, Moses R, West SC, de Winter JP, Ashworth A, Jones NJ, Mathew CG. Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum Mol Genet.* 2004 Jun 15;13(12):1241-8.

Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002, 23: 687-96.

Jacquemont C, Taniguchi T. The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochemistry* 2007, 8 (Suppl 1):S10.

Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of fanconi anaemia. *Nature Rev Genet* 2001, 2: 446–459.

Johannessen TC, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2012, 12: 635-42.

Joo W, Xu G, Persky NS, Smogorzewska A, Rudge D, Buzovetsky O, Elledge SJ, Pavletich NP. Structure of the FANCI-FANCD2 Complex: Insights into the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway. *Science* 2011, 15;333(6040): 312–316.

Kagawa W, Arai N, Ichikawa Y, et al. Functional analyses of the C-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:941–51.

Kaina B, Christmann M, Naumann S, Ross WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* 2007, 6: 1079-99.

Kalb R, Neveling K, Hoehn H, et al. Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *Am J Hum Genet.* 2007 May; 80(5): 895-910.

Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz PT, et al. Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, Xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. *Am J Hum Genet* 2013, 92:807–819.

Kass E, Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *Febs Lett.* 2010;584(17):3703–8.

Kawaii H, Toyohara J, Kado H, Nakagawa T, Takamatsu S, Furukawa T, Yonekura Y, Kubota T, Fujibayashi Y. Acquisition of resistance to antitumor alkylating agent ACNU: a possible target of positron emission tomography monitoring. *Nuclear Medicine and Biology* 2006, 33: 29-35.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Review Cancer* 2007, 7: 573-84

Kelsall IR, Langenick J, MacKay J, Patel KJ, Alpi AF. The Fanconi Anaemia Components UBE2T and FANCM Are Functionally Linked to Nucleotide Excision Repair. *7 (5): 1-10, 2012.*

Kennedy RD, D'Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev.* 2005 Dec 15;19(24):2925-40.

Kim H, D'Andrea AD. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev.* 2012 Jul 1;26(13):1393-408.

Kim Y, Spitz GS, Veturi U, Lach FP, Auerbach AD, Smogorzewska A. Regulation of multiple DNA repair pathways by the Fanconi anemia protein SLX4. *Blood* 2013, 3;121(1): 54–63.

Kim Y. Nuclease Delivery: Versatile Functions of SLX4/FANCP in Genome Maintenance. *Mol Cells* 2014; 37(8): 569-574.

Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature.* 2013 Jan 17;493(7432):356-63.

Krogh BO, Symington LS. Recombination proteins in yeast. *Annual Review Genetics* 2004, 38: 233-71.

Kumari U, Ya W, Jun B, Huat B, Lyakhovich A. Evidence of mitochondrial dysfunction and impaired ROS detoxifying machinery in Fanconi Anemia cells. *Oncogene* (2012), 1–8.

Kutler D, Auerbach A. Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. *Fam Cancer*. 2004;3(3-4):241–8.

Lee KY1, Chung KY, Koo HS. The involvement of FANCM, FANCI, and checkpoint proteins in the interstrand DNA crosslink repair pathway is conserved in *C. elegans*. *DNA Repair (Amst)*. 2010 Apr 4;9(4):374-82.

Letwin K, Mizzen L, Motro B, Ben-David Y, Bernstein A, Pawson T. A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J*. 1992 Oct; 11(10): 3521-31.

Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp Bc, Vries Y, Hussain S, Wiegant Ww, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans Ma, Pals G, Arwert F, Mathew Cg, Zdzienicka Mz, Hiom K, De Winter Jp, Joenje H. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 2005, 37 (9) 934-935.

Levrán O, Diotti R, Pujara K, Batish SD, Hanenberg H, Auerbach AD. Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Human Mutat*, v.25, n.142-149, 2005.

Li Y, Zhao L, Sun H, Yu J, Li N, Liang J, et al. Gene silencing of FANCF potentiates the sensitivity to mitoxantrone through activation of JNK and p38 signal pathways in breast cancer cells. *PLoS One* 2012.

Liu T, Ghosal G, Yuan J, Chen J, Huang J. FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science*. 2010 Aug 5;329(5992):693–6.

Lomonosov M, Anand S, Sangrithi M, Davies R, Venkitaraman AR. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Development* 2003, 17: 3017-22.

Longerich S, Kwon Y, Tsai M-SS, Hlaing AS, Kupfer GM, Sung P. Regulation of FANCD2 and FANCI monoubiquitination by their interaction and by DNA. *Nucleic Acids Res*. 2014 ;42:5657–70.

Luke-Glaser S1, Luke B, Grossi S, Constantinou A. FANCM regulates DNA chain elongation and is stabilized by S-phase checkpoint signalling. *EMBO J*. 2010 Feb 17;29(4):795-805.

Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman AS, et al. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 6;33 (12):3799–811.

Lyakhovich A, Callén E, Castellà M, Cappelli E, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Kalb R, Neveling K, Schindler D, Surrallés J. et al. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J.* 2007 26, 1340–1351.

Mahjoub MR, Trapp ML, Quarmby LM. NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes. *J Am Soc Nephrol.* 2005 16(12):3485-9.

Marriage, B. J., Clandinin, M. T., Macdonald, I. M. & Glerum, D. M. (2004). Cofactor treatment improves ATP synthetic capacity in patients with oxidative phosphorylation disorders. *Mol. Genet. Metab.*, 81, 263–272.

McCabe KM, Olson SB, Moses RE. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells. *Journal Cellular Physiology* 2009, 220: 569-73.

McCauley J, Masand N, McGowan R, Rajagopalan S, Hunter A, et al. 2011. X-linked VACTERL with hydrocephalus syndrome: further delineation of the phenotype caused by FANCB mutations. *Am. J. Med. Genet. A* 155:2370–80

Meetei AR, De Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, Van De Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi Anemia. *Nat Genet*, 2003, 35 (2): 165-170. .

Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature Gen* 2010, 42 (5) 410-415.

Memisoglu A, Samsun L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutation Research* 2000, 451: 39-51.

Milne GT, Shannon KB, Weaver ST. Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 1996, 16: 4189-98.

Mohseni-Meybodi A, Mozdarani H, Mozdaran S. DNA damage and repair of leukocytes from Fanconi anaemia patients, carriers and healthy individuals as measured by the alkaline comet assay(2009). *Mutagenesis*, 24(1 ) 67–73.

Moldovan GL, D'Andrea LD. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annu. Rev. Genet.* 2009. 43:223–49.

Moraes MC, Neto JB, Menk CF. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* 2012, 17: 1362-88.

Moreira, C.F.A., Brito Júnior, L.C., Lemos, J.A.R. Flow cytometry for diepoxybutane test analysis (2008). *Gen. Mol. Res* 7 (4): 1353-1359.

Muniandy PA, Liu J, Majumbar A, Liu ST, Seidman MM. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Critical Review Biochemistry and Molecular Biology* 2010, 45: 23-49.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, 417, 1– 13.

Nalepa, G., Clapp, D.W. Fanconi anemia and the cell cycle: new perspectives on aneuploidy (2014). *F1000Prime Rep.* 2014, 6:23; 1-10

Nijman SBM, Huang TT, Dirac AMG, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea ADD, Bernards R. The Deubiquitinating Enzyme USP1 Regulates the Fanconi Anemia Pathway. *Molecular Cell* 2005, 17 (3):331–339.

Nordenson, I. Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia (1977). *Hereditas* 86:147-150.

Pace P, Johnson M, Tan WM, Mosedale G, Sng C, Hoatlin M, De Winter J, Joenje H, Gergely F, Patel KJ. FANCE: the link between Fanconi anemia complex assembly and activity. *EMBO J* 2002, 21(13) 3414-3423.

Pagano, G., Degan, P., d' Ischia, M., Kelly, F. J., Nobili, B., Pallardó, F. V., Youssoufian, H. & Zatterale, A. (2005). Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur. J. Haematol.*, 75, 93– 100.

Pagano, G., Talamanca, A. A., Castello, G., Cordero, M. D., d'Ischia, M., Gadaleta, M. N., Pallardó, F. V., Petrović, S., Tiano, L. & Zatterale, A. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction across broadranging pathologies: toward mitochondria-targeted clinical strategies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 541230.

Pagano, G., Talamanca, A. A., Castello, G., Pallardó, F. V., Zatterale, A. & Degan, P. (2012). Oxidative stress in Fanconi anaemia: from cells and molecules towards prospects in clinical management. *Biol. Chem.*, 393, 11–21.

Pichierri P et al. DNA crosslink-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. In: Andrew PE. Two worlds collide: the integration of DNA repair pathways. *Clin Genet* 2003; 63: 102–104.

Rastogi RP, Richa T, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. Molecular mechanisms of ultravioleta radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids* 2010, 59: 29-80.

Ravera S, Vaccaro D, Cuccarolo P, Columbaro M, Capanni C et al. (2013). Mitochondrial respiratory chain Complex I defects in Fanconi anemia complementation group A. *Biochimie* 95: 1828–1837.

Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, Wurm M, Batish SD, Lach FP, Yetgin S, Neitzel H, Ariffin H, Tischkowitz M, Mathew CG, D'auebach A, Rahman N. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Gen* 2007, 39 (2):162-194.

Richter C, Kass GE. Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. *Chem Biol Interact* 1991; 77: 1–23.

Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: base excision repair the long and short of it. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009, 55: 981-93.

Rocco D, Bottega R, Cappelli E, Cavani S, Criscuolo M, Nicchia E, et al. Molecular analysis of Fanconi anemia: the experience of the Bone Marrow Failure Study Group of the Italian Association of Pediatric Onco-Hematology. *Haematologica*. highwire; 2014;99(6):1022–31.

Rohleder F, Huang J, Xue Y, Kuper J, Round A, Seidman M, Wang W, Kisker C. FANCM interacts with PCNA to promote replication traverse of DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Ac Res* 2016, 20; 44(7): 3219–3232.

Rosselli F, Briot D, Pichiéri P. The Fanconi anemia pathway and the DNA interstrand crosslinks repair. *Biochimie* 2003, 85: 1175-1184.

Rouillon C, White MF. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Research in Microbiology* 2011, 162: 19-26.

Saar K, Schindler D, Wegner Rd, Reis A, Wienker Tf, Hoehn H, Joenje H, Sperling K, Digweed M. Localization of Fanconi anaemia gene to chromosome 9p. *Eur J Hum Genet*, v.6, n.5, p.501-508, 1998.

Sawyer, S.L., Tian, L., Kähkönen, M., Schwartzentruber, J. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype (2015). *Cancer Disc*.

Schärer OD. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *Chembiochem* 2005 6: 27-32.

Schwab RA, Nieminuszczy J, Shah F, Langton J, Martinez DL, Liang CC, Cohn MA, Gibbons RJ, Deans AJ, Niedzwiedz W. The Fanconi Anemia Pathway Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription. *Mol Cell* 2015, 60 (3) 351-261.

Shakya R, Reid LJ, Reczek CR, Cole F, Egli D, Lin CS, et al. BRCA1 Tumor Suppression Depends on BRCT Phosphoprotein Binding, But Not Its E3 Ligase Activity. *Science* 2011, 28;334(6055): 525–528.

Shyamsunder P, Verma RS, Mukhopadhyay SS, Lyakhovic L. Involvement of mitochondria in the pathology of Fanconi anemia. (1): 1-24, 2015.

Smith AR, Wagner JE. Current clinical management of Fanconi anemia. *Expert Rev Hematol*. 2012 Oct 1;5(5):513–22.

Smogorzewska A, Desetty R, Saito T, Schlabach M, Lach F, Sowa M, et al. A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair. *Molecular Cell*. 2010: 36–47.

Solomon PJ, Margaret P, Rajendran R, Ramalingam R, Menezes GA, Shirley AS, Lee SJ, Seong MW, Park SS, Seol D, Seo SH. A case report and literature review of Fanconi Anemia (FA) diagnosed by genetic testing. *Italian J Pediat* 2015, 41:38

Tell G, Wilson DM. Targeting DNA repair proteins for cancer treatment. *Cellular and Molecular of Life Sciences* 2010, 67: 3569-72.

Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'andrea AD, Moses R, Grompe M. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell*, v.7, p.241-248, 2001.

Tischkowitz M, Xia B. PALB2/FANCN - recombining cancer and Fanconi anemia *Cancer Res* 2010, 1;70(19): 7353–7359.

Vermeulen W. Dynamics of mammalian NER proteins. *DNA Repair (Amst)* 2011, 10: 760-71.

Wagner Je, Tolar J, Levran O, Scholl T, Deffenbaugh A, Satagopan J, Ben-Porat L, Mah K, Batish Sd, Kutler Di, Macmillan MI, Hanenberg H, Auerbach AD. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood*, v.103, n.8, p.3226-3229, 2004.

Waisfisz Q, Saar K, Morgan NV, Altay C, Leegwater PA, De Winter JP, Komatsu K, Evans GR, Wegner, RD, Reis A, Joenje H, Arwert F, Mathew CG, Pronk JC, Digweed M. The Fanconi anemia group E gene FANCE, maps to chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1999, 64(5) 1400-1405.

Walden H, Deans A. The Fanconi Anemia DNA Repair Pathway: Structural and Functional Insights into a Complex Disorder. *Ann Rev Biophys*. annual; 2014;43(1):257–78.

Wang XZ, D'Andrea AD. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair* 2004, 3 1063–1069.

Wen M, Kwon Y, Wang Y, Mao JH, Wei G. Elevated expression of UBE2T exhibits oncogenic properties in human prostate cancer. *Oncotarget* 2015, 6 (28): 25226- 25239.

Whitney Ma, Saito H, Jakobs Pm, Gibson Ra, Moses Re, Grompe M. A common mutation in the FANCC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nature Genetics* 1993, 4(2) 202-205.

Wilson JB, Blomb E, Cunninghama R, Xiaoa Y, Kupferc GM, Jonesa NJ. Several tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of FANCG are required for assembly of the BRCA2/D1-D2-G-X3 complex, FANCD2 monoubiquitylation and phleomycin resistance. *Mutation Research* 2010, 689 12–20.

Yan Z, Delannoy M, Ling C, Dae D, Osman F, Muniandy PA, Shen X, Oostra AB, Du H, Steltenpool J. A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Mol Cell* 2010, 37:865–878.

Yuan F, El Hokayem J, Zhou W, Zhang Y. FANCI protein binds to DNA and interacts with FANCD2 to recognize branched structures. *J Biol Chem* 2009, 284:24443–24452.

Zanier, R., Briot, D., du Villard, J.A., Sarasin, A., Rosselli, F. Fanconi anemia C gene product regulates expression of genes involved in differentiation and inflammation (2004). *Oncogene*, 24;23(29):5004-13.

Zhao L, Li N, Yu JK, Tang HT, Li L, He M, Yu ZJ, Bai XF, Zheng ZH, Wang EH, Wei MJ. RNAi-mediated knockdown of FANCF suppresses cell proliferation, migration, invasion, and drug resistance potential of breast cancer cells. *Brazilian J Med Biol Res* 2014, 47(1): 24-34.