

Marília Borges Moreira

Aspectos clínicos e citogenéticos da síndrome de Bloom

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de Pediatria
Orientador: Prof^ª. Dra. Chong Ae Kim

São Paulo

2012

Marília Borges Moreira

Aspectos clínicos e citogenéticos da Síndrome de Bloom

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de Pediatria
Orientador: Prof^ª. Dra. Chong Ae Kim

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Marília Borges

Aspectos clínicos e citogenéticos da Síndrome de Bloom / Marília Borges

Moreira. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Síndrome de Bloom 2.Instabilidade cromossômica 3.Troca de cromátide irmã 4.Tumor de Wilms

USP/FM/DBD-070/12

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre lutaram comigo e me criaram de uma forma mais que especial, e ao meu noivo que me apóia incondicionalmente... “Sempre juntos. Simples assim!”

Agradeço

Meus pais...

Áurea e Andriw, por sempre me apoiarem e darem a maior força para que eu corresse atrás de todo tipo de sonho. Independente dos meus erros ou acertos sempre acreditaram na minha capacidade, até mesmo quando eu duvidava. Amo vocês!

Meu noivo...

Alexandre (Vivi), por me apoiar demais em tudo, por me mandar tantas energias positivas, por dizer todos os dias que não estou sozinha, por ser meu porto seguro, meu amigo, meu amor, minha vidinha. Obrigada por investir em mim, amo você!

Meus familiares...

Todos! Especialmente minha Madrinha Ilanil, por tanto amor, ensinamentos, momentos de risadas e por pegar freqüentemente no meu pé para que eu invista sempre mais nos meus estudos - “Tu tens que ralar Guria”!

Minhas Avós...

Hylanou e Cyrene, por rezarem todos os dias para que tudo na minha vida dê certo!

À família Cabral Montenegro...

Malú, Rogério (in memorian), Edu e Jô por torcerem pela minha carreira de pesquisadora, por proporcionarem momentos de estudo, por ótimos momentos juntos, por me acolherem com muito amor e carinho desde a primeira vez.

Meus *amigos* por entenderem tantos momentos perdidos por conta dos estudos, e por estarem disponíveis quando eu também estou.

Minha Orientadora...

Dra. Chong Ae Kim, por ter me acolhido há 10 anos com tanta confiança, por ter me ensinado muitas lições de vida, por fazer da equipe de genética uma enorme família que às vezes discorda, mas se entende, que se gosta e que sempre está disposta a ajudar (quem não tem bom coração não consegue ficar na genética) e por ter dado tantas “tarefinhas” que me ajudaram a crescer em todos os aspectos da minha vida. Obrigada por ter esse coração tão grande!

À grande amiga e “co-orientadora laboratorial”...

Dra. Leslie Domenici kulikowski, por chegar de mansinho e se tornar uma enorme professora e amiga. Por se esforçar tanto para fazer nosso grupo crescer, por me fazer amar a pesquisa ainda mais, por sempre nos puxar para cima, por sempre ter uma palavra de carinho e “ouvidos” maravilhosos. Obrigada por nunca desistir.

Os queridos amigos médicos da equipe de genética...

Guilherme, Mariana e Caio, por avaliarem os pacientes deste estudo, pelos desabaços, pelos trabalhos tão produtivos e pelas risadas. Obrigada por sempre estarem disponíveis para me ajudar com qualquer coisa. Agradeço também toda a equipe.

Os queridos amigos citogenômicos...

Aline, Evelin, Roberta, Flávia, Alê, Gil, Mariana, Carol e Amon, por se tornarem uma extensão da minha família. Cada um, a sua maneira, me ajuda demais e juntos tornam meu dia mais feliz e muitas vezes engraçado. Obrigada pelas experiências trocadas, pelas grandes contribuições com este trabalho e também pelas incansáveis horas de “brain storm”.

À *Dra. Cristina Jacob*, por ser tão carinhosa e ensinar a todos seus alunos a prática da humanização, por compartilhar suas lições de vida e por ser tão acessível.

O *Prof. Carlos Alberto Moreira Filho*, por gentilmente ceder um lugar para nossos estudos.

À *Fernanda*, técnica do laboratório LIM 36 pelos grandes momentos de alegria, por ser sempre extremamente prestativa e por sua amizade. Agradeço também, a toda equipe do LIM 36.

À *Dra. Sylvie Antonini*, pela imensa colaboração para minha entrada no mestrado, pelos conselhos e por ter um coração enorme.

Ao *Dr. Juan Llerena* e sua equipe *Vera, Lucia, Ana, Mi e Thiago* por serem extremamente prestativos, por me acolherem e me ensinarem seus conhecimentos. Todos foram fundamentais para a confecção deste trabalho.

A *todos os pacientes e seus familiares* que lutam incansavelmente contra o tempo e tentam viver da melhor forma possível.

E por fim, agradeço à *vida* por ser tão generosa comigo!

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

(Martin Luther King)

Normatização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Bibliotecas e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Aspectos clínicos.....	19
1.2 Diagnóstico clínico.....	21
1.3 Aspectos citogenéticos da SB.....	22
1.3.1 Instabilidade genômica e integridade celular.....	22
1.3.2 Instabilidade cromossômica e a SB.....	24
1.3.2.1 Quebras cromossômicas e cromatídicas.....	24
1.3.2.2 Configuração quadrirradial.....	26
1.3.2.3 Trocas entre cromátides irmãs.....	26
1.4 Aspectos moleculares.....	29
1.4.1 A síndrome de Bloom e o gene BLM.....	29
1.5 Herança.....	32
1.6 Manejo Clínico.....	33
1.7 Diagnóstico diferencial.....	33
1.7.1 Anemia de Fanconi (AF).....	34
1.7.2 Síndrome de Rothmund-Thomson (SRT – MIM 268400).....	35
1.7.3 Ataxia Telangiectasia (AT – MIM 208900).....	35
1.7.4 Síndrome de Nijmegen Breakage (SNB – MIM 251260).....	36

1.7.5 Xeroderma Pigmentoso (XP).....	37
1.7.6 Síndrome de Werner (SW – MIM277700).....	37
2 OBJETIVOS.....	40
3 METODOLOGIA.....	42
3.1 Casuística.....	42
3.2. Análise do quadro clínico.....	42
3.3 Estudo citogenético.....	43
3.3.1 Cultura linfocitária com BrdU.....	43
3.3.1.1 Coloração diferencial de cromátides irmãs.....	44
3.3.1.1.1 Análise cromossômica sob coloração diferencial de cromátides irmãs.....	44
3.3.2 Cultura de linfócitos isenta de BrdU.....	45
3.3.2.1 Coloração.....	45
3.3.2.1.1 Coloração convencional.....	45
3.3.2.1.2 Coloração por bandamento G.....	46
3.3.2.1.3 Análise cromossômica sob coloração convencional e bandamento G.....	46
4. Resultados e Discussão.....	48
4.1 Estudo clínico.....	48
4.1.1 Dados do nascimento.....	48
4.1.2 Quadro clínico dos pacientes estudados.....	49
4.1.3 Desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM).....	53
4.1.4 Evolução clínica.....	53
4.2 Estudo citogenético.....	55
4.3 Herança.....	62
5 CONCLUSÕES.....	64
6 ANEXOS.....	66
7 REFERÊNCIAS.....	87

Lista de Figuras

- Figura 1** – Sistema de reparo de lesões causadas por quebras na dupla-fita de DNA. Os principais mecanismos são: (A) reparo por recombinação não homóloga (NHEJ) e (B) reparo por recombinação homóloga (RH) (Payne e Hickson, 2008)..... 23
- Figura 2** – Alterações cromossômicas observadas como resultado de instabilidade em células de portadores da SB: (A) quebra cromossômica; (B) quebra cromatídica; (C) fragmentos cromossômicos; (D) cromossomo dicêntrico; (E) rearranjo; (F) falha cromossômica; (G) falha cromatídica; (H) configuração quadrirradial e (I) troca entre cromátides irmãs 24
- Figura 3** – Esquema do reparo por recombinação homóloga de uma forquilha de replicação em colapso. (a) Forquilha de replicação extremidade livre. (b), (c) e (d) Invasão a extremidade homóloga e replicação re-estabelecida. (e) (f) Crossing over. As setas laranja indicam os sentidos de síntese de DNA; as linhas pretas designam a fita DNA molde e as linhas em laranja mostram o DNA recém-sintetizado; os parênteses designam o não cruzamento e as setas cheias indicam o crossing over (Helleday, 2003)..... 27
- Figura 4** – Metáfase proveniente de cultura linfocitária, sob coloração diferencial de cromátides irmãs, observada ao microscópio óptico. As cromátides de cor preta são as sofreram incorporação do BrdU. As setas indicam exemplos de TCI: (A) controle normal, apresentando poucas TCIs e (B) controle positivo para a SB, apresentando frequência aumentada de TCIs..... 27
- Figura 5** – Diagrama demonstrativo da incorporação do agente BrdU ao DNA celular por dois ciclos celulares (German e Alhadef, 2001)..... 28
- Figura 6** – Família RecQ helicase. Diagrama esquemático de RecQ helicases de diversas espécies. Os domínios conservados estão alinhados em um código de cores, como indicado na parte inferior da figura. O tamanho em aminoácidos da proteína de cada espécie está indicado à direita. O nome das proteínas e das espécies de origem está indicado à esquerda. As cinco RecQ helicases humanas são indicadas pela caixa vermelha. (Singh et al., 2009) 30

Figura 7 – Diagrama esquemático indicando a rede de possíveis interações entre a BLM e proteínas nucleares específicas. Interações diretas entre duas proteínas são indicadas por setas pretas duplas, enquanto que, possíveis interações são demonstradas pelas setas vermelhas tracejadas (Liu e West, 2008)	31
Figura 8 – Foto do paciente 4 aos 11 anos de idade e uma foto sua demonstrando agenesia unilateral de fíbula, encurtamento de tíbia e agenesia de 5° artelho.	50
Figura 9 – Fotos das pacientes 7 e 1 aos 2 anos e 20 anos, respectivamente.....	53
Figura 10 – Exemplo de análise convencional do paciente 2. (A) Quebra cromatídica e (B) Cromossomo dicêntrico	57
Figura 11 – Exemplo de coloração diferencial de cromátides irmãs do paciente 2. A figura demonstra frequência aumentada para a análise de trocas entre cromátides irmãs.....	58
Figura 12 – Exemplo de análise convencional do paciente 3. (A) Quebra cromossômica e (B) Quebra cromatídica.....	58
Figura 13 – Exemplo de coloração diferencial de cromátides irmãs do paciente 3. A figura demonstra frequência aumentada para a análise de trocas entre cromátides irmãs.....	59
Figura 14 – Exemplo de análise convencional do paciente 9. (A) Quebra cromossômica e (B) Quebra cromatídica.....	59
Figura 15 – Exemplo de coloração diferencial de cromátides irmãs do paciente 9. A figura demonstra frequência aumentada para a análise de trocas entre cromátides irmãs.....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Dados ao nascimento dos nove pacientes estudados.....	50
Tabela 2 – Principais alterações clínicas observadas nos nove pacientes estudados.....	52
Tabela 3 – Infecções de repetição observadas nos nove pacientes estudados.....	53
Tabela 4 – Deficiência de imunoglobulinas plasmáticas observadas nos nove pacientes.....	53
Tabela 5 – Evolução clínica dos nove pacientes estudados.....	56
Tabela 6 – Estudo citogenético do grupo controle.....	57
Tabela 7 – Estudo citogenético de seis pacientes investigados pelo laboratório Fleury.....	57
Tabela 8 – Estudo citogenético em três pacientes investigados para síndrome de Bloom no LIM36.....	58

Resumo e Abstract

Resumo

Moreira MB. *Aspectos Clínicos e citogenéticos da Síndrome de Bloom* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: A síndrome de Bloom (SB) é uma síndrome de instabilidade cromossômica rara, transmitida por herança autossômica recessiva. Caracteriza-se por deficiência de crescimento pré e pós-natal, microcefalia, hipoplasia malar, eritema telangiectásico em face e comprometimento do sistema imunológico. Os pacientes com SB apresentam predisposição aumentada para o desenvolvimento de neoplasias em idade precoce, sendo esta, a principal causa de óbito. No estudo citogenético observa-se aumento de quebras cromossômicas espontâneas e trocas entre cromátides irmãs (TCI), que é utilizada como marcador diagnóstico para a SB. Essas alterações são causadas por um defeito no mecanismo de reparo do DNA, decorrente de uma mutação no gene *BLM*. **Objetivos:** Realizar o estudo citogenético de trocas entre cromátides irmãs para o diagnóstico de pacientes com suspeita clínica de SB; caracterizar os aspectos clínicos e avaliar a evolução de pacientes com SB. **Métodos:** Foram estudados nove pacientes (4 M e 5 F) pertencentes a oito famílias com suspeita clínica de SB utilizando preparações cromossômicas tratadas com 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) e coloração Hoechst - Giemsa para visualização diferencial das cromátides irmãs e análise de frequência de TCI. **Resultados e Discussão:** Todos os pacientes foram positivos para a pesquisa de TCI cuja frequência variou de 45,2 a 61,3 TCI/metáfase. A idade dos pacientes ao diagnóstico variou de 1a1m até 11a (média de 4a6m). O principal motivo do encaminhamento foi o déficit de crescimento e apenas um paciente foi encaminhado por apresentar lesões cutâneas. Todos apresentaram deficiência de crescimento pré e pós-natal, microcefalia e hipoplasia malar. O eritema esteve presente em 8/9 pacientes. Manchas café-au-lait e/ou manchas hipocrômicas foram observadas em sete pacientes. Um paciente apresentou agenesia unilateral da fíbula, encurtamento da tíbia e agenesia do 5° artelho, associado à hipoplasia renal. As infecções de repetição foram relatadas em 8/9 pacientes, sendo principalmente pneumonia e diarreia. Deficiência de imunoglobulinas foi observada em 6/9 pacientes, principalmente: deficiência de IgG (3/6), de IgA (2/6) e de IgM (1/6). A consanguinidade entre os pais foi encontrada em 4/8 famílias, apenas uma família apresentou dois filhos afetados. Duas pacientes (2/9) evoluíram com tumor de Wilms (TW), uma aos 3a6m e a outra aos 3a11m. Houve recidiva em uma paciente que faleceu aos cinco anos. A outra paciente evoluiu bem e atualmente está com 20 anos. **Conclusão:** O diagnóstico da SB deve ser feito precocemente baseado na avaliação clínica. A pesquisa citogenética de TCI, que é de baixo custo e fácil aplicação, é fundamental para a confirmação diagnóstica. A frequência aumentada para o desenvolvimento de neoplasias em idade precoce, alerta para um rastreamento das neoplasias mais comuns como linfoma, leucemia e tumor de Wilms.

Descritores: Síndrome de Bloom, Instabilidade cromossômica, Troca de cromátide irmã, Tumor de Wilms.

Abstract

Moreira MB. *Clinical and cytogenetics aspects of Bloom syndrome* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Introduction: Bloom syndrome (BS) is a rare chromosomal instability syndrome, transmitted by autosomal recessive inheritance. It's characterized by pre and post-natal growth deficiency, microcephaly, malar hypoplasia, telangiectatic erythema on the face and impaired immune system. BS patients present an increased predisposition to develop cancer at early age, which is the main cause of death. In the cytogenetic exam is observed an increase of spontaneous breaks and sister chromatid exchange (SCE) that is used as a diagnostic biomarker for the BS. These changes are caused by a defect in DNA repair mechanism, due to mutations in the *BLM* gene.

Objectives: Perform the cytogenetic study of sister chromatid exchange for the clinical diagnosis of BS patients; to characterize the clinical aspects and assess the follow-up of patients. **Methods:** Nine patients (4 M, 5 F) from eight families with clinical diagnoses of BS were studied using standard chromosome preparations treated with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) and Hoechst-Giemsa differential staining for visualization and analysis of frequency of SCE. **Results and Discussion:** All patients were positive for the presence of SCE with the frequency ranged from 45.2 to 61.3 SCE/metaphase. The age at diagnosis ranged from 1y1mo to 11y (mean 4y6mo). The main reason for referral was growth deficit except one due to skin lesions. All patients presented pre and post-natal growth deficiency, microcephaly and malar hypoplasia. The erythema was present in 8/9 patients. *Cafe-au-lait* spots and/or hypochromic spots were observed in seven patients. One patient had unilateral agenesis of the fibula, shortening tibia and agenesis of the 5th toe associated with renal hypoplasia. The recurrent infections were reported in 8/9 patients, mainly pneumonia and diarrhea. Immunoglobulin deficiency was observed in 6/9 patients such as IgG (3/6), IgA (2/6) and IgM (1/6). The parental consanguinity was found in 4/8 families, one family had two affected. Two patients (2/9) developed Wilms tumor (WT), one at 3y6mo and another at 3y11mo. There was recurrence in one patient who died at five years. The other patient is well at 20 years old. **Conclusion:** The diagnosis of BS should be done early based in clinical findings. The cytogenetic for SCE exam is essential for diagnostic confirmation, which is low cost and easy application. The screening for the most common malignancies such as lymphoma, leukemia and WT must be done due to increased predisposition for cancer development at an early age.

Descriptors: Bloom Syndrome, Chromosomal instability, Sister chromatid exchange, Wilms Tumor.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Bloom (SB – MIM #210900) é uma síndrome de instabilidade cromossômica rara, transmitida por herança autossômica recessiva (German, 1969). Foi descrita pela primeira vez em 1954, por David Bloom em um relato de um menino de nove anos de origem judaica, apresentando baixa estatura e eritema telangiectásico em face, semelhante a lúpus eritematoso.

A SB caracteriza-se por deficiência de crescimento pré e pós-natal, elevada fotossensibilidade distinguida por erupções na face (eritema facial semelhante ao do lúpus eritematoso) e comprometimento do sistema imunológico, com um aumento da frequência de infecções como a otite média e a pneumonia. Nos indivíduos afetados pela síndrome, ocorre um aumento da predisposição para o desenvolvimento de neoplasias (epitelial, linfóide, sistema nervoso, entre outras), devido a um defeito nos mecanismos de reparo do DNA. Essas neoplasias constituem-se a principal causa de óbito entre os pacientes afetados.

A SB é muito rara e sua frequência é desconhecida na população em geral, porém, sua ocorrência é maior em judeus de origem Ashkenazi e seus descendentes, sendo que, portadores heterozigotos, são estimados em pelo menos um para cada 120 nascidos vivos nessa população (Li et al., 1998).

Em 1966, foi criado nos Estados Unidos um programa, denominado de Registro da síndrome de Bloom, visando à caracterização clínica e a monitoração de indivíduos afetados. Por meio desse registro, foram obtidas as histórias clínicas e genéticas de muitas pessoas diagnosticadas como portadoras da SB, no período de 1960 a 2003, e o curso da doença foi monitorado nesses indivíduos, facilitando o acúmulo de dados clínicos e experimentais da síndrome. Esse registro, que ainda está em vigor, tem permitido a associação de um leque de características relacionadas à síndrome e a caracterização da forma clássica da doença (Sanz e German, 2006).

De acordo com esse registro, há descrição de apenas 265 casos pertencentes a 222 famílias (140 do sexo masculino e 125 do sexo feminino). Sendo que, 55 (24,8%) são de origem judaica e 16 casos são brasileiros (http://www.med.cornell.edu/bsr/data_from_registry/). A SB Foi também detectada em outros grupos étnicos, com uma presença relativamente alta em japoneses (Gretzula et al., 1987; German, 1994; German, 1999; Rezende et al., 2007). Assim como em outras doenças de mecanismo autossômico recessivo, a SB é encontrada com maior frequência quando há consangüinidade entre os pais dos afetados.

1.1 Aspectos clínicos

Anormalidades do crescimento - A deficiência de crescimento é a característica clínica mais marcante presente nos pacientes afetados pela SB, de início pré-natal se estende ao pós-natal (German, 1969; Gretzula et al., 1987; Sanz e German, 2006; Resende et al., 2007). Ao nascimento, o peso dificilmente excede os 2300g e o comprimento médio é de 44 cm. A estatura final dos pacientes raramente ultrapassa os 145 cm em meninos e os 130 cm em meninas (German, 1969). As dimensões corpóreas são proporcionais e a investigação de hormônio de crescimento apresenta-se normal (Gretzula et al., 1987).

Face – Os portadores da síndrome apresentam fácies típico: microcefalia, face estreita com hipoplasia malar, nariz proeminente e eritema malar (German, 1969; Rezende et al., 2007). Ao nascimento, não apresentam alterações na pele, no entanto, com a exposição à luz solar, surgem lesões cutâneas caracterizadas por eritema telangiectásico - produzido por dilatação dos vasos (Bloom, 1954; German, 1969; Gretzula et al., 1987; Sanz e German, 2006; Rezende et al., 2007). Essas erupções normalmente acometem a face, na região malar, nariz e lábios, assemelhando-se a asas de borboleta (lembrando lúpus eritematoso) podendo ainda afetar outras partes do corpo fotoexpostas, como dorso das mãos e antebraços. Os eritemas telangiectásicos tendem a desaparecer com o tempo e podem ser substituídos por atrofia e hipocromia.

Pele – As manchas *café-au-lait* estão presentes em cerca de metade dos pacientes afetados (German, 1969). Manchas hipocrômicas também são comuns (Rezende et al., 2007).

Anormalidades ocasionais – Outros achados, menos freqüentes, são: hipodontia; cardiopatia congênita; fístula traqueoesofágica; estreitamento do meato uretral; oligodactilia, polidactilia, sindactilia ou clinodactilia; prega palmar única; luxação congênita de quadril e pé torto congênito (German, 1969; Sanz e German, 2006).

Sistema imunológico – A função imunológica dos pacientes portadores da SB é anormal com redução das concentrações de imunoglobulinas plasmáticas. São observados graus variados de imunodeficiência celular e humoral de etiologia desconhecida (Sanz e German, 2006; Rezende et al., 2007). Na infância são comuns diarreias e infecções recorrentes do trato respiratório.

Doença pulmonar crônica – Cerca de 20% dos pacientes desenvolvem algum tipo de infecção bacteriana no trato respiratório. Quando não tratadas adequadamente essas infecções podem progredir para bronquiectasia crônica. A doença pulmonar crônica é a segunda maior causa de óbito em pacientes com SB (Sanz e German, 2006).

Diabetes Mellitus – De acordo com o registro internacional da SB, 15,8% dos portadores desenvolve diabetes *mellitus* tipo II precocemente, entre 4 e 45 anos (média de 26 anos). Geralmente não são insulino dependentes. Anormalidades envolvendo mecanismos de liberação de insulina e tolerância à glicose são ocasionalmente observados (Sanz e German, 2006).

Fertilidade – Os homens afetados pela SB apresentam hipogonadismo e são inférteis devido à azoospermia. No entanto os adolescentes desenvolvem características secundárias normais. Também são observados hipospádia, atrofia, criptorquidia e hipoplasia testicular (German, 1969). As mulheres apresentam menarca tardia e menopausa precoce. Os ciclos menstruais são irregulares e a fertilidade parece ser diminuída (Gretzula et al., 1987; Sanz e German, 2006; Rezende et al., 2007). Há apenas um relato de gravidez de sucesso descrito na literatura em uma portadora de SB, cuja criança nasceu de 35 semanas e o exame

citogenético excluiu a doença sendo a criança, portanto, obrigatoriamente heterozigota (Mulcahy et al., 1981).

Desenvolvimento cognitivo – Em geral a inteligência é normal, porém, alguns pacientes podem apresentar deficiência cognitiva leve com dificuldade de aprendizado, problemas de leitura, déficit de atenção e de memória, observados principalmente na infância (German, 1969; Sanz e German, 2006).

Câncer – A neoplasia é a principal causa de morte dos pacientes acometidos pela doença (Liu e West, 2008). Aproximadamente 42% dos afetados desenvolvem neoplasias em idade precoce e, cerca de 10% destes, desenvolvem mais de um tipo de neoplasia - principalmente linfomas, carcinomas epiteliais, hematopoiéticos e em alguns casos tumor de Wilms e retinoblastomas (German, 1997; Ellis et al., 1998; Ma et al., 2001; Bhisitkul e Rizem, 2004; Sanz e German, 2006; Rezende et al., 2007). A idade média do surgimento de neoplasia varia entre 2 e 49 anos (média de 24,7 anos), e a idade média de óbito é de 24 anos (Ma et al., 2001). Os pacientes acometidos pela SB são mais suscetíveis a toxicidades de quimioterapias e a radioterapia pode ser uma estratégia preferível ao tratamento (Martin et al., 2010).

1.2 Diagnóstico clínico

A SB deve ser considerada quando ocorre retardo de crescimento intra-uterino de causa desconhecida que persiste durante o desenvolvimento pós-natal e os eritemas fotossensíveis principalmente em face. Outros achados associados podem ser:

- ✓ Excesso de manchas *café-au-lait*, usualmente acompanhadas por manchas hipopigmentadas;
- ✓ Pessoas com imunodeficiência não esclarecida;
- ✓ Pessoas com deficiência cognitiva idiopática;
- ✓ Adultos jovens que evoluem com diabetes *mellitus*;

- ✓ Homem infértil com testículos anormalmente pequenos e mulheres com menopausa precoce;
- ✓ Pessoas de baixa estatura que desenvolvem câncer precocemente.

Na suspeita clínica de SB deve-se realizar estudo citogenético para a observação de aumento do intercâmbio entre cromátides irmãs, que permite a confirmação diagnóstica da SB.

1.3 Aspectos citogenéticos da SB

1.3.1 Instabilidade genômica e integridade celular

Rearranjos cromossômicos podem decorrer de instabilidade genômica. A estabilidade genômica depende do funcionamento correto das vias de reparo a danos sofridos pelo DNA. A manutenção da integridade genômica requer fidelidade no reparo, principalmente quando ocorrem quebras na dupla fita do DNA (DSBs – do inglês *Double Strand Breaks*), que quando não reparadas adequadamente resultam em rearranjos genômicos (Payne e Hickson, 2008).

A DSB é a principal causa de instabilidade genômica (Martin et al., 2010). Podem ocorrer naturalmente por processos endógenos, como metabolismo oxidativo, por agentes exógenos como por radiação ionizante e agentes químicos (Singh et al., 2009). Para minimizar o impacto nocivo destes danos contínuos, as células evoluíram dois tipos de mecanismos de reparo de DSBs: a junção de extremidades quebradas não homólogas (NHEJ – do inglês *Non-Homologous End Joining*) e o reparo por recombinação homóloga (RH) (Figura1).

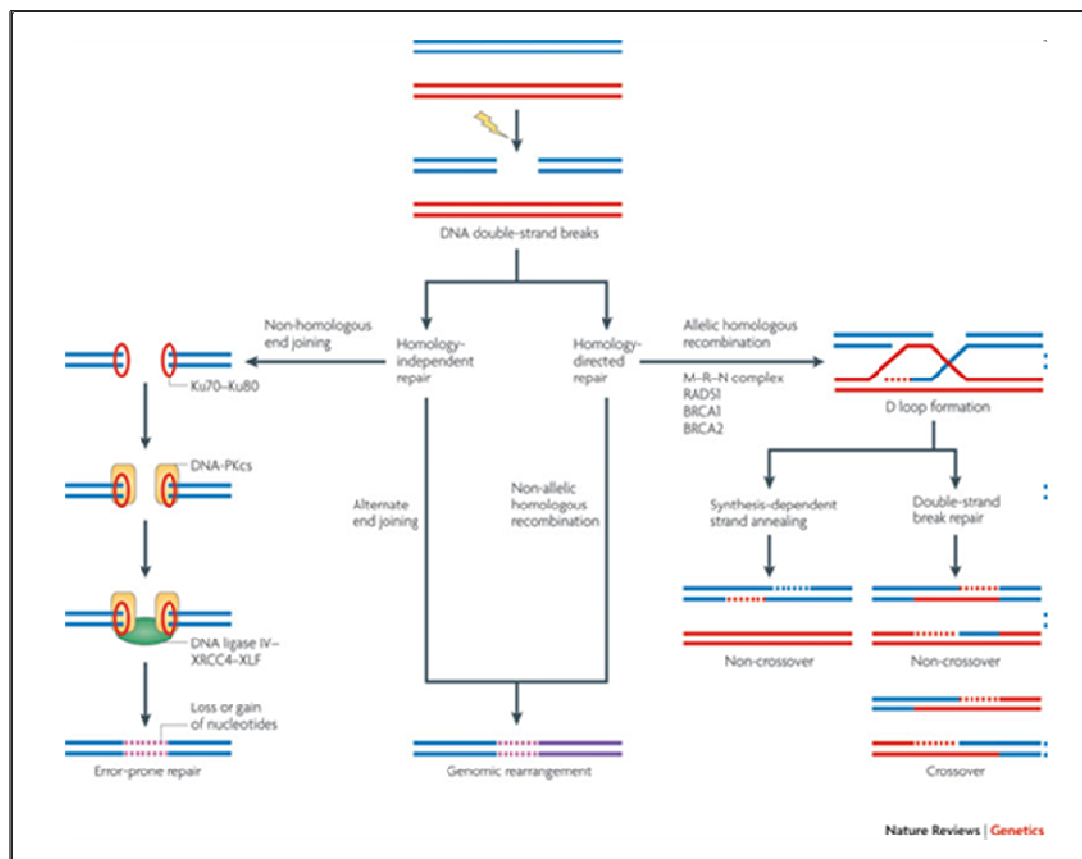


Figura 1 - Sistema de reparo de lesões causadas por quebras na dupla-fita de DNA. Os principais mecanismos são: (A) reparo por recombinação não homóloga (NHEJ) e (B) reparo por recombinação homóloga (RH) (Payne e Hickson, 2008).

Em mamíferos, a cicatrização ocorre preferencialmente por NHEJ, sendo comum advirem inserções ou deleções no ponto de quebra quando o reparo é efetuado por essa via. Ocorrendo mais de uma quebra em uma mesma célula, esse mecanismo de reparo por NHEJ poderia unir extremidades não contíguas, levando a rearranjos estruturais (Payne e Hickson, 2008).

O reparo por RH foi inicialmente estudado em leveduras, que se utilizam preferencialmente dessa via, entretanto as células dos mamíferos também são capazes de reparar seu DNA por meio da RH. Essa via restaura a integridade celular praticamente livre de erros, pois envolve o uso de uma sequência de DNA homóloga como modelo para a resíntese. Em leveduras, a RH pode ser efetuada utilizando-se do cromossomo homólogo, passando a operar em todas as fases do ciclo celular. Em contraste, nas células dos mamíferos, a RH utiliza apenas cromátides irmãs como

modelo restringindo-se as fases de pós-replicação do ciclo celular, preferencialmente as fases S e G2 (Deckbar et al., 2011, Madlenov e Iliakis, 2011).

1.3.2 Instabilidade cromossômica e a SB

Defeitos nos mecanismos de reparo por RH geram instabilidade genômica que se reflete em alterações cromossômicas principalmente quebras e *gaps* cromossômicos e cromatídicos, rearranjos estruturais e trocas recíprocas entre segmentos cromossômicos homólogos. O defeito básico da SB altera esses mecanismos levando ao aumento de quebras cromossômicas espontâneas e de trocas entre cromossomos homólogos levando a rearranjos característicos como as configurações quadrirradiais. Todavia, o que distingue as células dos portadores da SB é a característica única de aumento da frequência de trocas entre cromátides irmãs (TCI). Embora ocorram devido a uma causa comum, todas essas anormalidades citogenéticas podem ser divididas de forma aparentemente independente:

1.3.2.1 Quebras cromossômicas e cromatídicas

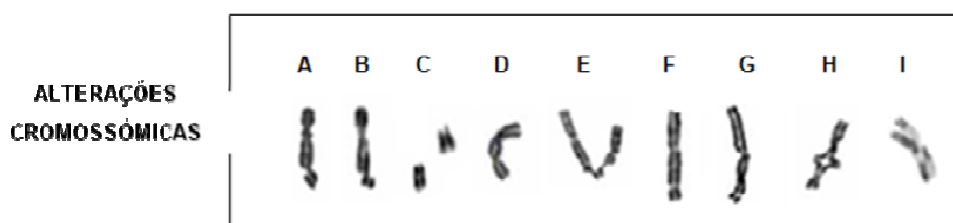


Figura 2 - Alterações cromossômicas observadas como resultado de instabilidade em células de portadores da SB: (A) quebra cromossômica; (B) quebra cromatídica; (C) fragmentos cromossômicos; (D) cromossomo dicêntrico; (E) rearranjo; (F) falha cromossômica; (G) falha cromatídica; (H) configuração quadrirradial e (I) troca entre cromátides irmãs.

De acordo com a fase do ciclo celular em que ocorrem, as quebras podem ser cromossômicas ou cromatídicas. Se uma quebra ocorrer durante a fase G1, com ambos os fragmentos replicados durante a fase S, pode-se observar a quebra cromossômica, ou seja, quebra em ambas as cromátides (Figura 2A). Se a quebra ocorrer durante a fase G2 do ciclo celular, pode-se observar a quebra cromatídica (Figura 2B), ou seja, quebra em apenas uma das cromátides (Kuhn e Therman, 1986).

Quando as quebras ocorrem durante a fase S ou G2 do ciclo celular também podem originar fragmentos (Figura 2C), que são segmentos cromossômicos de origem desconhecida. Estes podem ser: (1) fragmentos acêntricos, que são segmentos cromossômicos sem centrômero e (2) fragmentos cêntricos, que são segmentos cromossômicos com centrômero. Ambos são considerados cromossomos marcadores, e podem aparecer de forma aleatória nas células dos indivíduos portadores da SB (Kuhn e Therman, 1986).

Também é observado um tipo raro de anormalidade onde as extremidades de dois segmentos cromossômicos centroméricos, que sofreram quebras, se fundem, é o chamado cromossomo dicêntrico (Figura 2D). Esse mecanismo leva a perda dos fragmentos acêntricos. A grande maioria dos cromossomos dicêntricos observados nas células de indivíduos portadores da SB são simétricos (isodicêntricos), e decorrem de dois cromossomos homólogos que sofreram quebras em pontos idênticos (Kuhn e Therman, 1986).

Ainda decorrente de quebras cromossômicas e cromatídicas, são observadas translocações, deleções, duplicações, inversões e rearranjos (Figura 2E) (Kuhn e Therman, 1986).

As falhas ou *gaps* cromossômicos ou cromatídicos (Figura 2F e G) são alterações cujos mecanismos ainda não foram bem elucidados. (Kuhn e Therman, 1986). Correspondem às lesões acromáticas, com pequenas mudanças estruturais, sendo estas lesões em geral, menores do que a largura da cromátide.

1.3.2.2 Configuração quadrirradial

Configurações quadrirradiais (Figura 2H) são anormalidades cromossômicas que ocorrem como consequência de lesões sofridas pelas cromátides de cromossomos homólogos. Podem ser de dois tipos, dependendo da posição do centrômero: simétricas ou assimétricas. As configurações assimétricas não são equilibradas. As configurações simétricas (aparentemente equilibradas) resultam da troca entre cromátides que tomam lugar em sítios similares nos dois cromossomos homólogos durante a mitose. Os centrômeros estão em raios opostos entre os quatro braços cromossômicos da figura quadrirradial. Esse tipo de configuração é característica da SB (German et al., 1974).

1.3.2.3 Trocas entre cromátides irmãs

A SB se diferencia das outras síndromes de instabilidade cromossômica por apresentar um aumento de TCI (Figura 2I) quando comparado a culturas celulares de indivíduos normais.

Durante a fase S do ciclo celular o DNA é replicado e cada cromossomo se duplica em duas cromátides irmãs, que segregam unidas pelo centrômero durante o ciclo celular. As cromátides irmãs são visualizadas durante a metáfase mitótica, onde os cromossomos estão completamente condensados. As TCIs são trocas recíprocas que ocorrem naturalmente como eventos associados à replicação normal do DNA, onde as cromátides irmãs sofrem quebras com subsequente reunião e troca recíproca dos segmentos homólogos (Figura 3). Esse processo ocorre predominantemente como parte do mecanismo de RH e é considerado livre de erros, já que nenhuma informação é alterada, apenas troca de posição. Esse evento ocorre em baixas taxas nos indivíduos normais, sendo estimada em 3 – 4 trocas por célula (Figura 4A) (Wilson e Thompson, 2007; Payne et al., 2009). Entretanto, as células dos portadores da SB possuem esse mecanismo de RH imperfeito, elevando de 50 a 100 vezes a frequência de TCI (Figura 4B) (German et al., 1974).

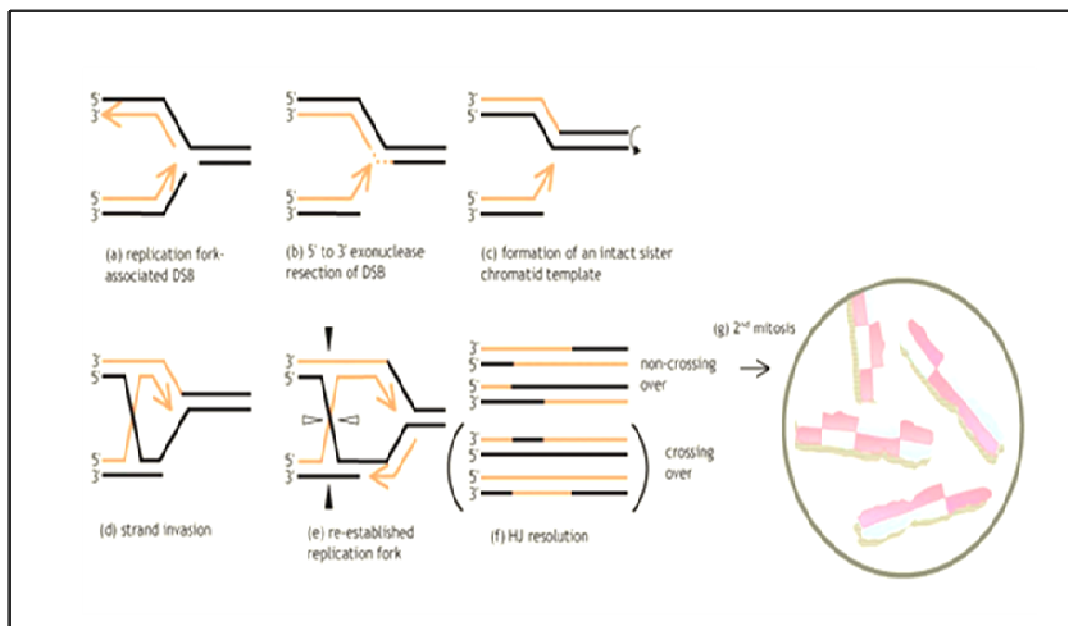


Figura 3 - Esquema do reparo por recombinação homóloga de uma forquilha de replicação em colapso. (a) Forquilha de replicação extremidade livre. (b), (c) e (d) Invasão a extremidade homóloga e replicação re-estabelecida. (e) (f) Crossing over. As setas laranja indicam os sentidos de síntese de DNA; as linhas pretas designam a fita DNA molde e as linhas em laranja mostram o DNA recém-sintetizado; os parênteses designam o não cruzamento e as setas cheias indicam o *crossing over* (Helleday, 2003).

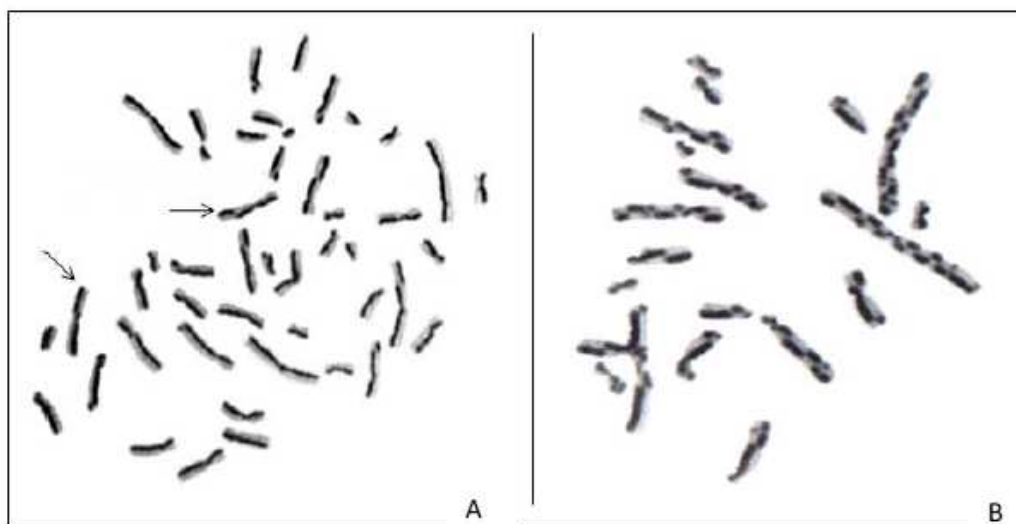


Figura 4— Metáfase proveniente de cultura linfocitária, sob coloração diferencial de cromátides irmãs, observada ao microscópio óptico. As cromátides de cor preta são as sofreram incorporação do BrdU. As setas indicam exemplos de TCI: (A) controle normal, apresentando poucas TCIs e (B) controle positivo para a SB, apresentando frequência aumentada de TCIs

O evento de TCI é facilmente observado ao microscópio óptico em células tratadas com 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). O BrdU é um análogo sintético de timidina que se incorpora ao DNA durante a replicação, quando adicionado a cultura celular (Chaganti et al., 1974). Como a replicação do DNA é feita de forma semiconservativa, todo o BrdU se incorpora em uma das fitas de DNA da célula filha de cada dupla-fita de DNA. Durante o segundo ciclo de crescimento celular em meio de cultura contendo BrdU, as duas cromátides irmãs se diferenciam entre uma cromátide com a fita de DNA original e outra com incorporação de BrdU em ambas as fitas de DNA (Figura 5). Para que essa incorporação do BrdU ao DNA celular seja reconhecida, utiliza-se a técnica Hoeschst-Giemsa (Perry e Wolff, 1974). Esta técnica consiste na ligação do fluorocromo Hoechst 33258 ao BrdU através da denaturação do DNA por exposição à luz UV e posterior coloração com corante Giemsa, tornando possível observar a cromátide diferenciada onde o BrdU foi incorporado.

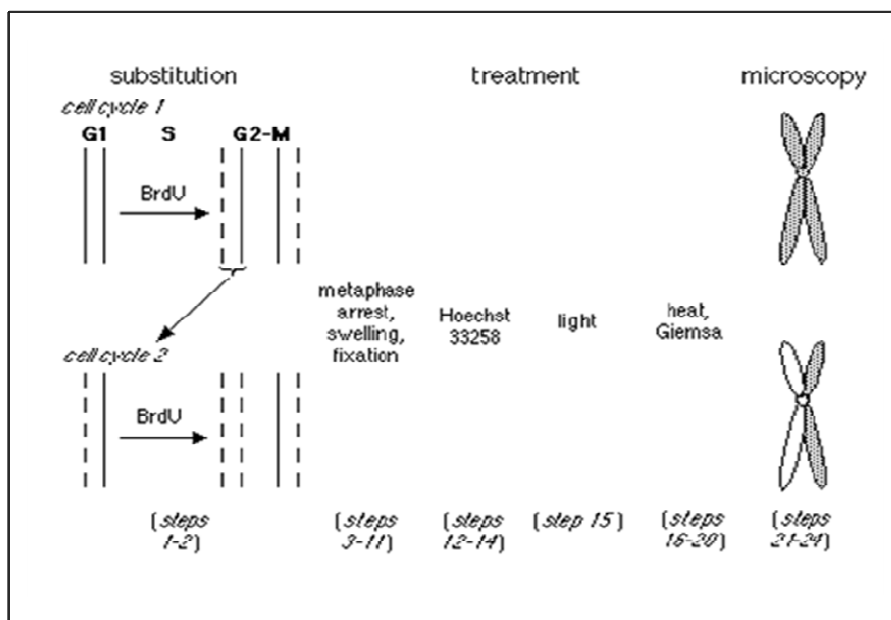


Figura 5– Diagrama demonstrativo da incorporação do agente BrdU ao DNA celular por dois ciclos celulares (German e Alhadef, 2001).

A análise cromossômica utilizando o agente BrdU pode ser realizada em qualquer tipo de linhagem celular, porém, a cultura de linfócitos é a mais utilizada (Ray e German, 1984). Para o diagnóstico pré-natal, é possível utilizar linhagens celulares provenientes de fibroblastos obtidos através de culturas de líquido amniótico, vilosidades coriônicas e células linfocitárias de sangue do cordão umbilical (Sanz e German, 2006).

O diagnóstico da SB é baseado em achados clínicos, no entanto, o estudo citogenético para pesquisa TCI é fundamental para a confirmação diagnóstica, sendo considerado padrão diagnóstico ouro.

1.4 Aspectos moleculares

1.4.1 A síndrome de Bloom e o gene *BLM*

O gene responsável pela SB, *BLM* (*Bloom syndrome*; RecQ helicase-like – NC_000015.9), foi identificado em 1995 por Ellis e colaboradores. Trata-se de um gene supressor de recombinação homóloga mapeado no braço longo do cromossomo 15, na região 15q26.1. O gene *BLM* apresenta 98,11Kb de extensão e é composto por 22 éxons que, em condições normais, codificam a proteína BLM (NP_000048). Esta proteína é constituída por 1.417 aminoácidos e pertence à subfamília das DNAs helicases, especificamente ao grupo das helicases RecQL homólogas à RecQ helicase de *E. coli* (Amor – Guerét, 2004).

A família RecQ é definida por sete motivos altamente conservados no domínio helicase, localizado centralmente na proteína. Os domínios helicases de todos os humanos, e de outras espécies, como os de leveduras (Sgs1 em *Saccharomyces cerevisiae* e Rqh1 em *Schizosaccharomyces pombe*) apresentam homologia de 40 – 50% de aminoácidos com a RecQ de *E. coli*. (Figura 6) (Seki et al., 2008; Singh, 2009). Além disso, na espécie humana, há cinco RecQ homólogas identificadas, sendo RECQL1, RECQL2 (WRN), RECQL3 (BLM), RECQL4 e RECQL5. Três

delas (WRN, BLM e RECQL4) estão associadas às síndromes de Werner, Bloom e Rothmund-Thomson, respectivamente (Liu e West, 2008).

A helicase BLM é requerida durante a RH com a função de desenrolar a dupla-hélice de DNA, no sentido 3'-5', em um processo dependente de ATP. É identificada como fator chave anti *crossover* participando de uma rede de interações físicas entre proteínas nucleares que a ajudam a desempenhar sua função (Figura 7).

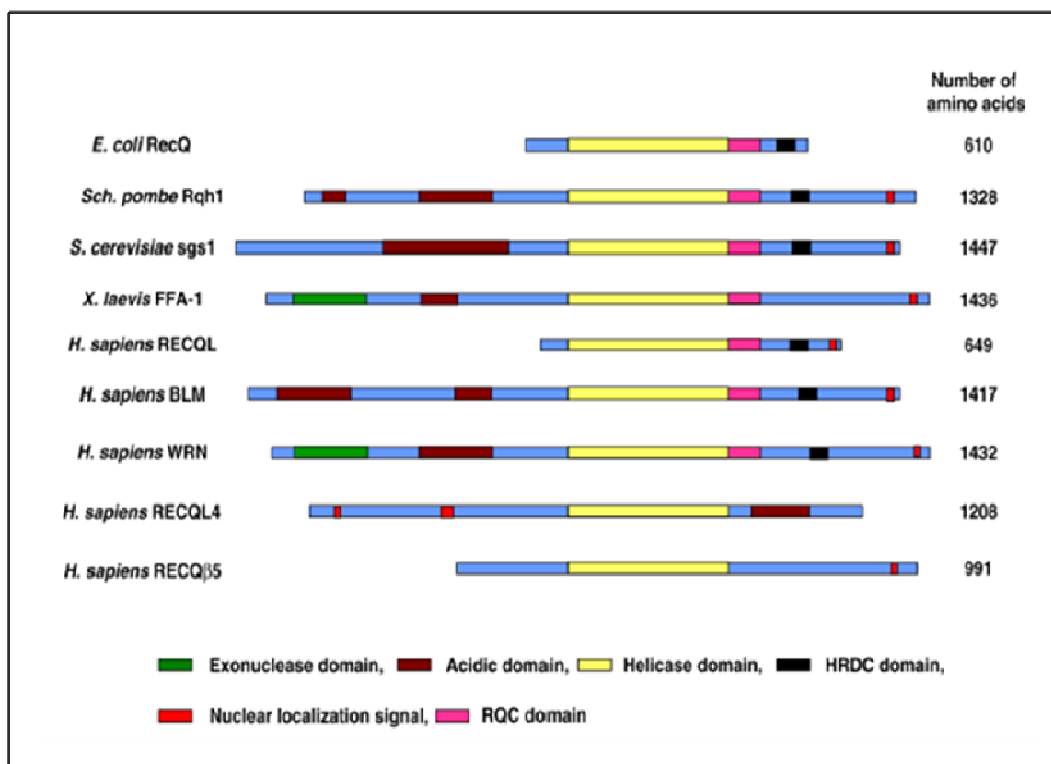


Figura 6– Representação esquemática de membros da família RecQ de DNA helicases. Os domínios conservados estão alinhados em um código de cores, como indicado na parte inferior da figura. O tamanho em aminoácidos da proteína de cada espécie está indicado à direita. O nome das proteínas e das espécies de origem está indicado à esquerda. As cinco RecQ helicases humanas são indicadas pela caixa vermelha. (Singh et al., 2009).

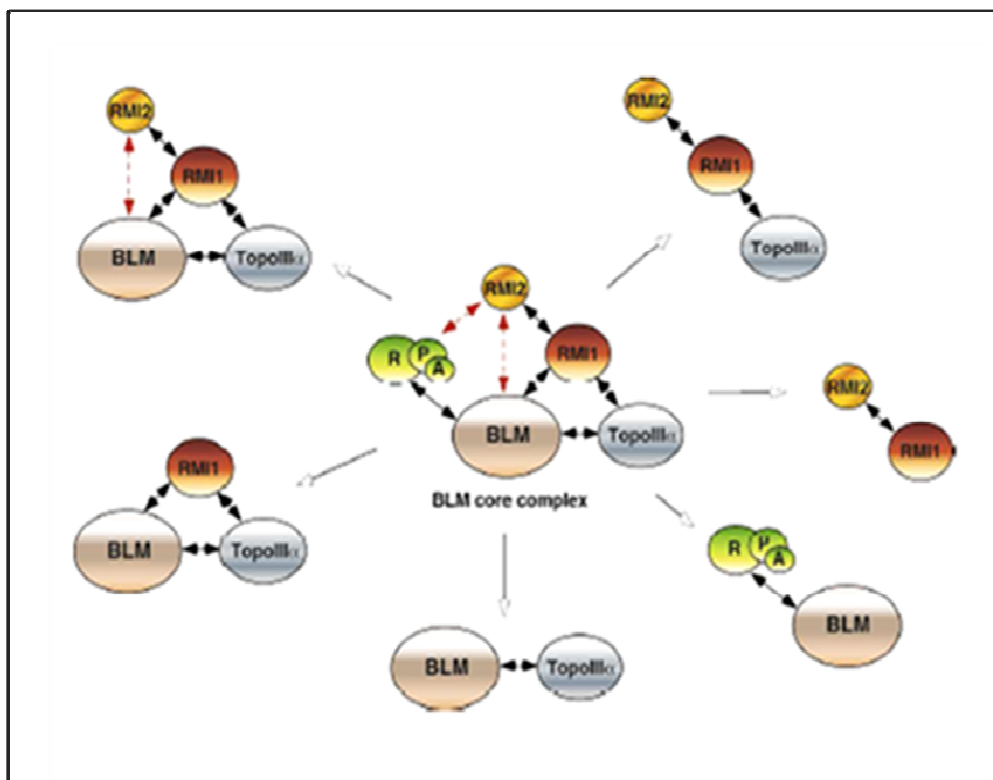


Figura 7 – Diagrama esquemático indicando a rede de possíveis interações entre a BLM e proteínas nucleares específicas. Interações diretas entre duas proteínas são indicadas por setas pretas duplas, enquanto que, possíveis interações são demonstradas pelas setas vermelhas tracejadas (Liu e West, 2008).

Em condições adequadas, uma das principais funções da BLM é organizar a migração das estruturas intermediárias de DNA geradas durante a RH, como as Junções *Holliday* (Wu e Hickson, 2003). Neste caso, o processo de reparo por RH é iniciado pela ligação do complexo MRN (Mre11/Rad51/Nbs1) as extremidades de DNA livres resultantes da DBS, promovendo a ressecção das extremidades de DNA danificadas. Esse processo é necessário para a formação extremidades de fitas simples de DNA (ssDNA – do inglês *Single Strand DNA*). Subseqüente a ressecção, as ssDNAs são estendidas pelas nucleases Exo1 e Dna2, apoiadas pela BLM. Entretanto a exata sincronia entre as nucleases e a helicase não é clara (Liu e West, 2009). A extremidade 3' resultante, que pode se estender em mais centenas de bases, é estabilizada pela proteína de replicação A (RPA), a qual é sequencialmente substituída pela recombinase Rad51. Após encontrar seu ponto de homologia, este filamento nucleoproteico (ssDNA+Rad51) invade a dupla-hélice da cromátide irmã.

Utilizando a extremidade 3' livre como *primer*, a síntese de DNA é realizada pela DNA polimerase e a ligação ocorre pela DNA-ligaseI. Deste processo formaram-se junções *Holliday*, que são finalmente resolvidas pelo complexo BLM/TopIII α /RMI1 formando produtos com *crossing overs* (Helleday, 2003). Outras formas resultantes da RH também servem como substrato para a BLM como os G-quadruplex e os D-loops.

Ao nível celular, mutações no gene *BLM* aumentam a frequência de *crossing overs* entre cromátides irmãs e cromossomos homólogos, além de deleções e rearranjos genômicos (Andersen et al., 2011). Além disso, o aumento de recombinações e a hipermutabilidade levam a perda de heteroziguidade, comumente relacionados a neoplasias.

Já foram identificadas 70 mutações diferentes no gene *BLM* em indivíduos acometidos pela SB, a maioria resultando em término prematuro da tradução da proteína BLM (Aslan e Ezgu, 2009). A mutação mais comum é do tipo *frameshift* com deleção de 6pb e inserção de 7pb (c.2207_2212delinsTAGATTC) localizada no éxon 10, na posição 2281 do gene *BLM*. Foi nomeada *BLM^{Ash}*, pois, foi detectada com maior prevalência em judeus de origem Ashkenazi e seus descendentes, entretanto, também é observada em outras populações (German et al., 2007).

Mutações produzidas em homozigose ou em heterozigose entre os 70 tipos diferentes de mutações são observadas no *BLM* e produzem fenótipo similar.

1.5 Herança

A SB é uma doença genética de herança autossômica recessiva, portando, indivíduos com mutação em ambos os alelos do gene *BLM* apresentam as características clínicas e alterações citogenéticas.

A taxa de consanguinidade é aumentada entre os pais dos afetados (German, 1969).

Os portadores heterozigotos apresentam desenvolvimento e crescimento normais, sem alterações cromossômicas em suas células somáticas (Sanz e German,

2006). Há relatos de que estes indivíduos portadores apresentam uma predisposição para o desenvolvimento de câncer de cólon (Thomas et al., 2008).

1.6 Manejo Clínico

Os pacientes devem ser orientados a reduzir suas exposições à luz solar e aplicar filtro solar regularmente devido ao aumento da fotossensibilidade.

Além disso, é necessário determinar regularmente as concentrações de imunoglobulinas plasmáticas, pois a deficiência de imunoglobulinas está relacionada ao aumento de infecções de repetição observada nos afetados pela SB, principalmente infecções do trato respiratório superior e gastrointestinal. Para as infecções como a otite média e a pneumonia, são necessários tratamentos profiláticos com antibióticos rotineiros.

O diagnóstico da SB deve ser realizado precocemente principalmente devido à predisposição aumentada para o desenvolvimento de neoplasias. O rastreamento de neoplasias, principalmente para linfoma e leucemia deve ser realizado em todos os pacientes com SB confirmado.

No tratamento das neoplasias, com quimioterapia, os pacientes com SB são mais suscetíveis às toxicidades, sendo necessário rever as doses utilizadas e a duração do tratamento. Na radioterapia, não houve diferença em relação ao efeito adverso (Wong and Hashisaki, 1996).

1.7 Diagnóstico diferencial

Outras síndromes de instabilidade cromossômica, de herança autossômica recessiva, especificamente aquelas que apresentam baixa estatura são: Anemia de Fanconi, Rothmund-Thomson, Ataxia Telangiectasia, Nijmegen, Xeroderma Pigmentoso e Werner.

1.7.1 Anemia de Fanconi (AF)

A AF é uma síndrome de expressão clínica variável que se caracteriza por: alterações esqueléticas, renais, cardíacas, alterações pigmentares da pele e alta frequência (mais de 90%) de pancitopenia progressiva.

No exame citogenético a AF se caracteriza por alterações cromossômicas espontâneas, tais como: lacunas e quebras cromatídicas ou cromossômicas, rearranjos complexos, figuras tri e quadrirradiais, fragmentos e anéis cromossômicos. Não há um cromossomo preferencialmente envolvido, porém, as quebras tendem a se localizar nas regiões limítrofes entre as regiões claras e escuras da técnica de bandamento G e Q (Ray e German, 1984).

A pesquisa de quebras cromossômicas espontâneas e/ou induzidas pelo diepoxibutano (DEB) é o principal critério citogenético para o diagnóstico. Pois, as células dos portadores são extremamente sensíveis ao DEB que é utilizado por ser um agente alquilante de DNA de baixa citotoxicidade.

Assim como outras síndromes de instabilidade cromossômica, a AF apresenta maior susceptibilidade para o desenvolvimento de neoplasias, principalmente as leucemias, porém tumores sólidos do trato gastrointestinal e fígado também são observados (Horta et al.,2006).

A base genética da anemia de Fanconi é tão complexa quanto à grande variação na apresentação clínica. Há 15 subtipos genéticos caracterizados pelos grupos de complementação FA (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, O P), cada qual com um defeito genético distinto (Alter e Kupfer, 2011). A AF ocorre devido a uma falha nos mecanismos de reparo do DNA com o conseqüente acúmulo de uma grande quantidade de mutações. Em virtude da incapacidade de manter a integridade genômica, observa-se o alto grau de instabilidade cromossômica (Horta et al., 2006).

1.7.2 Síndrome de Rothmund-Thomson (SRT – MIM 268400)

A SRT é uma genodermatose infantil que apresenta um eritema facial característico (poiquilodermia) e espectro clínico variável: baixa estatura, cabelos esparsos, ausência de sobrancelhas, catarata juvenil, anormalidades esqueléticas, envelhecimento precoce e predisposição para o desenvolvimento de osteosarcoma (Larizza et al., 2010).

A análise citogenética pode revelar anormalidades do cromossomo 8 como trissomia, duplicação parcial do braço longo (8q) e tetrassomia 8q. As quebras cromossômicas espontâneas não são comumente observadas em culturas celulares provenientes de linfócitos e fibroblastos, exceto quando as culturas são expostas à luz ultravioleta radiação UV (Larizza et al., 2010). Entretanto, por não apresentar um padrão consistente, o estudo citogenético não é utilizado como critério diagnóstico.

A SRT é causada por mutações no gene *RECQL4*, localizado na região 8q24.3, que codifica uma DNA helicase denominada RECQL4. Wang et al. (2003) realizaram uma correlação entre a análise clínica e molecular de portadores da SRT apontando mutações em homozigose e em heterozigose que, somadas a clínica, sugerem dois espectros da doença, a SRT tipo I e II. A SRT tipo I esta associada ao poiquiloderma, mas não ao osteosarcoma e as mutações produzem uma proteína truncada. A SRT tipo II caracteriza-se por poiquilodermia, osteosarcoma e mutações deletérias na RECQL4 (Wang et al., 2003).

1.7.3 Ataxia Telangiectasia (AT – MIM 208900)

A AT se caracteriza por ataxia cerebelar progressiva de instalação na infância, surgimento de telangiectasia oculocutâneas e predisposição para infecções pulmonares. O aparecimento tardio de telangiectasia em uma criança atáxica pode dificultar o diagnóstico precoce da doença.

No estudo citogenético, observam-se várias alterações: cromossomos dicêntricos e translocações, principalmente envolvendo os cromossomos 7 e 14 e

inversões do cromossomo 14. Contudo, nem todos os pacientes apresentam alterações cromossômicas em todos os estágios evolutivos da doença. Dessa forma, o cariótipo não é confiável para detecção da AT. No entanto, a dosagem elevada de alfa-feto-proteína e a análise molecular são utilizadas como principais métodos diagnósticos.

A AT é causada por diferentes mutações no gene *ATM* que codifica uma proteína membro da família fosfatidilinositol 3 – kinase, que responde a danos causados no DNA por meio de fosforilação de substratos envolvidos no reparo de DNA e no controle de progressão do ciclo celular, e apresenta implicações potenciais para o câncer na população em geral (Kastan, 1995).

1.7.4 Síndrome de Nijmegen Breakage (SNB – MIM 251260)

A SNB é caracterizada por: microcefalia progressiva, baixa estatura, imunodeficiência, predisposição aumentada para o desenvolvimento de neoplasias (principalmente linfóide) e deficiência cognitiva. As habilidades intelectuais tendem a diminuir com a idade.

As células de pacientes portadores da SNB apresentam alta sensibilidade a radiação ionizante, instabilidade cromossômica, encurtamento acelerado de telômeros e checkpoints anormais do ciclo celular. A instabilidade cromossômica pode ser observada sob forma de inversões e translocações, envolvendo preferencialmente os cromossomos 7 e 14. Os pontos de quebras comumente envolvidos são 7p13, 7q35, 14q11, e 14q32, que são loci de genes de imunoglobulinas e receptores de células T. Além dessas, a inversão (p13q35) no cromossomo 7 é a alteração mais freqüente observada nas células linfocitárias dos portadores da SNB (Tauchi et al., 2002). Contudo, a análise citogenética das células dos afetados nem sempre permite a visualização de tais alterações. Dessa forma, a confirmação diagnóstica da SN é realizada por meio de análise de mutações no gene *NBS1*, localizado no cromossomo 8, em 8q21, que, em condições normais, codifica uma proteína de reparo de DNA denominada nibrina (Tauchi et al., 2002).

1.7.5 Xeroderma Pigmentoso (XP)

O Xeroderma pigmentoso (XP) é uma genodermatose caracterizada por fotossensibilidade e por um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias de pele e olhos.

As células dos portadores de XP apresentam translocações de diversos tipos quando expostas à luz UV. No entanto, quebras cromossômicas espontâneas não são observadas (Norgauter J et al., 2003).

Mutações em *XP*, não apenas predispõe os afetados ao desenvolvimento de neoplasias, mas também promove um envelhecimento cutâneo e ocular prematuro e, em alguns casos, promove neurodegeneração progressiva (Kraemer e DiGiovanna, 2011).

Os defeitos no gene do *XP* são distribuídos ao longo de vários cromossomos. Os segmentos individuais do gene codificam proteínas de reparo que estão envolvidas em diversos passos do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (Norgauter J et al., 2003).

O XP pode ser classificado por grupos de complementação (XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F, XP-G) e as variantes (XP-V), que diferem em termos de gravidade clínica, celular e características genéticas (GeneReviews).

1.7.6 Síndrome de Werner (SW – MIM277700)

A síndrome de Werner (SW) apresenta aspectos de envelhecimento precoce (aparência senil, alopecia precoce ou cabelos precocemente grisalhos), com alterações na pele (hiperqueratose, pele esclerótica ou atrófica, principalmente nas extremidades), arteriosclerose prematura, catarata e diabetes *mellitus*. Também ocorre deficiência de crescimento e tendência para o desenvolvimento precoce de tumores (Oshima J et al., 2012).

A análise citogenética de linhagens celulares provenientes de linfócitos e fibroblastos de portadores da SW apresenta um aumento de alterações estruturais espontâneas, principalmente translocações variadas e em mosaicismos. Entretanto, a análise citogenética não é utilizada como método diagnóstico por ser um achado inespecífico. Dessa forma, recomenda-se o estudo molecular de mutações no gene *WRN*, para confirmação diagnóstica (Oshima J et al., 2012).

Objetivos

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho incluem:

- Realizar o estudo citogenético de trocas entre cromátides irmãs para o diagnóstico de pacientes com suspeita clínica de Síndrome de Bloom.
- Caracterizar os aspectos clínicos e avaliar a evolução de pacientes com Síndrome de Bloom.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Casuística

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (Cappesq – 0474/08) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de São Paulo (Cappesq-HCFMUSP).

Trata-se de um estudo retrospectivo e prospectivo de pacientes com diagnóstico clínico da SB. Foram estudados nove pacientes, quatro do sexo masculino e cinco do sexo feminino, encaminhados pelo Ambulatório de Genética Clínica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Também foram analisados dois casos controle.

Um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos responsáveis legais, ou, quando possível, pelo próprio paciente.

3.2. Análise do quadro clínico

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos de prontuários do Hospital e da Unidade de Genética. Foi preenchido um protocolo clínico que consistiu em: anamnese, exame físico detalhado e exames complementares de diferentes especialidades incluindo análises imunológicas, cardiológicas, endocrinológicas, oftalmológicas. Quando possível, os pacientes foram reavaliados em retorno ambulatorial em conjunto com a equipe médica da unidade de Genética.

3.3 Estudo citogenético

Inicialmente foi necessário o aprendizado da técnica de coloração diferencial de cromátides irmãs no laboratório de citogenética do Instituto Fernandez Figueira – IFF/Fiocruz, sob a supervisão do Dr. Juan Llerena Junior. Este laboratório foi escolhido por ser o único no Brasil que realiza o estudo citogenético de confirmação da SB. O presente estudo foi realizado no LIM36 (Laboratório de Investigação Médica de Pediatria) e constou das seguintes etapas: cultura linfocitária utilizando o agente 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), processamento, coloração diferencial de cromátides irmãs e análise. Foram utilizadas amostras controle para normatização da leitura dos testes.

3.3.1 Cultura linfocitária com BrdU

Foram coletados 5 ml de sangue periférico e colocados em tubo contendo heparina. Quando não semeados logo após a coleta, os sangues permaneceram em geladeira até o momento da utilização. Com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, cinco gotas de sangue total de cada amostra foi semeado em tubo estéril do tipo falcon de 15 ml (TPP®) contendo 4 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®), enriquecido com 1 ml de soro fetal bovino (Gibco®), 200 µl de fitohemaglutinina (Gibco®) e, 80 µl do agente BrdU (1,6 mg de BrdU diluída em 100 ml). As culturas foram incubadas em posição inclinada, com a tampa fechada, em estufa a 37°C por 72 horas.

Ao final do período de incubação, 35 µl de colcemid (Gibco®) foi adicionado às culturas e essas foram novamente incubadas em estufa a 37°C por mais uma hora. O material cultivado foi submetido à centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em 8 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) aquecida à 37°C. Os frascos de cultura foram novamente incubados em estufa a 37°C, na posição vertical por 30 minutos e em seguida, foram adicionados 0,5 ml de solução fixadora

constituída por metanol (Synth®) e ácido acético glacial (Synth®), na proporção 3:1, com o intuito de interromper a hipotonia. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente desprezado. Ao sedimento, foram adicionados 6 ml de solução fixadora e o material foi homogeneizado. Esse processo foi repetido por três vezes e o material final obtido foi utilizado para confecção das lâminas. O material proveniente da cultura com BrdU foi gotejado, sobre banho Maria a 60°C, em 3 lâminas previamente lavadas.

3.3.1.1 Coloração diferencial de cromátides irmãs

Este método foi realizado no mesmo dia em que as lâminas foram confeccionadas. Para tanto, as lâminas foram cobertas por solução de KCl a 2% (20 g de KCl (Merck®) diluído em 1.000 ml de água destilada) por 10 minutos. Logo em seguida, em ambiente escuro, foram cobertas por corante Hoechst 33258 (7,5 mg de Hoechst (Sigma®) diluído em 100 ml de água destilada) por 10 minutos. Após esse período, as lâminas foram enxaguadas em solução de KCl a 2%, cobertas por uma lamínula e expostas à luz UV (254 nm) por 40 minutos. As lâminas foram então lavadas em água destilada onde foi possível retirar as lamínulas sem raspar a lâmina. Em seguida, foram coradas por 5 minutos em corante Giemsa a 2%, enxaguadas em água destilada e secadas em temperatura ambiente.

3.3.1.1.1 Análise cromossômica sob coloração diferencial de cromátides irmãs

A análise foi realizada em um microscópio óptico utilizando a objetiva de imersão de 100X (Zeiss®) e as metáfases foram fotografadas pelo sistema de captura de imagem IKAROS (Zeiss® - versão 4.5).

Para estudo citogenético de visualização de TCI, foram analisadas 10 metáfases por indivíduo. O valor de TCI/metáfase foi estabelecido utilizando a média entre a soma dos pontos de trocas em cada metáfase observada. Os valores de

referência foram relacionados ao controle normal e positivo descritos pela literatura. Portanto, para o caso SB positiva, foram consideradas TCI acima de 10 - 15/metáfase (Sanz e German, 2006).

Também foram realizadas culturas linfocitárias para verificar quebras cromossômicas espontâneas. Para tanto, foram realizadas culturas sem o agente BrdU para análise sob coloração convencional e bandamento G, através da modificação da técnica de Moorhead et al. (1960), como descrito a seguir:

3.3.2 Cultura de linfócitos isenta de BrdU

Com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, cinco gotas de sangue total de cada amostra foram semeadas em tubo estéril do tipo falcon de 15 ml (TPP®) contendo 4ml de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®), enriquecido com 1 ml de soro fetal bovino (Gibco®) e 200 µl de fitohemaglutinina (Gibco®). O processamento foi realizado da mesma forma descrita no item 4.2.

3.3.2.1 Coloração

3.3.2.1.1 Coloração convencional

A coloração convencional foi realizada no mesmo dia em que as lâminas foram confeccionadas. Estas foram imersas por 5 minutos em uma solução de Giemsa a 2% (1 ml de corante Giemsa (Merck®) diluído em 50 ml tampão fosfato), enxaguadas em água corrente e secadas em temperatura ambiente.

3.3.2.1.2 Coloração por bandamento G

As lâminas envelheceram por vinte dias em estufa a 37°C. Após, receberam tratamento com solução de tripsina (1 g de tripsina 1:250 (Gibco®) diluída em 100 ml de tampão dulbeco). As lâminas foram imersas por nove segundos nessa solução à temperatura ambiente e enxaguadas em tampão fosfato (6,81 g de KH₂PO₄ e 0,88 g de NaOH, diluídos em água destilada). Em seguida, foram coradas por solução de corante Giemsa (Merck®) a 2% por 5 minutos, enxaguadas em água corrente e secadas em temperatura ambiente.

3.3.2.1.3 Análise cromossômica sob coloração convencional e bandamento G

Por indivíduo, foram analisadas 20 metáfases sob coloração convencional e 20 metáfases sob bandamento G. Observaram-se alterações cromossômicas e cromatídicas estruturais como falhas, quebras, fragmentos acrocêntricos, anéis, dicêntricos e figuras quadrirradiais. As variações cromossômicas encontradas foram classificadas e descritas conforme a terminologia do ISCN (2009). A determinação do valor de referência de quebras cromossômicas/metáfase foi estabelecida utilizando a média entre a soma de todas as alterações observadas em cada metáfase.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo clínico

No total de nove pacientes, a idade ao diagnóstico variou de 1a 1m até 11a (média de 4a 6m). O principal motivo do encaminhamento foi o déficit de crescimento e apenas um paciente foi encaminhado por apresentar lesões cutâneas.

4.1.1 Dados do nascimento

Três afetados (3/9) nasceram pré-termos e o peso ao nascimento variou de 870 g até 1.950 g (média 1.540 g). Seis pacientes (6/9) nasceram a termo e o peso variou de 1.500 g a 2.070 g (média 1.934 g). Assim, todos nasceram com déficit de crescimento intrauterino.

O comprimento ao nascimento foi informado em 7/9 pacientes, variando de 33 cm e 47 cm (média de 37,06 cm), no percentil entre p10-25.

O perímetro cefálico foi relatado em 3/6 pacientes nascidos a termo, e variou de 30 cm a 30,5 cm (<p5).

Os dados gestacionais encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Dados ao nascimento dos nove pacientes estudados

PACIENTES	DADOS AO NASCIMENTO				
	Sexo	Nascimento (pré-termo e termo)	Comprimento (cm)	PN (Kg)	PC (cm)
1	F	T	NI	1.500	NI
2	F	PT	33	870	NI
3	F	PT	40	1.800	NI
4	M	T	NI	NI	NI
5	F	PT	42	1.950	NI
6	M	T	45	2.070	30,5
7	F	T	45,5	2.060	30,5
8	M	T	47	2.040	30
9	M	T	44	2.000	NI

M – Masculino; F – Feminino; PT – Pré-termo; T – Termo; NI – Não Informado

O déficit de crescimento intrauterino encontrado em todos os pacientes estudados está de acordo com os dados da literatura (German, 1969).

German (1969) sugere que a restrição de crescimento intra-útero pode ser decorrente de um crescimento celular lento e/ou apoptose celular, comuns a SB devido à instabilidade cromossômica. Posteriormente, Kaneko (1999) sugeriu que esse mecanismo celular pode ser decorrente de expressão anormal da proteína p53. Entretanto os mecanismos que levam a característica de deficiência de crescimento pré e pós-natal ainda não são claros.

4.1.2 Quadro clínico dos pacientes estudados

Ao primeiro exame todos os nove pacientes apresentaram peso e estatura abaixo do percentil 5 (<p5).

Em todos os nove pacientes estudados foram encontrados: fácies típico com microcefalia, nariz proeminente e hipoplasia malar.

O eritema esteve presente em 8/9 pacientes e, incluía: eritema malar em seis pacientes (6/8), eritema nasal em três pacientes (3/8), eritema na região torácica em dois pacientes (2/8) e, eritema axilar em um paciente (1/8).

As manchas *café-au-lait* foram detectadas em 7/9 pacientes e distribuídas em: membros superiores e inferiores, tronco, dorso e abdômen.

As manchas hipocrômicas também foram observadas em 6/9 pacientes.

Um paciente (1/9) apresentou agenesia unilateral da fíbula, encurtamento da tíbia e agenesia do 5° artelho, associado à hipoplasia renal (Figura 8). Na literatura não há outro caso descrito com as alterações esqueléticas observadas em nosso paciente. As malformações congênitas são freqüentemente observadas nos pacientes portadores da SB e de acordo com McGowan et al. (2009), não seguem um padrão.

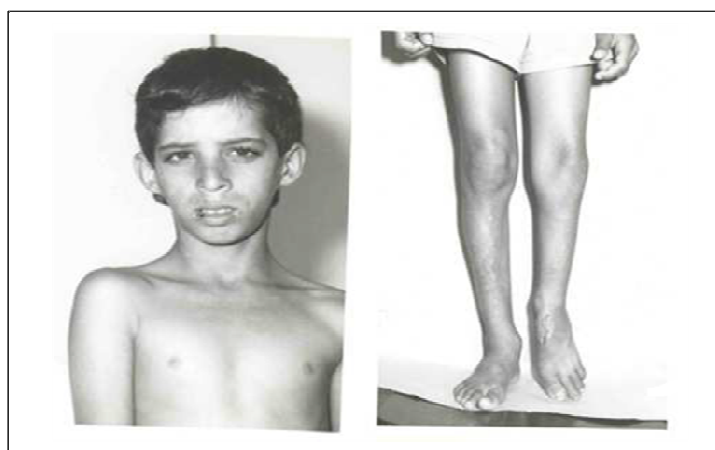


Figura 8– Foto do paciente 4 aos 11 anos de idade e uma foto sua demonstrando agenesia unilateral de fíbula, encurtamento de tíbia e agenesia de 5° artelho.

Em três pacientes (3/9), foi observada clinodactilia de 5° quirodáctilo.

Não foram encontrados defeitos cardíacos em nenhum dos pacientes estudados.

As principais características clínicas dos nove pacientes estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2 – Principais alterações clínicas observadas nos nove pacientes avaliados

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	PACIENTES									N/TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Idade ao diagnóstico	10a4m	3a	5a6m	11a	1a1m	1a2m	2a2m	3a6m	3a3m	-
DCPN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9/9
Microcefalia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9/9
Fácies típico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9/9
Eritema										8/9
▪ Malar	+	+	-	-	+	+	+	NI	+	6/8
M. Cal	+	+	+	-	+	+	+	NI	+	7/9
M. Hipo	+	+	+	+	-	-	+	NI	+	6/9
Outros achados										5/9
▪ DC	-	-	-	-	-	-	-	NI	-	0/5
▪ AR	-	-	-	+	-	-	-	NI	-	1/5
▪ AE	-	-	-	+	-	-	-	NI	-	1/5

DCPN – Déficit de crescimento pós-natal; M. cal – Manchas *café-au-lait*; M. Hipo – Manchas hipocrômicas; DC – Defeitos cardíacos; AR – Alterações renais; AE – Alterações esqueléticas; NI – Não informado

Os nossos achados corroboram com as principais características clínicas observadas nos portadores da SB descritas pela literatura (German, 1969, German e Takebe, 1989).

As infecções de repetição foram relatadas em 8/9 pacientes desse estudo, sendo principalmente pneumonia, diarreia e otite (tabela 3). A deficiência de imunoglobulinas (tabela 4) foi observada em 7/9 pacientes, principalmente: deficiência de IgG (1/7), de IgA (2/7), IgM (3/7) e HGG (3/7).

Tabela 3 - Infecções de repetição observadas nos nove pacientes estudados

INFECCÕES DE REPETIÇÃO	PACIENTES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pneumonia	+	+	+	+	-	-	-	NI	+
Bronquite	-	+	+	-	-	-	-	NI	-
Broncopneumonia	-	-	-	-	+	+	-	NI	-
Bronquiectasia	+	-	-	-	-	-	-	NI	-
Sinusite	-	-	+	-	-	-	-	NI	-
Diarréia	+	-	+	-	+	-	+	NI	+
Otite média	+	-	+	-	-	-	+	NI	-
Piodermite	+	-	-	-	-	-	-	NI	-
ITU	-	-	-	-	-	+	-	NI	-

ITU – infecção do trato urinário; NI – não informado

Tabela 4 – Deficiência de imunoglobulinas observadas nos nove pacientes estudados

IMUNOGLOBULINAS	PACIENTES									N/TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IgA	-	-	-	-	-	-	-	NI	+	1/7
IgE	-	+	-	+	-	-	-	NI	-	2/7
IgG	+	-	-	-	-	-	-	NI	-	1/7
IgM	-	+	+	-	-	-	-	NI	+	3/7
HGG	-	-	-	-	+	+	-	NI	+	3/7

NI – Não informado; HGG - Hipogamaglobulinemia

Na literatura, as infecções de repetição, principalmente do trato respiratório superior e do sistema gastrointestinal estão associadas à redução dos níveis de imunoglobulinas plasmáticas de IgA, IgE, IgG e IgM (Sack et al., 1998). A causa de tais alterações imunológicas é atribuída aos mecanismos que levam à diminuição da proliferação celular (observada nas culturas celulares dos afetadas), afetando principalmente a imunidade humoral (McGowan et al., 2009).

4.1.3 Desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM)

Todos apresentaram DNPM adequado, porém 7/9 pacientes relataram déficit de atenção, de memória, dificuldade de leitura e aprendizado.

Em geral, os pacientes com SB apresentam inteligência normal, porém, o déficit cognitivo pôde ser observado (German, 1969; Sanz e German, 2006).

4.1.4 Evolução clínica

O tempo de seguimento dos oito pacientes variou de 2a10m a 17a5m (média de 7anos). Um paciente não retornou ao segmento.

Duas pacientes (1 e 7) apresentaram tumor de Wilms (TW), uma aos 3a6m e a outra aos 3a11m (Figura 9). Ambas receberam tratamento cirúrgico com quimioterapia e radioterapia. Houve recidiva em uma paciente, e esta faleceu aos cinco anos. A outra paciente recebeu cinco anos de quimioterapia, evoluiu bem e atualmente está com 20 anos.



Figura 9– Fotos das pacientes 7 e 1 aos 2 anos e 20 anos, respectivamente

Na literatura, 42% dos pacientes desenvolvem pelo menos uma neoplasia maligna entre 2 e 49 anos, com idade média de surgimento de 24a 7m e destes, cerca de 10% desenvolvem mais de um tipo de câncer ao longo de sua vida. Na primeira década de vida, embora mais raros, são descritos tumores sólidos, tais como osteosarcoma e TW. Linfoma e leucemias são mais observados nas primeiras duas décadas de vida, e após a segunda década, carcinomas são mais comuns (Ma et al., 2001). Após a terceira e quarta década o desenvolvimento de neoplasias é absoluto (Thomas et al., 2008).

Na literatura há apenas seis casos de SB associada ao TW (Cairney et al., 1987; Berger et al., 1996; German, 1997; Jain et al., 2001). Nesses pacientes a idade em que o tumor foi diagnosticado variou de 5 meses a 8 anos. Estes seis casos, somados as nossas duas pacientes, estimam que a frequência de TW em indivíduos portadores da SB não seja tão rara. Dessa forma sugerimos um rastreamento para tumores sólidos com exame de ultrassom a cada seis meses.

Esse aumento de neoplasias pode ocorrer devido à alta sensibilidade a agentes que danificam o DNA, tais como agentes mutagênicos e radiação ionizante. Essa sensibilidade advém de imperfeições nos mecanismos de reparo de DNA devido as mutações no gene *BLM*, cujo produto (BLM) é uma proteína de 1417 aminoácidos, pertencente ao grupo helicase RecQL que desempenha um importante papel na recombinação, replicação e reparo celular. Quando a BLM está alterada, ela perde sua função dando origem à instabilidade genômica, que se reflete em um aumento das taxas de mutações espontâneas em células somáticas (Ellis et al., 1995). Acredita-se que essa hipermutabilidade observada nas células dos portadores da SB leva ao aumento da possibilidade de afetar genes supressores de tumor em homozigose e/ou oncogenes e, conseqüentemente, aumentam a taxa de desenvolvimento de uma variedade de neoplasias em idade precoce. Tais neoplasias constituem a principal causa de óbito entre os afetados pela SB (Cairney et al., 1987; Sanz e German, 2006).

Os pacientes com SB que desenvolvem câncer, geralmente apresentam um prognóstico ruim, pois mesmo com o diagnóstico precoce de uma neoplasia,

difícilmente melhora a sobrevida, exceto entre os pacientes com tumores sólidos cirurgicamente operáveis.

A idade atual de nossos pacientes variou de 2a10m e 26a (média de 13 anos)

Um paciente, com boa evolução, faleceu aos 28 anos por acidente de trânsito.

Na literatura a sobrevida média dos pacientes é de 24,7 anos, a maioria morre por neoplasia e o caso mais velho descrito na literatura foi de 49 anos (German, 1987). Ainda não há relatos de pacientes que tenham sobrevivido com mais de 50 anos (Thomas et al., 2008). As infecções são a segunda maior causa de óbito entre os pacientes (German, 1989, Ma et al., 2001).

Os dados sobre a evolução clínica dos pacientes estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5 - Evolução clínica dos nove pacientes estudados

PACIENTES	EVOLUÇÃO				
	Idade ao diagnóstico	Número de consultas	Neoplasias (tipo e idade)	Idade no último atendimento	Tempo de segmento
1	10a4m	13	TW(3a6m)	20a2m	9a10m
2	3a	7	-	7a6m	3a9m
3	5a6m	29	-	23a5m	17a5m
4	11a	12	-	26a	NHS
5	1a1m	3	-	9a3m	8a2m
6	1a2m	2	-	4a5m	3a3m
7	2a2m	7	TW(3a11m)	Óbito c/5a	2a10m
8	3a6m	1	-	3a6m	NHS
9	3a3m	14	-	18a2m	4a1m

TW – Tumor de Wilms; NHS – Não houve segmento

4.2 Estudo citogenético

Para validação do teste citogenético foram utilizados dois controles negativos para a síndrome de Bloom que, por conveniência foram voluntários de nosso próprio laboratório. Seus resultados encontram-se na tabela 6. De acordo com German e

Alhadeff (2001) o valor de referência para positividade de frequência aumentada de TCI é $>10\text{TCI}/\text{metáfase}$.

Tabela 6 – Estudo citogenético do grupo controle baseado em 20 células analisadas

CONTROLES	CV		BG	CHG
	Nº de quebras espontâneas/metáfase	Bandamento G	Nº de quebras espontâneas/metáfase	Nº de TCI/metáfase
C1	0	46,XY	0	6,1
C2	0	46,XX	0	8,5

CV – Coloração convencional; CBG – Coloração bandamento G; CHG – Coloração Hoechst-Giemsa

Dos nove pacientes deste trabalho, seis possuíam estudo citogenético confirmado (cinco pelo laboratório Fleury e um pelo laboratório do Dr. James German nos EUA) (tabela 7). Entretanto, não foi possível estabelecer o número de quebras espontâneas devido à falta desta informação em seus prontuários.

Tabela 7 - Estudo citogenético de seis pacientes investigados para SB pelo laboratório Fleury

PACIENTE	CBG	CHG
		Nº DE TCI/METÁFASE
1	46,XX	49,6
4	46,XY	48,7
5	46,XX	59,4
6	46,XY	53,6
7	46,XX	48,5
8	NI	NI

CV – Coloração convencional; CBG – Coloração bandamento G; CHG – Coloração Hoechst-Giemsa; NI – Não informado

Três pacientes (paciente 2, 3 e 9) foram estudados no LIM36 pelas técnicas descritas na metodologia deste trabalho e seus resultados encontram-se resumidos na tabela 8.

Tabela 8 – Estudo citogenético em três pacientes investigados para SB no LIM36, baseado em 20 células analisadas para coloração convencional e bandamento G, e 10 células analisadas para TCI

PACIENTE	CV	Bandamento G	CBG	CHG
	Nº de quebras espontâneas/metáfase		Nº de quebras espontâneas/metáfase	Nº de TCI/metáfase
2	0.55	46,XX	0.25	45,2
3	0.8	46,XX	0.2	61,3
9	0.15	46,XY	0,1	46,5

CV – Coloração convencional; CBG – Coloração bandamento G; CHG – Coloração Hoechst-Giemsa

O caso 2 apresentou 11 alterações cromossômicas em análise sob coloração convencional, sendo principalmente, cromossomos dicêntricos e quebras cromatídicas (Figura 10). O cariótipo banda G foi normal para o sexo feminino, porém, com alterações em cinco células, sendo estas, fragmentos e quebras cromossômicas. A análise para TCI apresentou frequência aumentada, com média de 60,8 TCI/célula (Figura 11).

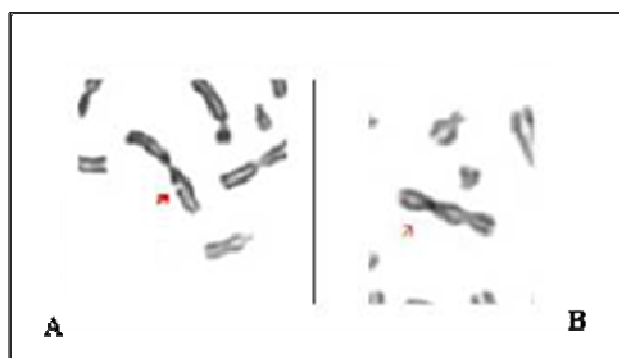


Figura 10 – Exemplo de análise convencional do paciente 2. (A) Quebra cromatídica e (B) Cromossomo dicêntrico

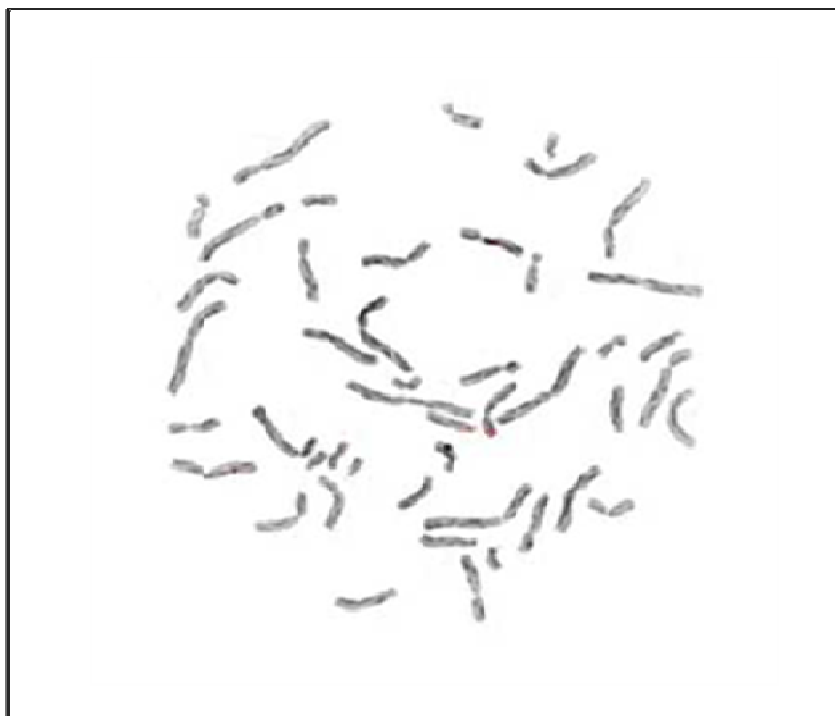


Figura 11– Exemplo de coloração diferencial de cromátides irmãs do paciente 2. A figura demonstra frequência aumentada para a análise de trocas entre cromátides irmãs

O caso 3 exibiu 16 alterações cromossômicas em análise sob coloração convencional, sendo que, as principais foram lacunas cromatídicas e fragmentos (Figura 12). O cariótipo banda G foi normal para o sexo feminino, porém com alterações em quatro células, sendo estas, translocações e cromossomos marcadores. A análise para TCI apresentou frequência aumentada, com média de 61,3 TCI/célula (Figura 13).



Figura 12- Exemplo de análise convencional do paciente 3. (A) Quebra cromossômica e (B) Quebra cromatídica



Figura 13- Exemplo de coloração diferencial de cromátides irmãs do paciente 3. A figura demonstra frequência aumentada para a análise de trocas entre cromátides irmãs

O caso 9 exibiu três alterações cromossômicas em análise sob coloração convencional, sendo que, as principais foram lacunas e quebras cromatídicas (Figura 14). O cariótipo banda G foi normal para o sexo masculino, porém com alterações em duas células, sendo quebras cromatídicas. A análise para TCI apresentou frequência aumentada, com média de 46,5 TCI/célula (Figura 15).

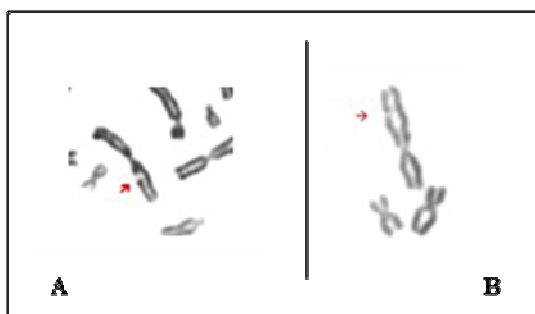


Figura 14 - Exemplo de análise convencional do paciente 9. (A) Quebra cromossômica e (B) Quebra cromatídica

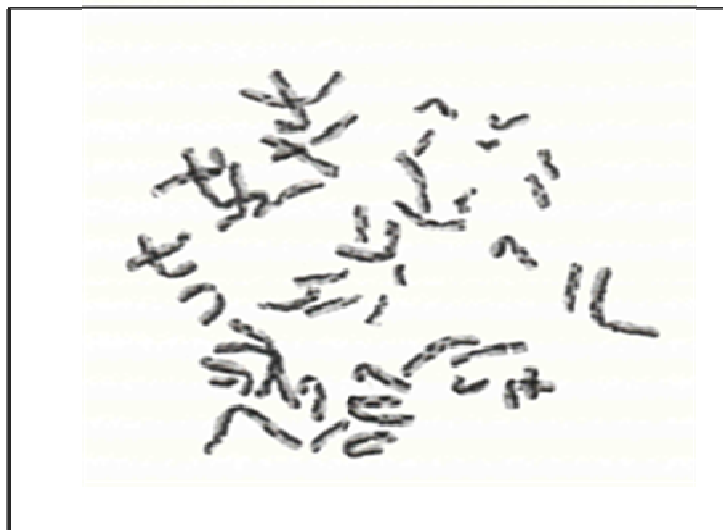


Figura 15 - Exemplo de coloração diferencial de cromátides irmãs do paciente 9. A figura demonstra frequência aumentada para a análise de trocas entre cromátides irmãs

Nossos métodos citogenéticos confirmaram o diagnóstico de SB nos três casos analisados e, portanto, confirmando o sucesso da técnica. Entretanto, este trabalho apresentou algumas dificuldades durante sua implantação. Inicialmente houve dificuldade no cultivo celular devido ao não crescimento, fazendo-se necessário repetir o procedimento por várias vezes. Embora a literatura descreva que os pacientes com SB apresentam baixo índice mitótico em suas culturas celulares (Shiriaishi et al., 1983), verificamos que o problema estava na variação de temperatura da estufa utilizada, e não nas amostras dos pacientes, sugerindo que esse seja um dos fatores cruciais para a realização adequada do teste.

Outra dificuldade foi à obtenção de coloração diferencial adequada. Neste caso, o padrão de coloração ideal para uma análise inequívoca foi alcançado com a utilização de uma lâmpada UV nova. Portanto a vigência da validade destes dispositivos também se mostrou determinante para o sucesso do teste.

A normatização da leitura do teste foi realizada utilizando testes controles, sendo esse outro passo decisivo para a realização de um teste confiável.

Foi observado ainda que, para detecção de quebras cromossômicas espontâneas, principalmente os *gaps*, é ideal que sejam analisadas metafases em coloração convencional. Pois, o bandamento G, devido à degradação de algumas

estruturas cromossômicas e o surgimento de bandas claras e escuras, pode esconder esse tipo de alteração. Esse fato é observado pela comparação entre as quebras cromossômicas observadas nas técnicas de coloração convencional e bandamento G. A coloração convencional demonstrou quantidade de quebras superior às observadas no bandamento G, sendo que, os valores podem estar suprimidos devido aos artefatos da técnica.

Pacientes com SB apresentam instabilidade cromossômica em suas células somáticas. Os achados citogenéticos característicos e exclusivos permitem a confirmação no diagnóstico. German (1965) descreveu a alta frequência de alterações cromossômicas na SB, sendo estas de dois tipos. No primeiro, as quebras levam a fragmentos ou a translocações recíprocas entre cromossomos não homólogos. A segunda característica é exclusiva da SB e consiste na tendência à trocas entre segmentos homólogos, que se expressa em um aumento da frequência de TCI (12 vezes mais frequentes que em pessoas normais).

Recentemente foi descrito, em células tumorais, um fenômeno de instabilidade genômica chamado *chromotripsis*. Trata-se da ocorrência uma explosão cromossômica com subsequente reunião de todos os segmentos quebrados. Entretanto, na tentativa de manter a estabilidade celular, um efetivo mecanismo de reparo poderia ser ineficiente para o rearranjo efetivo das partes quebradas levando a formação de rearranjos complexos. Ou seja, trata-se de um único evento em uma única célula que leva a uma catástrofe cromossômica gerando células cancerígenas. Esse mesmo mecanismo também é sugerido para a formação de rearranjos complexos observados em diferentes doenças genéticas (Liu et al., 2011).

Na SB, observamos diferentes tipos de rearranjos e instabilidades cromossômicas em diferentes células de um mesmo paciente. Podemos então sugerir, que além de um defeito nos mecanismos de reparo, estes pacientes são mais suscetíveis a sofrerem eventos de *chromotripsis*, sendo essa uma das hipóteses que poderia explicar a exacerbada instabilidade e a predisposição aumentada para o desenvolvimento de neoplasias nesses indivíduos. Contudo, novos estudos serão necessários para elucidação de tal questão.

A análise citogenética é considerada padrão ouro para a confirmação da SB, uma vez que o custo dos métodos moleculares de detecção é ainda elevado. A realização do estudo citogenético para SB possibilitou a implantação desta metodologia no serviço de citogenética do LIM36, permitindo confirmar o diagnóstico clínico dos pacientes portadores da SB.

4.3 Herança

A consanguinidade entre os pais dos afetados foi presente em 4/8 famílias, sendo que, em sete famílias os casos foram esporádicos e apenas uma família apresentou outro filho afetado. Na literatura, German et al. (1977), encontraram uma taxa de 21% de consanguinidade em 31/145 famílias. A SB é uma doença autossômica recessiva, cujo risco de recorrência é de 25% para futuras gestações, dessa forma, o aconselhamento genético e planejamento familiar justificam todo empenho na confirmação do diagnóstico.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

- O diagnóstico da SB deve ser feito precocemente baseado na avaliação clínica: deficiência de crescimento pré e pós-natal, microcefalia, fácies típico e eritema telangiectásico.
- O estudo citogenético convencional é melhor do que o bandamento G para a detecção de quebras cromossômicas espontâneas, porém, insuficiente para a confirmação diagnóstica da SB.
- A pesquisa de TCI é fundamental para a confirmação diagnóstica, sendo um método de baixo custo e fácil implantação.
- Os pacientes devem ser acompanhados com rastreamento de neoplasias em idade precoce.

Anexos

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/10/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0474/08**, intitulado: **"ASPECTOS CLÍNICOS E CITOGENÉTICOS DA SÍNDROME DE BLOOM"** apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Chong Ae Kim**

Pesquisador (a) Executante: **Marília Borges Moreira**

CAPPesq, 09 de Outubro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Anexo B – Artigos relacionados a este projeto

Foram submetidos dois artigos relacionados a este projeto, e as questões dos revisores já foram respondidas. Os artigos aguardam aceite.

- 1) Wilms tumor in two brazilian patients with Bloom's syndrome: the proposal of a clinical surveillance approach for solid tumors (Familial Cancer).

- 2) Hereditary Sclerosing Poikiloderma: case report of a familial case, review of the literature and diagnostic criteria update (Pediatric Dermatology).

Wilms tumor in two brazilian patients with Bloom's syndrome: the proposal of a clinical surveillance approach for solid tumors.

Moreira MB, Quaió CRDC, Zandoná-Teixeira AC, Novo-Filho GM, Gomes I, Yamamoto GL, Bertola DR, Kulikowski LD, Kim CA.

Abstract

Bloom's syndrome (BS) is a rare autosomal recessive chromosomal instability disorder caused by mutations in the *BLM* gene, which increase risk of developing neoplasias, especially lymphomas and leukemias, at an early age. Here, we report two patients diagnosed with BS developed Wilms tumors (WT) before four years of age and had discrepant outcomes: while one had a fatal outcome, the other has remained disease-free after 17 years of follow-up. The frequency of WT in individuals with BS is considerable and, when summed with the frequencies of other solid tumors, brings the overall frequency of solid tumors in BS patients to approximately 12%. Therefore, we suggest that ultrasound be performed as a regular method of surveillance for the early detection of solid tumors in individuals with BS, as this measurement may have clinical benefits.

Keywords: sister chromatid exchange, chromosomal instability, Bloom syndrome, cancer risk, Wilms tumor

Introduction

Bloom's syndrome (BS – OMIN #210900) [1] is a rare autosomal recessive chromosomal instability [2] disorder caused by mutations in the *BLM* gene, which encodes a product necessary for the maintenance of genomic stability [3]. The prominent physical features associated with BS include severe growth deficiency (pre- and postnatal), sun-sensitive facial erythema, immunological deficiency and a remarkably increased risk of developing neoplasias at a young age, which is the main cause of death among affected individuals [4,5]. The cancer predisposition is secondary to spontaneous chromosome breakage and homologous recombination

events that lead to spontaneous mutations in tumor suppressor genes and/or oncogenes in somatic cells [6].

Among the 265 BS cases reported in the International Register of Bloom syndrome (which includes 222 families), 122 developed some type of neoplasia during their lives; leukemias, lymphomas and carcinomas were common, but several other cancers have been reported [4,5].

Wilms tumor (WT), which is the most common pediatric solid cancer, with an estimated frequency of 1:10,000 in children below the age of 15 years, was once considered a rare event among patients with BS [7]. Nevertheless, six patients with BS who developed this tumor have already been described in the literature [8-11].

The objective of this manuscript is to describe two new unrelated patients diagnosed with BS who developed WTs and to propose new preventive measurements for the detection of solid tumors in individuals with BS.

Case report

Case 1

A 10-year-old female patient, the product of the third gestation of a non-consanguineous, non-Jewish family, was born at the 36th week of a gestation marked by severe intrauterine growth restriction. After resolving the clinical complications of her extreme low birth weight (BW: 1,500 g), she was discharged home, but despite presenting normal cognitive development during the first year of life, a remarkable, refractory failure to thrive was noted. Recurrent diarrhea and upper and lower respiratory tract infections started by the age of one year, requiring prophylactic antibiotics. A Wilms tumor was diagnosed in her left kidney after evaluating an abdominal mass by the age of 3.5 years. She underwent surgical removal of the mass and, thereafter, neoadjuvant chemotherapy (unknown regimen).

The first genetic evaluation occurred at the age of ten, when a physical examination revealed facial features characteristic of Bloom syndrome (elongated face, prominent nose, prominent ears, malar hypoplasia, and thin upper vermilion), microcephaly, nose telangiectasias, and hypomelanotic macules in her upper limbs and clinodactyly

of the bilateral 5th fingers. Her anthropometric measurements were all below the 5th percentile (W: 15.9 kg; H: 116 cm; OFC: 46 cm; CDC Growth charts, National Center for Health Statistics, USA), and she had developed learning disabilities.

A cytogenetic test was performed to detect an increased frequency of sister chromatid exchanges (SCE) using bromodeoxyuridine (BrdU) in lymphocyte cultures, the results of which demonstrated an increased frequency with an average of 48.5 SCE per cell (Fig 1). The G-band karyotype was normal (46,XX).

The patient had a good response to the oncological treatment and has remained disease-free for the last 17 years. Currently, at the age of 21, all of her anthropometric measurements continue to be below the standards for the normal population (H: 140 cm; W: 26.4 kg; OFC: 47 cm).

Case 2

A two-year-old female patient was born to non-Jewish 1st-degree cousins. The gestation was marked by intrauterine growth restriction. Vaginal delivery occurred at term with no complications. The neonate had a low birth weight (BW: 2060), microcephaly (OFC: 30.5 cm) and a normal length (45.5 cm). Physical examination at the age of two revealed short stature (78 cm), low weight (8.1 kg), microcephaly (OFC: 45 cm), facial features characteristic of Bloom syndrome (long, narrow face, telangiectatic erythema involving the nose, malar and oral regions, prominent nose, retrognathia), café-au-lait macules throughout the body, diffuse hypomelanotic macules, and bilateral 5th-finger clinodactyly. Recurrent upper respiratory tract infections were common, but she had not experienced any serious infection nor required prophylactic antibiotic use.

A stage II Wilms tumor was diagnosed at the age of four years after the evaluation of a sudden-onset abdominal mass. Surgical removal, neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy were not sufficient to control the neoplasia. The tumor recurred after 8 months, and the patient died from clinical complications.

A cytogenetic test was performed to detect an increased frequency of sister chromatid exchanges using bromodeoxyuridine (BrdU) in lymphocyte cultures, the

results of which demonstrated an increased frequency with an average of 49.5 SCE per cell (Fig 2). The G-band karyotype was normal (46, XX).

Discussion

We described two patients affected by Bloom syndrome who developed Wilms tumors at young ages. These two cases along with the other 6 described in the literature (Tab 1) [8-11] bring the estimated frequency of Wilms tumor in individuals with Bloom syndrome to at least 3%, a 300-fold increase in the risk relative to that of the general pediatric population.

Bloom syndrome is caused by mutations on the *BLM* gene, whose product is a 1417-amino acid protein that belongs to the RecQL helicase group and plays important roles in replication, recombination and cellular repair. When BLM is altered, it loses its function, giving rise to genomic instability and an increased rate of spontaneous mutations in somatic cells [3]. Cytogenetic analyses of cases 1 and 2 have demonstrated an increase in the frequency of exchange between sister chromatids, which is pathognomonic of BS and confirmed the diagnosis of BS [12]. It is believed that the hypermutability and the hyperrecombinability of the somatic cells leads to an increased chance of affecting tumor suppressor genes in homozygosity and/or oncogenes and, consequently, increases the rate of development of a wide variety of neoplasms at an early age; such neoplasm are the main cause of death among patients with BS [8,5].

WT has been previously reported in six cases of in BS in the literature [8-11]. The age at which WT was diagnosed ranged from 5 months to 8 years. Two of these cases were diagnosed at early stages (stages I and II) and had apparently been cured by nephrectomy and chemotherapy.

In our study, both patients developed a WT before four years of age, but despite both of them undergoing surgical removal of the mass and chemotherapy, the treatment results were different: whereas the patient described in Case 2 (stage II WT) had a fatal outcome after the recurrence of the disease, the patient described in Case 1 has remained disease-free after 17 years of follow-up. It is remarkable that all reported

cases of WT in BS patients in the literature and the two cases described herein occurred in patients less than eight years old.

The frequency of WT in BS patients is, thus, considerable, and clinicians' awareness of this fact should be increased, especially because this occurrence of WT in BS patients was once presumed to be rare. This frequency summed with the frequencies of other solid tumors in BS patients brings the overall frequency of solid tumors to approximately 12% [5]. Unfortunately, insufficient attention is given to this group of tumors in BS patients.

Beckwith-Wiedemann syndrome is a prototype genetic disease with an increased risk of the development of early-onset solid cancers, mainly Wilms tumor and hepatoblastoma, with a total estimated lifelong risk for solid tumors of 7.5% [13]. This increased risk has prompted specialists to seriously consider solid tumor surveillance, as thus surveillance has been demonstrated to reduce treatment-related morbidity. Renal ultrasonography is currently the optimal surveillance modality because it is accessible and non-invasive and has minor risks [14]. However, this method may have unfavorable consequences because false positive results may lead to unnecessary investigations and surgical procedures.

Although evidence does not show benefits for screening for leukemia in BS patients because early treatment does not improve clinical outcomes, the surveillance for solid tumors may have significant advantages and improve survival [9,10].

Additionally, the frequency of solid tumors in BS patients is approximately the same as that in Beckwith-Wiedemann patients, and a screening program has been demonstrated feasible in the latter. Thus, we suggest that ultrasound be performed as a regular method of surveillance for the early detection of solid tumors in individuals with BS, as the early detection of these tumors may have clinical benefits. The frequency of this type of screening must be individualized, but the performance of an ultrasound examination at least every six months is advisable based on the vast experience with Beckwith-Wiedemann syndrome reported in the literature.

References

1. Bloom D (1954) Congenital Telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs. *Amer J Dis Child* 88:754-758.
2. German J (1969) Bloom's syndrome I. Genetical and clinical observations in the first twenty-seven patients. *Am J Genet* 21:196-227.
3. Ellis NA et al (1995) The Bloom syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83:655-66.
4. German J (1993) Bloom syndrome: A medelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine* 72:393-406.
5. Sanz MM, German J (2006 [2010]). Bloom's syndrome. In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Information Resource (database online)* Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2011. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [2011].
6. Payne M, Hickson ID (2009) Genomic instability and cancer: lessons from analysis of Bloom's syndrome. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 3):553-9.
7. Jeffrey S Coopes MJ (2002) Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr* 14(1):5-11.
8. Cairney AEL et al (1987) Wilms tumor in three patients with Bloom syndrome. *J Pediatr* 111(3):414-6.
9. Berger C et al (1996) Tumeur de Wilms et syndrome de Bloom. *Arch Pédiatr* 3:802-805.
10. German J (1997) Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 93:100-106.
11. Jain D et al (2001) Bloom syndrome in sibs: First reports of hepatocellular carcinoma and Wilms tumor with documented anaplasia and nephrogenic rests. *Pediatr Dev Pathol* 4(6):585-9.
12. Chaganti RSK et al (1974) A manyfold increase in sister chromosome exchanges in Bloom syndrome lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 71:4508.

13. Shuman C, Beckwith JB, Smith AC, Weksberg R (2000 [2010]). Beckwith-Wiedemann syndrome. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Information Resource (database online) Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2011. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [2011].
14. Tan TY, Amor DJ (2006) Tumor surveillance in Beckwith-Wiedemann syndrome and hemihyperplasia: A critical review of the evidence and suggested guidelines for local practice. *Journal of Paediatrics and Child Health* 42:486-490. German J (1992).

Acknowledgments

The authors thank the patients, their families, as well as CAPES for financial support.

Figure Legends

Fig. 1 Demonstration of increased sister chromatid exchange frequency of patient 1.

Fig. 2 Demonstration of increased sister chromatid exchange frequency of patient 2.

Table Legends

Table 1 Patients affected by Bloom syndrome associated with Wilm's tumor

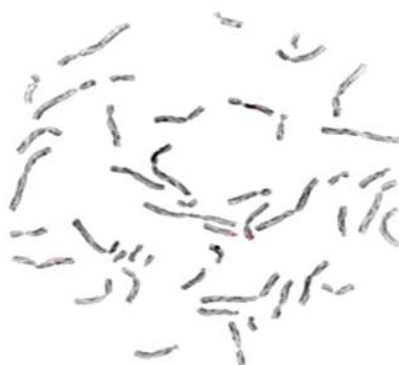


Fig. 1 Demonstration of increased sister chromatid exchange frequency of patient 1.



Fig. 2 Demonstration of increased sister chromatid exchange frequency of patient 2.

Table 1 Patients affected by Bloom syndrome associated with Wilm's tumor

	Ashkenazi	Consanguinity	Age at diagnose of WT	References
1	No	No	3.5y	Our patient
2	No	Yes	4y	Our patient
3	Yes	No	8y	[8]
4	No	No	5m	[8]
5	No	No	22m	[8]
6	No	No	4y	[9]
7	Not mentioned	Not mentioned	3y	[10]
8	No	No	3.5y	[11]

WT, Wilms tumor; y, years; m, months

Hereditary Sclerosing Poikiloderma: case report of a familial case, review of the literature and diagnostic criteria update

Quaio CRDC, Carvalho EDF; Cavalcante C; **Moreira MB**; Zandona-Teixeira AC; Sotto MN, Kim CA, Bertola DR.

Abstract

Hereditary Sclerosing Poikiloderma is a rare autosomal dominant condition associated with poikiloderma, calcifications of subcutaneous tissues and other peculiar findings. Our objective is to describe two affected individuals from the same family, to highlight the importance of this condition as a differential diagnosis of poikilodermatous diseases and to propose an updated version of the diagnostic criteria. Our proband presented generalized poikiloderma, restriction of several joints, short stature, calcifications on subcutaneous tissues and intracranial calcifications. Chromosomal breakage studies and rheumatologic investigation yielded normal results. The patient's mother presented milder involvement. The etiology of HSP is still a matter of debate and other causes of poikiloderma must be ruled out, especially cases with chromosomal breakage abnormalities and increased risk of neoplasia. Therefore, we propose new diagnostic criteria that also involve the presence of a positive familial history and normal chromosomal breakage studies.

Keywords: poikiloderma, hereditary, diagnosis, calcification

Introduction

It has been more than 40 years since Weary et al.[1] described a new syndrome characterized by generalized poikiloderma, sclerosis of the distal limbs and late-onset subcutaneous calcifications. These features, coupled with the presence of linear hyperkeratosis and sclerotic bands in areas of flexure (axillae, antecubital and popliteal fossae) and clubbing of the fingers form the five main characteristics, were originally established to define Hereditary Sclerosing Poikiloderma (HSP). Less than 20 cases have been described since the original publication[1-4]. The pathophysiological mechanism of this condition remains unknown, although a

genetic basis is suggested by the presence of a vertical inheritance in pedigree studies.

The scope of this article is to describe two new affected individuals from the same family, to highlight the importance of this condition as a differential diagnosis of poikilodermatous diseases and to propose an updated version of the diagnostic criteria that includes cytogenomic techniques that facilitate differential diagnosis.

Case report

A 15-year-old male patient with unremarkable perinatal history and normal cognitive development was referred for the investigation of postnatal short stature, joint restrictions and congenital skin abnormalities. He developed progressive arthralgias and restrictions of multiple joints by the age of five, requiring colchicine, naproxene and muscle relaxants to control the pain.

Physical examination at the age of 15 revealed short stature (146.5 cm; Z-score: -2.9, LMS Parameters for Boys: Height for Age, NHANES, CDC/National Center for Health Statistics); joint restrictions of the shoulders, elbows, hands, wrists, pelvis and feet associated with mild distal muscle atrophy, sparse hair, eyebrows and eyelashes, bulbous nose and an elevated nasal bridge. The major skin changes included generalized alternating areas of hypopigmentation, normal color and hyperpigmentation; mild, diffuse xeroderma; plantar hyperkeratosis; onychodystrophy on the toes; verrucous-like lesions on the left elbow and right knee and linear hyperkeratotic, sclerotic bands in antecubital and popliteal areas (Figure I). The patient's neck was large, and his body habitus was narrow. We did not find the involvement of neither the oral mucosa nor the nails.

Full-body X-ray revealed the calcification of soft tissues (especially involving the bursa) surrounding the elbows and knees, subluxation of the head of the femur, mild scoliosis, shortening of the clavicles, slight degeneration of the sacro-iliac joint and flexion deformities of the fingers and toes.

Brain CT scan showed calcifications of the pineal gland and the periventricular regions. The results from echocardiography, G-band karyotype, rheumatological

investigation (including ANA, complement and inflammatory markers), calcium metabolism (parathyroid hormone, alkaline phosphatase, LDH, vitamin D) and ophthalmological evaluation were normal. Chromosomal breakage analysis with improved cytogenetic methods in chromosome preparations using diepoxybutane plus analysis with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) followed by specific dye to visualize differentiation between sister chromatids were both normal.

Skin biopsies revealed dermal calcinosis with transepithelial extrusion on the knee and focal spongiosis, dyskeratosis and pigmentary spreading.

His familial history was noteworthy for the presence of the affected mother, whose first symptoms were milder and appeared in early infancy. She had a previous history of 2 abortions and a daughter who had died some days after birth. Upon examination at age 39, short stature (149 cm), minimal involvement of the tegument and mild joint restrictions of the hands were observed. X-ray revealed calcifications involving the patellar ligament and the tendon of the left quadriceps. There are no known other affected individuals in the family (Figure II).

Discussion

We present two familial cases diagnosed with Hereditary Sclerosing Poikiloderma, a rare cause of poikiloderma. The etiology of HSP is still a matter of debate. Weary et al. have suggested autosomal dominant inheritance with incomplete penetrance and phenotypic heterogeneity in the original description of this genodermatosis[1]. The vertical transmission in this family reinforces a dominant pattern of inheritance, but the absence of a father-son case in the literature does not rule out the possibility of an X-linked inheritance. Four other families have been described in the literature, and their main clinical characteristics are summarized in Table I [1-4].

The lack of cardiac involvement in our family and some patients in the literature probably represents a variable expressivity of this characteristic, often found in vertical transmission traits, though we will keep a close surveillance of this family once the heart involvement may develop within the following years. Interestingly, calcifications in areas other than the subcutaneous tissue have been reported, especially those involving the cardiac valves. We found intracranial calcifications in

our proband, although his echocardiogram did not show any calcification. Calcifications involving tissues other than the skin may indicate that mechanisms enrolled in the processes of inflammation and calcification may also play a role in the etiology of HSP. Low-grade tissue inflammation, altered homeostasis of inorganic solutes, genetic deficiencies of calcification inhibitors, altered differentiation of resident cells and several interleukins and mediators (such as TNF-alpha, IL-1-beta, factor XIIIa) are important factors that may contribute to the development of calcification in several tissues [5].

There are other important genetic syndromes coursing with poikiloderma that should be considered in the differential diagnosis [6]. Khumalo et al. (2006) recently described several members of a South African family presenting a unique syndrome comprising poikiloderma, tendon contractures and progressive, potentially lethal pulmonary fibrosis [7]. Although we find some common characteristics between HSP and Khumalo's poikiloderma, the latter has an important involvement of the lung and does not present calcifications of soft tissues, contrary to what is found in HSP. Therefore, we believe that it is premature that both entities represent different spectrums of the same disorder. The cases of other two siblings who were originally considered diagnosed with hereditary sclerosing poikiloderma were latter regarded as having characteristics compatible with mandibuloacral dysplasia, an autosomal recessive disorder characterized by growth retardation, craniofacial anomalies with mandibular hypoplasia, skeletal abnormalities and poikiloderma [8].

Moreover, some genetic syndromes that cause poikiloderma are associated with chromosomal instability and DNA-repair impairment [6], such as Fanconi anemia (usually accompanied by short stature, upper limb malformations, pancytopenia and multiple malformations involving the eyes, kidneys and urinary tract, ear, heart, gastrointestinal system, oral cavity and central nervous system), Bloom's syndrome (pre- and postnatal growth retardation accompanied, recurrent infections, chronic pulmonary disease, diabetes mellitus and learning disabilities are common), Rothmund-Thompson (short stature, sparse scalp hair, eyelashes and eyebrows, juvenile cataracts, skeletal abnormalities, radial ray defects, premature aging), xeroderma pigmentosum (severe sunburn after minimal sun exposure), dyskeratosis

congenita, Cockayne syndrome (dwarfism, mental retardation, pigmentary retinopathy, blindness and conduction hearing loss), among others.

Several of these syndromes cited above are accompanied by a considerably increased risk for the development of neoplasias. Most of these syndromes have autosomal recessive inheritance, except for HSP and dyskeratosis congenita. The latter may present with an autosomal dominant, an autosomal recessive or X-linked recessive forms, but it differentiates from HSP by the presence of the involvement of the mouth, the bone marrow and the nails and does not present soft tissue calcifications. Thus, the pedigree analysis is an important issue to be addressed when approaching the differential diagnosis of poikiloderma, once few genetic causes of poikiloderma have a vertical transmission. Therefore, the vertical inheritance pattern is a key feature that differentiates HSP from almost all other genetic causes of poikiloderma. Considering the diagnostic methods for chromosomal breakage studies and the need to rule out genetic disorders with underlying chromosomal instability and an increased risk for the development of neoplasia, we strongly recommend that DNA instability studies be considered prior to establishing the diagnosis of HSP. Furthermore, for the condition to be effectively treated, ruling out clinical conditions that may cause subcutaneous calcifications is also important, including rheumatologic conditions (scleroderma, dermatomyositis); neoplasms (such as osteosarcoma); inflammatory conditions (phlebitis, calcification of hematomas, heterotopic calcifications); infections (cysticercosis); systemic diseases (hyperparathyroidism, sarcoidosis, renal failure, gout, hyperparathyroidism, diabetes), among others).

Therefore, we propose additional settings for the diagnosis of HSP, as follows: Major criteria: 1) First-degree relative affected with HSP (i.e.: vertical transmission); 2) Poikiloderma; 3) Subcutaneous tissue calcifications. Minor criteria: 1) Calcifications in other tissues (including intracranial and cardiac valves); 2) Sclerosis of the distal limbs, including multiple joint restrictions and camptodactyly. Exclusion criteria: 1) Abnormal chromosomal breakage studies with diepoxybutane and/or 5-bromo-2-deoxyuridine; 2) Concomitant diagnosis with another clinical cause of soft tissue calcifications.

With these new diagnostic criteria, the definite diagnosis would be established by the presence of two major criteria with the absence of the exclusion criteria or one major criterion and two minor criteria and the absence of the exclusion criteria. A possible diagnosis might be considered in the presence of two minor criteria and the absence of the exclusion criteria.

Although this new criteria lack a statistical background, mainly because the rarity of HSP makes difficult any statistical validations, we tried to include some steps that we judge necessary before establishing the diagnosis of HSP, such as studying DNA stability (to rule out Fanconi and Bloom) and ruling out other clinical causes of soft tissue calcifications. Additionally, the original diagnostic criteria do not consider some of the most important and specific features of HSP (such as the vertical inheritance), is very permissive (the characteristics are common in several other conditions) and was not based on data either.

With this proposed approach, all of the cases published in the literature would fulfill the definite diagnostic criteria, except for one case published by Fazio and colleagues in 1995 [3]: this particular case presented only with poikiloderma and some non-specific findings that are not typical of HSP.

No specific treatment is known for HSP. Supportive care, especially for pain relief, the use sunscreen for photoprotection, a multidisciplinary approach (including dermatologists, psychologists, rheumatologists, geneticists, orthopedic surgeons, cardiologists) and rehabilitation may be necessary.

In conclusion, we presented two related cases diagnosed with HSP and proposed new diagnostic criteria that considers some of the most specific features that accompanies this condition. Until the molecular basis of HSP is understood, this new approach is important for a clear delineation of this entity and for the differentiation of other conditions presenting with poikiloderma or soft tissues calcifications, especially for those that may demand specific management and constant surveillance for malignancy.

	Weary, 1969 ¹ and Greer, 1978 ²								Fazio, 1995 ³	Salvat, 1999 ⁴	Present study	
	Family 1				Family 2				Family 3	Family 4	Family 5	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9*	P10	P11	P12
Gender	F	F	F	F	M	M	F	M	F	F	M	F
Age	28	21	19	14	12	4	4	8	10	57	17	41
Skin tone	Dark	Dark	Dark	Dark	Dark	Dark	Dark	?	Light	?	Dark	Medium
Age of initial symptoms	Child	Child	Child	?	?	4	2	2	?	4	8m	?
Familial aggregation	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
Poikiloderma	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Linear hyperkeratosis		*			*	*	*	*	*	*	*	
Sclerosis of palms and soles	*	*			*	*	*	*		*	*	
Clubbing of the fingers	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
Calcinosis of the tissues	*						*	*			*	*
Articular restrictions of fingers/toes			*		*		*				*	*
Other articular restrictions			*		*		*			*	*	*
Atrophy of the skin (elbows or knees)	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	
Cardiac findings	*	*	*	*	*	*	*	*		*		
Raynaud phenomenon / Vasculitis				*	*	*	*	*	*	*		
Duodenal findings	*											
Retrognathia / Micrognathia							*	*			*	

Table I. Hereditary Sclerosing Poikiloderma: review of the literature.

*DQ's father had clubbing of the fingers with no other findings

References

- 1- Weary PE, Hsu YT, Richardson DR, Caravati CM, Wood BT. Hereditary sclerosing poikiloderma: report of two families with an unusual and distinctive genodermatosis. Arch Derm. 1969;100:413-422.
- 2- Grau Salvat C, Pont V, Cors JR, Aliaga A. Hereditary sclerosing poikiloderma of Weary: report of a new case. Brit J Derm. 1999;140:358-377.
- 3- Fazio M, Lisi S, Amantea A, Maini A, Menaguale G, Sacerdoti G, Balus L. Poikilodermi sclerosante hereditaire de Weary. Ann Derm Venereol. 1995;122:618-620.
- 4- Greer KE, Weary PE, Nagy R, Robinow M. Hereditary sclerosing poikiloderma. Int J Dermatol. 1978 May;17(4):316-22.
- 5- Rutsch F, Terkeltaub R. Parallels between arterial and cartilage calcification: what understanding artery calcification can teach us about chondrocalcinosis. Curr Opin Rheumatol. 2003;15:302-10.
- 6- Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. Orphanet J Rare Dis. 2010 Jan 29;5:2.

7- Khumalo NP, Pillay K, Beighton P, Wainwright H, Walker B, Saxe N, Mayosi BM, Bateman ED. Poikiloderma, tendon contracture and pulmonary fibrosis: a new autosomal dominant syndrome? *Br J Dermatol.* 2006;155:1057-61.

8- Fryburg JS, Sidhu-Malik N. Long-term follow-up of cutaneous changes in siblings with mandibuloacral dysplasia who were originally considered to have hereditary sclerosing poikiloderma. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33:900-2.

Figure Legends

Figure I. Picture depicts the major clinical Manifestations of Hereditary Sclerosing Poikiloderma in the proband (column A) and his mother (column B). Observe the prominent retrognathia (A1), joint restrictions of the hands (A2) and poikiloderma (A3) in the proband and a milder involvement in his mother (B1, B2 and B3, respectively). Observe the calcification of the patellar tendons (white arrows in A4.1 and B4.1), soft tissues of the elbow (A4.2), and pelvis (B4.2) and the joint restrictions of the hands (A4.3 and B4.3). The biopsies from the proband (A5.1 and A5.2; hematoxylin and eosin, $\times 200$ original magnification) exhibit epidermis with hyperkeratosis and hypergranulosis; papillary dermis displays deposits of basophilic material (calcium deposits) and transepidermal elimination of calcium deposits may also be observed.

Figure II. The pedigree of the family: the black arrow shows the proband.



Figure I. Picture depicts the major clinical Manifestations of Hereditary Sclerosing Poikiloderma in the proband (column A) and his mother (column B). Observe the prominent retrognathia (A1), joint restrictions of the hands (A2) and poikiloderma (A3) in the proband and a milder involvement in his mother (B1, B2 and B3, respectively). Observe the calcification of the patellar tendons (white arrows in A4.1 and B4.1), soft tissues of the elbow (A4.2), and pelvis (B4.2) and the joint restrictions of the hands (A4.3 and B4.3). The biopsies from the proband (A5.1 and A5.2; hematoxylin and eosin, x200 original magnification) exhibit epidermis with hyperkeratosis and hypergranulosis; papillary dermis displays deposits of basophilic material (calcium deposits) and transepidermal elimination of calcium deposits may also be observed.

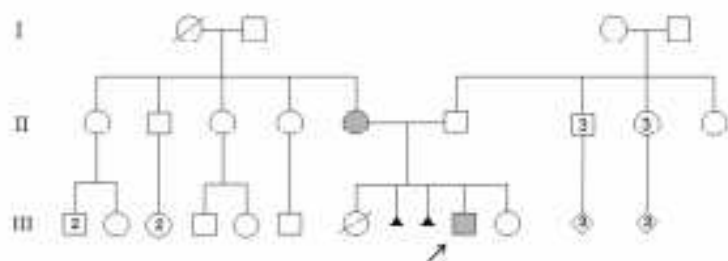


Figure II. The pedigree of the family: the black arrow shows the proband.

Referências

7 REFERÊNCIAS

Alter BP, Kupfer G. (2002 [2011]). Fanconi Anemia. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Information Resource (database online) Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2011. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [2011].

Amor-Guéret, M. Bloom's syndrome. Orphanet Encyclopedia. 2004. <http://www.orpha.net/data/patho/gb/uk-Bloomsyndrome.pdf>. Bhisitkul RB, Rizen M. Bloom syndrome: multiple retinopathies in a chromosome breakage disorder. *Br J Ophthalmol*. 2004;88:354-357.

Andresen SL, Kuo K, Savukoski D, Brodsky MH, Sekelsky J. Three structure-selective endonucleases are essential in the absence of BLM helicase in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2011;7(10):e1002315.

Aslan D, Ezgu FS. The gene of Bloom's syndrome: An autosomal recessive disorder with male dominance. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2009;13(4):1-2.

Berger C et al. Tumeur de Wilms et syndrome de Bloom. *Arch Pédiatr*. 1996; 3:802-805.

Bloom D. Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs. *Amer J Dis Child*. 1954;88:754-758.

Bloom's syndrome. *Biochem Soc Trans*. 2009;37:553-559.

Cairney AEL et al. Wilms tumor in three patients with Bloom syndrome. *J Pediatr*. 1987;111(3):414-6.

Chaganti RSK, Schonberg S, German J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc Nat Acad Sci*. 1974;71(11):508-4512.

Deckbar D, Jeggo PA, Lobrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;46(4):271-283.

Ellis NA, Ciocchi S, Proytcheva M, Lennon D, Groden J, German J. The Ashkenazic Jewish Bloom syndrome mutation *blmash* is present in non-Jewish Americans of Spanish ancestry. *Am J Hum Genet*. 1998;63:1685-1693.

Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocchi S, Proytcheva M, German J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ Helicases. *Cell*. 1995;83:655-666.

Ellis NA, Proytcheva M, Sanz MM, Ye TZ, German J. Transfection of *BLM* into cultured Bloom syndrome cells reduces the sister-chromatid exchange rate toward normal. *Am J Hum Genet*. 1999;65:1368-1374.

German J, Archibald R, Bloom D. Chromosomal breakage in a rare and probably genetically determined syndrome of man. *Science*. 1965;148:506-507.

German J, Roe AM, Leppert MF, Ellis NA. Bloom syndrome: An analysis of consanguineous families assigns the locus mutated to chromosome band 15q26.1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6669-6673.

German J, Bloom D, Passarge E, Fried K, Goodman RM, Katzenellenbogen I, Laron Z, Legun C, Levin S, Wahrman J. Bloom's syndrome. VI. The disorder in Israel and an estimation of the gene frequency in the Ashkenazim. *Am J Hum Genet*. 1977;553-562.

German J, Crippa LP, Bloom D. Bloom's syndrome. III. Analysis of the chromosome aberration characteristic of this disorder. *Chromosoma*. 1974;48:361-366.

German J, Takebe H. Bloom's syndrome. XIV. The disorder in Japan. 1989;35:93-110.

German J, Ellis NA, Proytcheva M. Bloom's syndrome. XIX. Cytogenetic and population evidence for genetic heterogeneity. *Clin Genet*. 1996;49:223-231.

German J, Alhadeff B. Analysis of sister chromatid exchanges. 2001. Disponível em: <http://www.currentprotocols.com/protocol/hg0806>.

German J, Sanz MM, Ciocci S, Ye TZ, Elli NA. Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's syndrome registry. *Human Mutation*. 2007;28(8):743-753.

German J. Bloom's Syndrome. I. Genetical and Clinical Observations in the first twenty-seven patients. *Am J Hum Genet*. 1969;21:196-227.

German J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;93:100-106.

German J. Prevalence of Bloom syndrome heterozigotes among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*. 1999;64:1241-1243.

Gretzula JC, Hevia O, Weber MD. Bloom's syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17:479-488.

Guo R, Rigolet P, Ren H, Zhang B, Zhang B, Dou S, Wang P, Amor-Gueret M, Xi XG. Structural and functional analyses of disease-causing missense mutations in Bloom syndrome protein. *Nucleic Acids Research*. 2007;35:6297-6310.

Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mut Res*. 2003;103-115.

Horta HL, Guimarães FF, Rocha, LOS, Guimarães RES, Valadares ER. Carcinoma de células escamosas da hipofaringe em mulher jovem com anemia de Fanconi. *Bras Otorrinolaringol*. 2006;72(6):845-8.

Jain D et al (2001) Bloom syndrome in sibs: First reports of hepatocellular carcinoma and Wilms tumor with documented anaplasia and nephrogenic rests. *Pediatr Dev Pathol* 4(6):585-9.

Kaneko H, Matsui T, Fukao KK, Morimoto W, Kondo N. Expression of the BLM gene in human haematopoietic cells. *Clin Exp Immunol*. 1999; 118:285-289.

Kastan M. Clinical Implications of basic research. Ataxia-Telangiectasia: Broad implications for a rare disorder. *The New England Journal of Medicine*. 1995;333(10):662-3.

Kraemer KH, DiGiovanna JJ. (2003 [2011]). Xeroderma Pigmentosum. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Information Resource (database online) Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2011. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [2011].

Kuhn EM, Therman E. Cytogenetics of Bloom's syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986;22:1-18.

Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2010;5:2. Disponível em <http://www.ojrd.com/content/5/1/2>.

Li L, Eng C, Desnick RJ, German J, Ellis NA. Carrier frequency of the Bloom syndrome *blm*^{Ash} mutation in the ashkenazi jewish population. *Molecular genetics and Metabolism.* 1998;(64):286-290.

Liu P, Erez A, Nagamani SCS, Dhar SU, Kolodziejska KE et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell.* 2011;(146)889-903.

Liu Y, West SC. More complexity to the Bloom's syndrome complex. *Genes Dev.* 2008;22:2737-42.

Ma B, Corry J, Rischin D, Leong T, Peters LJ. Combined modality treatment for locally advanced squamous-cell carcinoma of the oropharynx in a woman with Bloom's syndrome: A case report and review of the literature. *Annals of oncology.* 2001;12:1015-1017.

Martin SA, Hewish M, Lord CJ, Ashworth A. Genomic instability and the selection of treatments for cancer. *J Pathol.* 2010;220:281-289.

McGowan J, Maize J, Cook J. Lupus-like histopathology in Bloom syndrome: Reexamining the clinical and histologic implications of photosensitivity. *Am J Dermatopathol.* 2009;31:786-791.

Mladenov E, Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of npn-homologous end joining pathways. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):61-72.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battios DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960;20:613-6. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIN>.

Mulcahy MT, French M. Pregnancy in Bloom's Syndrome. *Clinical Genetics.* 1981;19:156-158.

Norgauer J, Idzko M, Panther E, Hellstern O, Herouy Y. Xeroderma Pigmentosum. *European Journal of Dermatology.* 2003;13(1):4-9. Disponível em <http://www.jle.com/en/print/e-docs/00/01/88/37/article.phtml>.

Oshima J, Martin GM, Hisama FM. (2002 [2012]). Werner Syndrome. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Information Resource (database online) Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2011. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [2012].

Payne M, Hickson, ID. Genomic instability and câncer: lessons from analysis of malignancy in Bloom Syndrome. *Clinical Oncology.* 2009;20:375-379.

Perry P, Wolff S. New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature.* 1974;251(5471):158 -8.

Ray JH, German J. Sister chromatid exchange in chromosome breakage syndromes. 1984;553-577.

Resende ACB, Pereira LB, Melo BMF, Santos HH, Aguiar MJB. Você conhece esta síndrome? Síndrome de Bloom. *An Bras Dermatol.* 2007;82(3):363-365.

Sack SZ, Liu Y, German J, Green NS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is independent of the Bloom's syndrome DNA helicase. *Clin Exp Immunol.* 1998;112:248-254.

Sanz MM, German J. Bloom's syndrome. *National institutes of health.* 2006. Disponível em <http://www.geneclinics.org/>.

Seki M, Otsuki M, Ishii Y, Tada S, Enomoto T. RecQ family helicases in genome stability. *Cell Cycle.* 2008;7(16):2472-78.

Shaffer LG, Slovak, ML, Campbell LJ. International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. 1 ed. S. Karger Publishing; February 24, 2009. p 138.

Shiriaishi Y, Yosida TH, Sandberg AA. Analyses of bromodeoxyuridine-associated sister chromatid exchanges (SCEs) in Bloom syndrome based on cell fusion: Single and twin SCEs in endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci.* 1983;80:4369-4373.

Singh DK, Ahn B, Bohr VA. Roles of RECQ helicases in recombination based DNA repair, genomic stability and aging. *Biogerontology.* 2009; 10:235-252.

Tauchi H, Matsuura S, Kobayashi J, Sakamoto S, Komatsu K. Nijmegen breakage syndrome gene, *NBS1*, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene.* 2002; 21:8967-8980.

Thomas ERA, Shanley S, Walker L, Eeles R. Surveillance and treatment of syndrome protein to maintain genome stability. *Genes Dev.* 2008;22:2843-2855.

Wang LL, Gannavarapu A, Kozinetz CA, Levy ML, Lewis RA, Chintagumpala MM, Ruiz-Maldonado R, Contreras-Ruiz J, Cunniff C, Erickson RP, Lev D, Rogers M, Zackai EH, Plon SE. Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund-Thomson syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:669-674.

Wilson DM, Thompson LH. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation research.* 2007;616:11-23.

Wong BJB, Hashisaki GT. Treatment of Bloom syndrome patients: Guidelines and report of a case. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996; 114: 295-8.

Woodage T, Prasad M, Dixon JW, Selby RE, Romain DR, Columbano-Green LM, Graham D, Rogan PK, Seip JR, Smith A, Trent R. Bloom syndrome and maternal uniparental disomy for chromosome 15. *Am J Hum Genet.* 1994;55:74-80.

Wu L, Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature.* 2003;426:870-874.

Xu D, Guo R, Sobeck A, et al. RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Genes Dev.* 2008;22:2843-2855.