

U N I V E R S I D A D N A C I O N A L A U T O N O M A

D E M E X I C O

F A C U L T A D D E C I E N C I A S

"HETEROGENEIDAD GENETICA EN ANEMIA DE FANCONI"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

BERTHA MOLINA ALVAREZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Páginas
I.- RESUMEN .....	1
II.-ANTECEDENTES.....	2 - 10
III.OBJETIVO.....	10
IV.-HIPOTESIS.....	11
V.- MATERIAL Y METODOS.....	11 - 15
VI.-RESULTADOS.....	16 - 23
VII.DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	24 - 27
VIII.-REFERENCIAS.....	28 - 32

## RESUMEN

Con el objeto de investigar heterogeneidad genética en la variedad infantil de anemia de Fanconi (AF) se realizaron cultivos de linfocitos de pacientes con AF con plasma autólogo, con plasma de otros pacientes con AF y con plasma normal. Se sembraron además linfocitos de un sujeto normal con plasma autólogo y con plasma de cada uno de los pacientes AF. Para cada tipo de cultivo se cuantificó la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC.

Los linfocitos de pacientes con AF cultivados con plasma autólogo mostraron hipersensibilidad a la MMC y una disminución significativa de la frecuencia de aberraciones inducidas en los cultivos con plasma normal.

Sin embargo, en presencia del plasma de los otros pacientes la gran variabilidad en la respuesta de los linfocitos de los pacientes con AF a la MMC no permitió demostrar heterogeneidad genética. Esto pudiera deberse que a pesar de existir heterogeneidad genética la metodología empleada no pudiera evidenciarla o bien, a que nuestros pacientes correspondieran al mismo tipo de AF.

## I.- ANTECEDENTES.

### 1.- Aspectos clínicos.

La Anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva, descrito inicialmente por el Dr. Guido Fanconi en 1927, que en general se caracteriza por presentar pancitopenia, hiperpigmentación de la piel, retraso en el crecimiento, malformaciones esqueléticas principalmente de radio y pulgares, anomalías renales, genitales y oculares, así como diversos grados de retraso mental (1,2) (Fig.1).

En la mayoría de los casos de AF, la presencia y severidad de estas características clínicas son extremadamente variables. En primer lugar, la AF cursa con una disminución progresiva de las células de la médula ósea, llamada pancitopenia, desarrollada generalmente entre los 5 y 9 años de edad (3). Esta pancitopenia puede presentarse gradualmente, de tal manera que al inicio el paciente parece tener una anemia aislada semejante a una leucopenia o trombocitopenia. Así mismo, en la serie de células blancas existe una reducción del número de granulocitos que puede dar lugar a una linfocitosis. Las células rojas también presentan alteraciones tales como eritrocitos macrocíticos y con una vida media corta (4).

La sintomatología hematológica se presenta de los 17 meses a los 22 años de edad. Generalmente la hemoglobina fetal está incrementada y en algunos casos tiene un número reducido de eritrocitos y leucocitos, así como una disminución en los niveles de hexocinasa plaquetaria (2,3,4).

La hiperpigmentación de la piel es probablemente la característica clínica más consistente y aparece como una fina hipermelanosis generalizada, que se presenta antes que las manifestaciones hematológicas (5). En los pacientes AF, las pequeñas manchas oscuras se presentan más frecuentemente en el tronco, pero pueden involucrar la ingle, el cuello y las axilas.

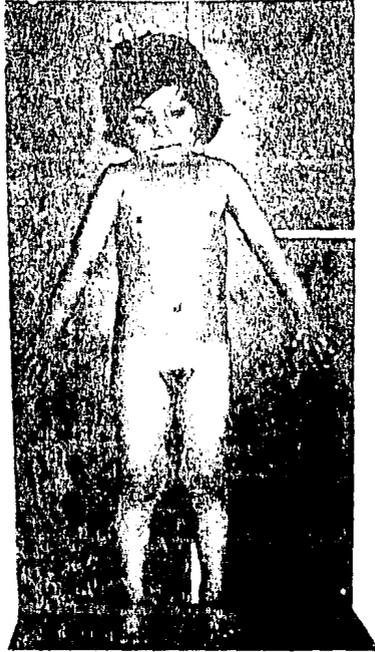


Fig.1 Talla baja e hiperpigmentación de la piel.

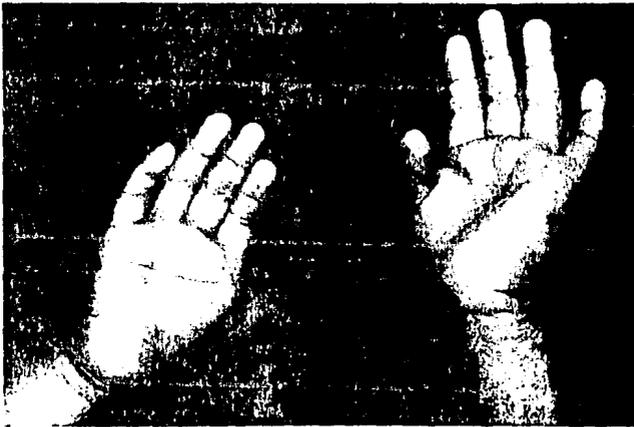


Fig.2 Alteraciones radiales y de pulgar.

Ocasionalmente se han encontrado anomalías oculares tales como microftalmia, ptosis, estrabismo y nistagmus.

Existen también anomalías esqueléticas, siendo las alteraciones de radio y pulgar las más importantes. Los pulgares pueden ser hipoplásicos, rudimentarios y ausentes y presentarse de forma uni ó bilateral. También se observa una hipoplasia o ausencia tanto del primer metacarpal como del radio, y aplanamiento del área tenar (3)(Fig.2).

Algunas otras características esqueléticas poco comunes en este síndrome son: sindactilia, dislocación congénita de cadera, torcimiento congénito de pies, deformación de escápula, osteoporosis y microcefalia (4).

Aproximadamente la tercera parte de los pacientes presentan malformaciones en el tracto urinario que consisten principalmente en hipoplasia y agenesia de riñón, ectopia, duplicación del sistema colector y riñón en forma de herradura (3,5). También existen algunas alteraciones en los genitales, en el hombre, el pene y los testículos pueden ser pequeños, con ó sin criptorquidea, mientras que en la mujer se ha observado hipoplasia de útero y vagina (4,6,7).

La mayoría de los pacientes AF tienen baja talla y peso desde el nacimiento, debido a un retraso en el crecimiento intrauterino y al lento crecimiento postnatal provocado por deficiencia de la hormona de crecimiento (5).

En general la inteligencia de estos pacientes es normal, sin embargo, aproximadamente el 20% de la población con AF puede presentar diferentes grados de retraso mental (7).

## 2.- Aspectos citogenéticos.

La anemia de Fanconi es un desorden que pertenece al grupo de Síndromes de Inestabilidad Cromosómica formado por el Síndrome de Bloom, Ataxia telangiectasia, Xeroderma pigmentosa y Disqueratosis congénita entre otras (8).

Citogenéticamente, la AF se caracteriza por presentar una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas y predisposición al desarrollo de leucemias y otras neoplasias (9,10,11). La naturaleza del defecto genético en células AF no se ha establecido claramente, sin embargo, existen algunas evidencias que sugieren que la alteración puede deberse a:

- a).- Defecto en la reparación del ADN, probablemente debido a deficiencias de enzimas como la ADN-ligasa ó la exonucleasa (12,13,14).
- b).- Deficiencia de enzimas de protección contra radicales libres generados por el metabolismo del oxígeno, como superóxido dismutasa o catalasa (15,16,17,18).
- c).- Alteración en el transporte a través de la envoltura nuclear de la topoisomerasa (19,20).

Por otra parte, se ha observado una elevada susceptibilidad de las células AF a algunos agentes mutagénicos: cuando los linfocitos de estos pacientes se exponen a agentes alquilantes como la Mitomicina C (MMC) ó el Diepoxibutano (DEB), se induce un aumento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas significativamente mayor que en las células normales (21,22).

## 3.- Mitomicina C (MMC).

La MMC es un antibiótico que fué aislado por primera vez de Streptomyces caespitosus en forma de cristales azul violeta, tiene un peso molecular de 334 daltones y es soluble en agua y solventes orgánicos (23).

Al igual que otros compuestos, la MMC se ha utilizado ampliamente como agente quimioterapéutico en el tratamiento de algunos carcinomas (corazón, intestino, colon y estómago) (24) y se ha establecido que es altamente mutagénico y clastogénico (10,23,25,26).

Químicamente, la MMC es un agente alquilante que contiene tres grupos potencialmente activos: la aziridina, el carbamato y la quinona:

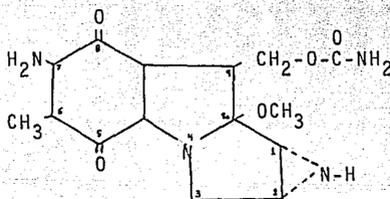


Fig.3 Estructura de la Mitomicina C.

Toda una serie de estudios han determinado que en una sola célula, el principal blanco de acción de la MMC es el Acido desoxirribonucleíco (ADN). En diversos tipos de ADN, la MMC induce la formación de uniones covalentes cruzadas intra e intercatenarias, que dependen directamente de la composición de bases. Así mismo, actúa como inhibidor de la síntesis de ADN en la fase S del ciclo celular (23,27).

La mayor parte de estos compuestos son poderosos agentes alquilantes únicamente cuando son activados. El mecanismo de acción por medio del cual la MMC interactúa con el ADN es el siguiente:

Inicialmente, la MMC se reduce a un radical semiquinona, en presencia de NADPH, que se une de forma no covalente al ADN. Posteriormente se reduce a hidroquinona, se pierde una molécula de metanol y se forma hidroquinona aziridinomitoseno altamente activa que es capaz de unirse al ADN covalentemente

En esta molécula, la aziridina queda como un anillo abierto en el carbono 1 y se pierde el sustituyente carbamoiloxi del carbono 10, debido a estas características, a la MMC se le de nomina agente alquilante bireductor. Estos dos grupos alqui - lantes altamente reactivos facilitan tanto la formación de uniones covalentes cruzadas como la alquilación de bases del ADN, principalmente en la posición 0<sup>6</sup> de la guanina, los cua - les de alguna manera alteran el metabolismo celular y muy pro - bablemente sean los causantes de las aberraciones cromosómi - cas (27), (Fig.4).

Existen también algunos mutágenos físicos tales como los rayos gamma ( $\gamma$ ) y muy probablemente altas dosis de luz ultra - violeta (UV), que causan un mayor daño en las células AF que en las normales (21,22).

En general, el diagnóstico de la enfermedad es en ocasió - nes difícil, debido a que presenta una gran diversidad fenotí - pica y la frecuencia de aberraciones espontáneas puede no ser lo suficientemente elevada para apoyarlo, por lo cual, diver - sos autores han utilizado el tratamiento con agentes alquilan - tes para detectar la enfermedad y dar asesoramiento genético (28,29,30,31) o bien para hacer diagnóstico prenatal (32,33).

### 3.- Heterogeneidad genética.

El análisis de la herencia de un padecimiento sería más sencillo, si un genotipo dado se expresara siempre de la mis - ma forma en todos los individuos. Sin embargo, los estudios clínicos de individuos afectados con algunas enfermedades han demostrado, muy a menudo, que lo que parece ser el mismo pade - cimiento es en realidad un grupo de individuos con diferentes mutaciones que pueden producir un cuadro clínico similar, lo cual significa que son genéticamente heterogéneos.

Así, la heterogeneidad ocurre cuando un fenotipo clínico o bioquímico particular puede ser producido por más de un ge - notipo. Tal heterogeneidad genética puede resultar de diferen

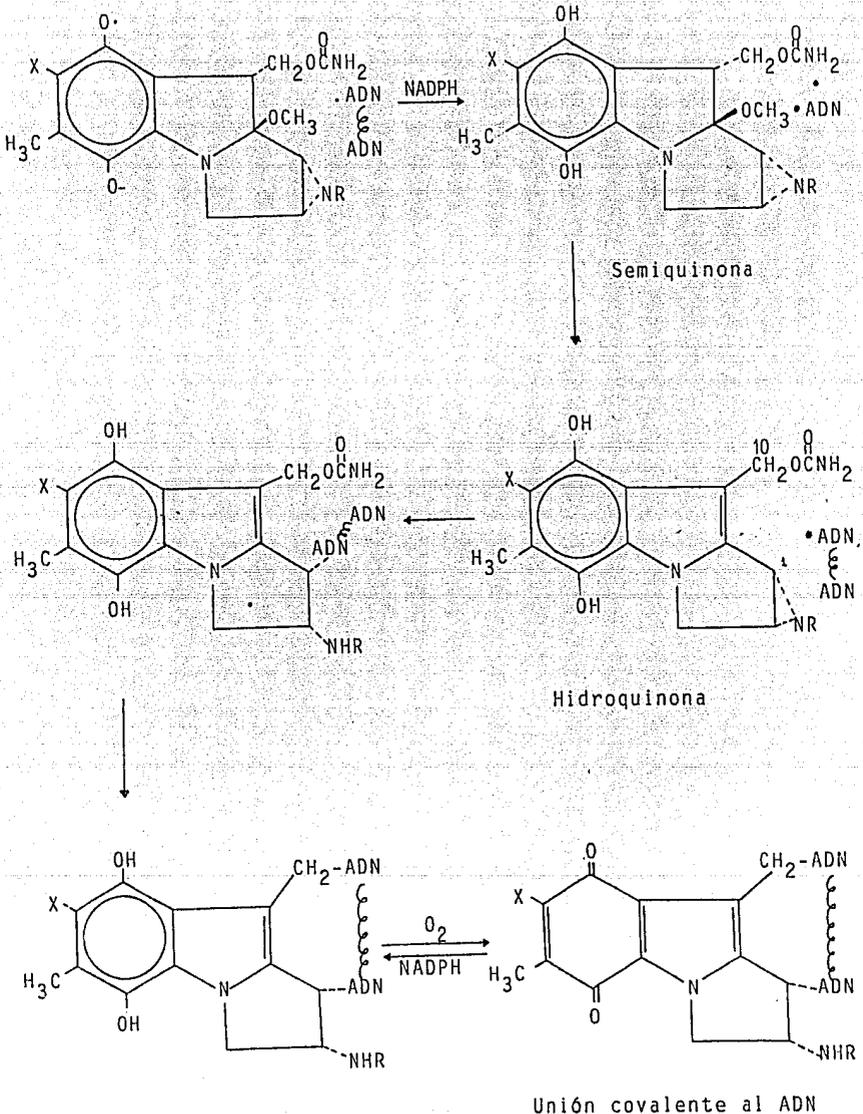


Fig.4 Mecanismo de acción de la MMC.

tes mutaciones en un sólo locus ó bien de alelos mutantes en loci diferentes. Por ejemplo, se han descrito más de 40 variantes inestables de la hemoglobina, cada una con diferente anomalía estructural en la cadena polipeptídica. Cada una de ellas es debida a una diferente mutación en el locus genético que codifica para las cadenas de la hemoglobina y el fenotipo clínico en todos los casos está caracterizado por la presencia de anemia hemolítica crónica (34,35):

Es muy importante identificar la heterogeneidad genética de un padecimiento, tanto para el diagnóstico clínico como para proporcionar un asesoramiento genético adecuado. Por ejemplo, en el caso de la sordera profunda congénita, que puede ser producida ya sea por genes autosómicos dominantes, autosómicos recesivos ó ligados al X, el riesgo de recurrencia de alteración en cada caso es muy diferente (36,37).

En los pacientes con anemia de Fanconi, se ha observado una gran variabilidad tanto clínica como a nivel de la respuesta al efecto clastogénico de la MMC (29,31), lo cual sugiere la existencia de heterogeneidad genética en este padecimiento.

La heterogeneidad genética se pone de manifiesto a través de los estudios de ligamiento, de los patrones de herencia, con la exploración clínica de los pacientes y muy recientemente, por medio de diferentes métodos a nivel celular y molecular.

Zawrzewski y Sperling en 1980 (38) utilizaron la técnica de hibridación celular: fusionaron células somáticas de dos pacientes con diferentes formas fenotípicas de AF y observaron complementación entre ellos, con lo cual demostraron por primera vez la existencia de heterogeneidad genética en esta entidad.

Por otra parte, Carnevale y Frias en 1985 (39), demostraron que tanto en cultivos AF con plasma normal como en cocultivos de células normales y AF no se observó una disminución

de las aberraciones cromosómicas espontáneas, sin embargo, su respuesta a la MMC fué significativamente menor que en los cultivos controles.

En estudios similares Nordenson y cols. (40), observaron disminución de las aberraciones espontáneas en fibroblastos AF cocultivados con células normales, mientras que Zakrzewski y Sperling (46) al igual que Carnevale y Frias (39) no encontraron efecto de complementación al analizar las aberraciones espontáneas, pero observaron una disminución significativa de la respuesta a la MMC en los cocultivos. En un experimento de hibridación celular entre fibroblastos AF y normales, Yoshida (41) obtuvo niveles normales de la frecuencia de aberraciones tanto espontáneas como inducidas en las células híbridas (41).

Con los resultados de estas investigaciones se ha propuesto que la evidente inestabilidad cromosómica de las células AF refleja claramente un defecto intrínseco y se ha sugerido la existencia en las células normales, de un factor difusible, capaz de corregir dicha inestabilidad y por lo tanto de realizar complementación. El efecto es más completo en las células híbridas mientras que en los cocultivos parece ser más evidente cuando se exponen las células a la acción de la MMC.

Este tipo de sistemas proporciona una metodología para estudiar la heterogeneidad genética que se ha sospechado por la variabilidad tanto clínica como de la respuesta a la acción de la MMC, que presentan las células de diferentes pacientes de AF (29,39).

Es importante señalar que de los métodos utilizados en estas investigaciones, tanto la hibridación celular como la cocultivación tienen el inconveniente de que si los pacientes que se pretenden estudiar son del mismo sexo y además sus cromosomas no muestran ningún polimorfismo característico, no se pueden las metafases de uno y del otro. Por consiguiente, la complementación de cultivos AF con plasma normal proporciona

un método sencillo para el estudio de la heterogeneidad genética en anemia de Fanconi.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, Frias y Carnevale (31) estudiaron a tres pacientes con AF, dos de ellos (hermanos) presentaban anomalías radiales pero debido a su corta edad aún no presentaban manifestaciones hematológicas y otro cursaba con pancitopenia y discretas alteraciones radiales. Al utilizar, en estos sujetos, la prueba de MMC, a una concentración de 80ng/ml de cultivo se observó una respuesta al mutágeno muy diferente: en los dos pacientes que eran hermanos, se encontró que sus células reaccionaban ante la MMC con un daño cromosómico de tal magnitud, que las aberraciones fueron incontables; mientras que el tercer niño presentó 5.2 aberraciones por célula en presencia de MMC, lo cual representa aproximadamente 10 veces el valor encontrado para las células normales. Esta variabilidad clínica y citogenética sugirió la existencia de heterogeneidad genética en estos pacientes.

En la actualidad, con las evidencias aportadas por este tipo de investigaciones citogenéticas así como las que se han realizado directamente sobre el ADN y el metabolismo celular, se han propuesto 3 mecanismos moleculares en esta enfermedad: un defecto en la reparación del ADN, una deficiencia de enzimas de protección contra radicales libres y una alteración en el transporte de la topoisomerasa (14,15,19). Por tanto, el determinar la existencia de heterogeneidad genética en anemia de Fanconi es relevante, porque, en un futuro, probablemente se pueda demostrar que diversos genotipos son capaces de producir un fenotipo similar mediante mecanismos moleculares diferentes.

## II.- OBJETIVO.

Demostrar si existe heterogeneidad genética en tres pacientes con anemia de Fanconi, cuyo cuadro clínico y susceptibilidad a la MMC es diferente.

.- HIPOTESIS.

Si los pacientes son formas diferentes de anemia de Fanconi, entonces se observará una disminución de las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC en las células de un paciente cultivadas en presencia de plasma de otro.

IV.- MATERIAL Y METODOS.

En el grupo de estudio se incluyeron tres pacientes con AF y un sujeto normal. La descripción clínica de los cuatro individuos es la siguiente:

Caso 1. Masculino de 4 años con talla baja, retraso psicomotor moderado, hipoplasia radial bilateral, ausencia del pulgar izquierdo e hipersensibilidad a la MMC (80ng/ml) con aberraciones cromosómicas incontables (Fig.5). Al momento del diagnóstico no presentaba anemia aplásica, sin embargo la desarrolló posteriormente.

Caso 2. Masculino de 6 años, hermano del caso 1, con talla baja, retraso psicomotor moderado, hipoplasia de pene, testículos pequeños retráctiles e hipersensibilidad a la MMC (80ng/ml) con aberraciones cromosómicas incontables. Al igual que el hermano desarrolló alteraciones hematológicas posteriormente al diagnóstico.

Caso 3. Masculino de 13 años con anemia aplásica desde los 6 años, talla baja, desarrollo psicomotor normal, discreta hipoplasia de pulgares y respuesta hipersensible a la MMC (80ng/ml) con un promedio de 5.2 aberraciones por célula (Fig.6).

El individuo sano era masculino de 9 años con autorización voluntaria para cooperar en el estudio.



Fig.5. La figura muestra una metafase del cultivo de linfocitos del paciente 1 con múltiples aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC.



Fig.6. En esta figura se observa una metafase del cultivo de linfocitos del paciente 3; las flechas indican las rupturas cromatídicas y las figuras radiales inducidas por la MMC.

1.- Separación de células y plasma.

De cad individuo, se obtuvo una muestra de 10 ml de san gre periférica en una jeringa heparinizada. Cada muestra se colocó en tubos de ensaye estériles y se centrifugaron a 400g durante 10 minutos; posteriormente, con pipetas estériles se separó el plasma y las células de cada muestra.

2.- Siembra de sangre completa.

Se prepararon cultivos de linfocitos en condiciones es tériles de la siguiente manera: en frascos tipo antibiótico de 60 ml, se agregaron 4.5 ml de medio McCoy's 5a. modificado, 0.25 ml de fitohemaglutinina, 0.02 ml de antibiótico (penici lina-estreptomicina), 0.4 ml de sangre heparinizada y 1 ml del plasma correspondiente. La adición del 20% de plasma au tólogo ó heterólogo en cada cultivo se realizó para observar si existía algún efecto de complementación en las células AF.

Para cada sujeto se sembraron 4 cultivos en los cuales la adición de plasma se realizó de la siguiente manera:

Paciente 1	1 cultivo con 1ml de plasma autólogo
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 2 (Pac.2)
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 3 (Pac.3)
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo (sano)
Paciente 2	1 cultivo con 1ml de plasma autólogo
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 1 (Pac.1)
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 3 (Pac.3)
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo (sano)
Paciente 3	1 cultivo con 1ml de plasma autólogo
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 1 (Pac.1)
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 2 (Pac.2)
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo (sano)
Sujeto sano	1 cultivo con 1ml de plasma autólogo
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 1 (Pac.1)
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 2 (Pac.2)
	1 cultivo con 1ml de plasma heterólogo 3 (Pac.3)

Todos los cultivos se sembraron por duplicado, se incubaron durante 72 horas a 37°C y se mantuvieron en presencia de 40ng de MMC/ml durante las últimas 24 horas de cultivo.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a cosechar los cultivos de acuerdo a la técnica de Moorhead y colaboradores (42). La cosecha de los linfocitos se inició al agregar a cada cultivo 0.2ml de colchicina a una concentración de 1mg/ml y se incubaron durante una hora a 37°C; posteriormente, se vaciaron los cultivos a tubos de ensaye para centrifugarlos a 400g durante 10 min., se desechó el sobrenadante y al paquete celular se le aplicó un tratamiento hipotónico con 5ml de KCl 0.075 M durante 10 min. a 37°C. En seguida, todos los cultivos se volvieron a centrifugar en las condiciones ya mencionadas; se desechó el sobrenadante y se agregaron a cada tubo 5ml de fijador (alcohol metílico: ácido acético 3:1). Se dejó actuar el fijador durante 10 min. y nuevamente se volvieron a centrifugar de la misma manera. Por último se realizaron varios cambios de fijador hasta que el sobrenadante quedó transparente y el paquete celular blanco.

Las preparaciones se hicieron por medio de goteo del paquete celular en portaobjetos limpios y sumergidos en agua fría y se fijaron con calor. Después se tiñeron con Wright al 50% y Giemsa al 5% durante 5 minutos respectivamente.

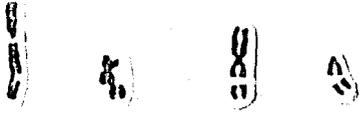
Todas las laminillas fueron codificadas por una persona ajena al estudio con el fin de realizar el análisis a ciegas.

Se analizaron 50 metafases por cada tipo de cultivo en un microscopio Carl-Zeiss y en cada célula se cuantificó el número de aberraciones cromosómicas agrupándolas en 4 categorías: fracturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos acéntricos y céntricos, anillos, cromosomas dicéntricos y por último figuras radiales (Fig.7).

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba de Steel Dwass (1968)(43) de intervalos para comparaciones múltiples y  $\chi^2$  de proporciones.

FRACTURAS

FRAGMENTOS



Cromatídicas

Cromosómicas



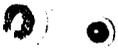
Céntricos



Acéntricos

FIGURAS

RADIALES



Anillos



Dicéntricos



Trirradios



Tetrradarios

Fig.7 Tipos de Aberraciones Cromosómicas

## V.- RESULTADOS.

Como se puede observar en el cuadro 1, los cultivos controles muestran una frecuencia de aberraciones cromosómicas de acuerdo a lo esperado: los casos 1, 2 y 3 presentaron 2.26, 4.38 y 2.64 de aberraciones por célula respectivamente, con 40ng de MMC por mililitro de cultivo y las células normales tuvieron una frecuencia de 0.16 con la misma concentración de MMC.

En cuanto a los cultivos que crecieron en presencia de plasma heterólogo, se observó lo siguiente:

Al adicionar plasma normal a las células de los pacientes, se encontró un efecto de complementación, como ya se había observado anteriormente (39), que se manifestó como una disminución de aberraciones cromosómicas estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en todos los casos (Cuadro 1).

En lo que se refiere a la adición de plasma AF heterólogo a las células AF, se observó una respuesta altamente variable: en el paciente 3 cuando se agregó el plasma de los pacientes 1 y 2, la disminución de aberraciones fue comparable a la observada con el plasma normal (Fig.8). En el paciente 2 no se encontró complementación ni con el plasma del caso 1 ni con el del 3 (Fig.9). En el paciente 1 no se modificó la frecuencia de aberraciones cuando se cultivó con plasma 3, pero mostró una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) de aberraciones en presencia del plasma de su hermano, (Fig.10). Esta última respuesta, no está de acuerdo a lo esperado, ya que los pacientes 1 y 2 son hermanos y por lo tanto los genes afectados son los mismos.

Es importante hacer notar que respecto al paciente 3, sus células son capaces de realizar complementación con otros plasmas pero su plasma no puede hacer complementación con otras células.

En la figura 11 se observa que las células normales no incrementaron significativamente su frecuencia de aberraciones cromosómicas con la adición de plasma del paciente 1 y 2, sin embargo con el plasma 3 sí se encontró un aumento significativo ( $\chi^2=9.01$ ,  $p<0.005$ ).

En general, en la tabla 1 donde se presentan los porcentajes de los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas con respecto al número total de aberraciones, se puede observar que en todos los casos la mayor parte de las aberraciones observadas correspondieron a fracturas; sin embargo, a excepción de los cultivos del sujeto sano, en todos los cultivos de células de AF (suplementados con plasma autólogo ó heterólogo) siempre se presentaron figuras radiales, lo cual era de esperarse ya que este rearrreglo cromosómico es una característica citogenética en la Anemia de Fanconi.

C U A D R O 1

P L A S M A

	* PACIENTE 1	* PACIENTE 2	PACIENTE 3	NORMAL
* PACIENTE 1	2.26	1.08	2.96	0.60
* PACIENTE 2	2.56	4.38	3.78	0.36
PACIENTE 3	0.92	0.66	2.64	1.02
NORMAL	0.24	0.38	0.68	0.16

\* PACIENTE 1 y 2 SON HERMANOS

C CONTROL

Cuadro 1. Los datos de este cuadro representan las frecuencias de aberraciones cromosómicas por célula en 50 metafases analizadas.

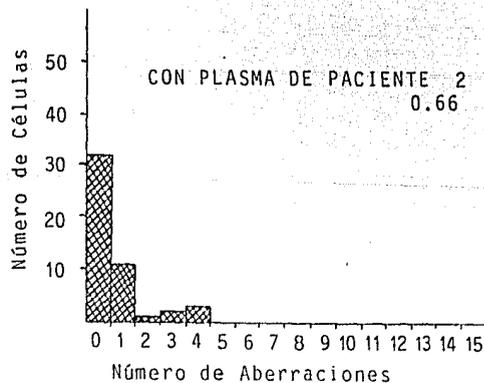
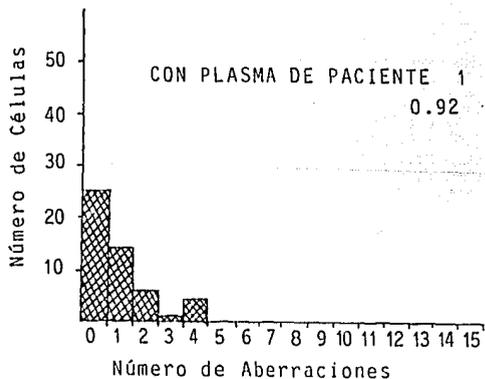
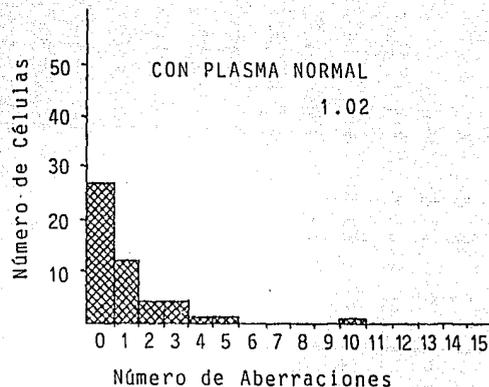
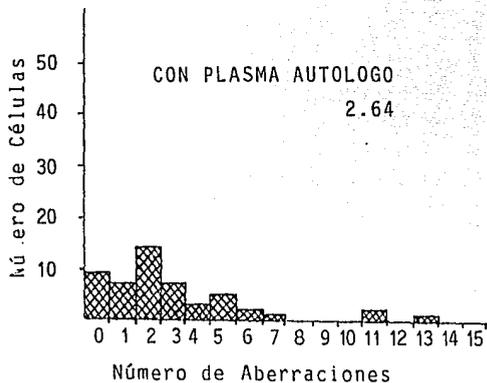


Fig.8. Las gráficas muestran la distribución de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC en los cultivos de linfocitos del paciente 3 suplementados con plasma autólogo normal y del paciente 1 y 2.

PACIENTE 2

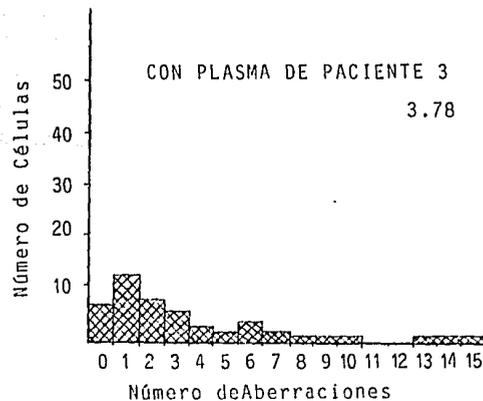
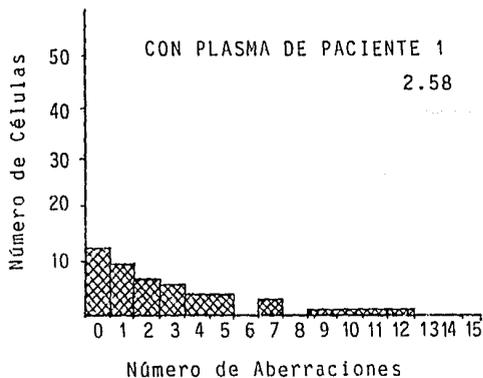
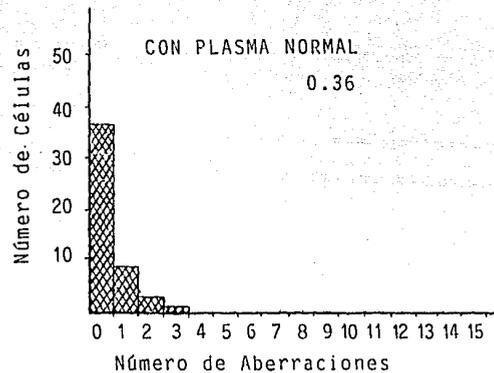
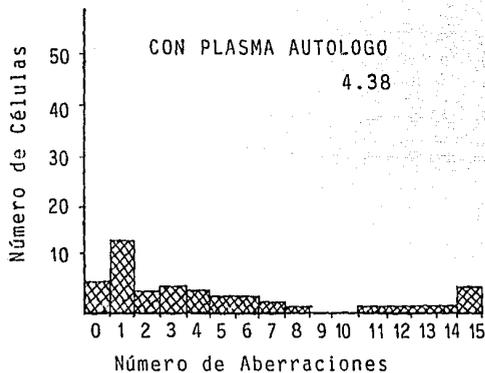


Fig.9. Las gráficas muestran la distribución de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC en los cultivos de linfocitos del paciente 2 suplementados con plasma autólogo normal y del paciente 1 y 3.

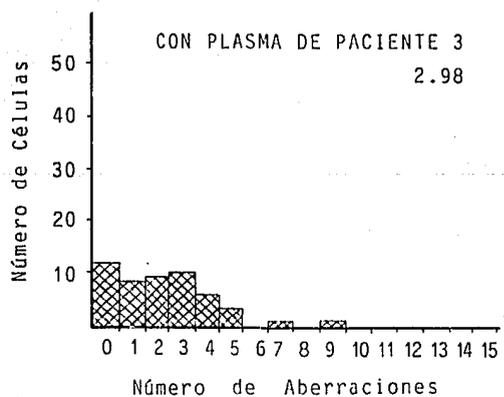
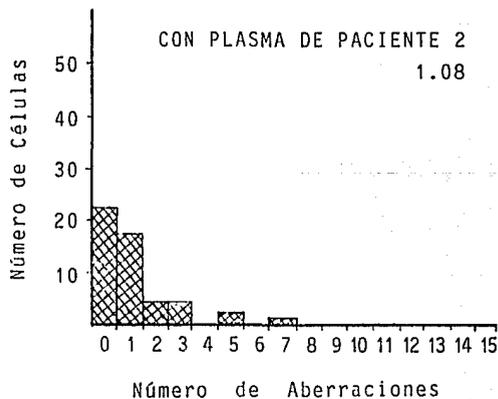
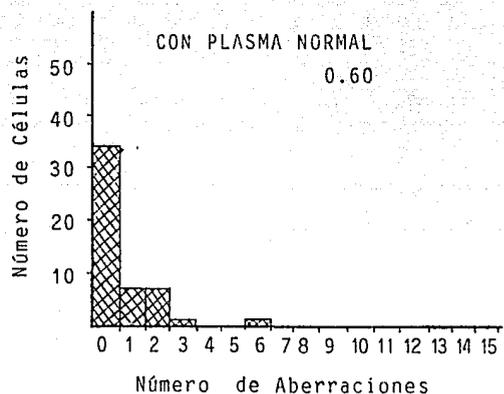
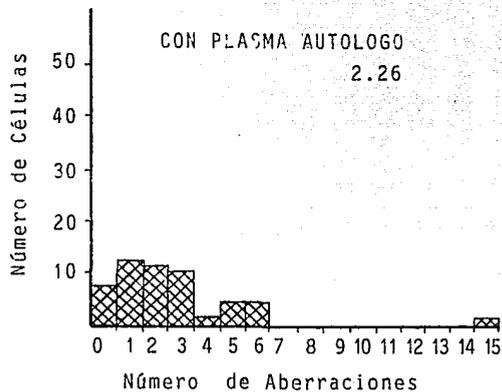


Fig. 10. Las gráficas muestran la distribución de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC en los cultivos de linfocitos del paciente 1 suplementados con plasma autólogo, normal y del paciente 2 y 3.

N O R M A L

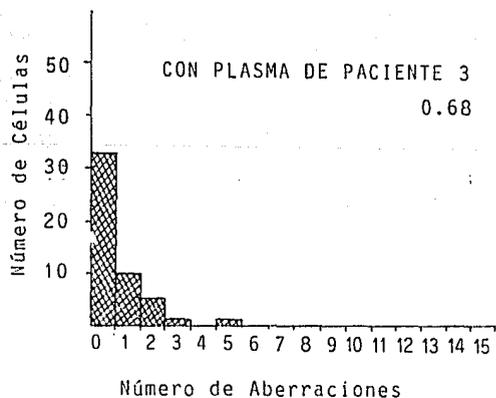
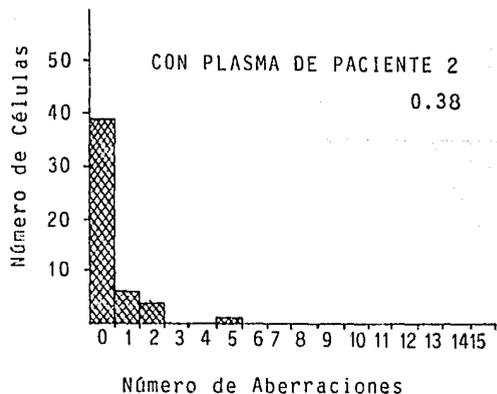
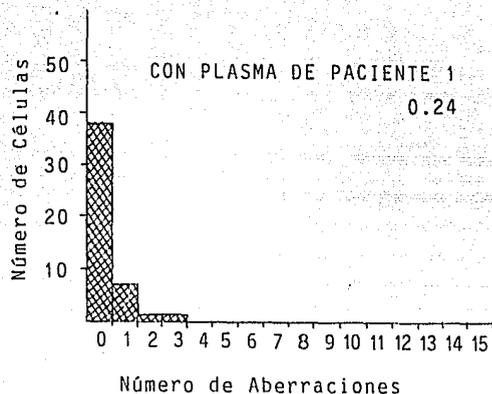
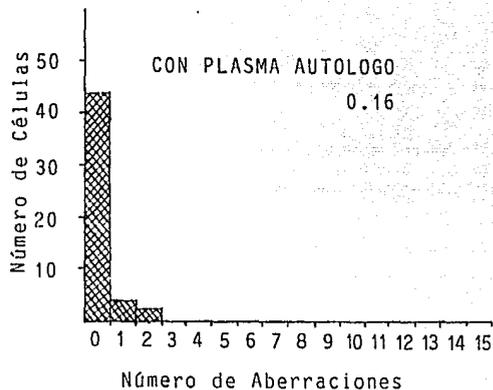


Fig. 11. Las gráficas muestran la distribución de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC en los cultivos de linfocitos del sujeto sano suplementados con plasma autólogo, del paciente 1, 2 y 3.

CULTIVOS		TIPOS DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS				
Células	+ Plasma	% Fracturas	% Fragmentos	% Anillos y Dicéntricos	% Figuras	% Otros
Paciente 1	+ autólogo	53.58	5.3	0	37.16	2.68
Paciente 1	+ heterólogo 2	55.56	5.56	3.70	35.18	0
Paciente 1	+ heterólogo 3	56.76	12.16	0.68	30.40	0
Paciente 1	+ normal	66.66	3.32	0	30.0	0
Paciente 2	+ autólogo	47.94	7.30	0	10.50	34.26
Paciente 2	+ heterólogo 1	81.39	2.33	0	16.28	0
Paciente 2	+ heterólogo 3	79.37	6.88	0	13.76	0
Paciente 2	+ normal	72.22	5.56	0	22.22	0
Paciente 3	+ autólogo	75.76	5.30	0	18.94	0
Paciente 3	+ heterólogo 1	73.91	2.17	0	23.91	0
Paciente 3	+ heterólogo 2	87.88	0	0	12.12	0
Paciente 3	+ normal	72,55	0	0	27.45	0
Sujeto sano	+ autólogo	100.00	0	0	0	0
Sujeto sano	+ heterólogo 1	83.33	16.66	0	0	0
Sujeto sano	+ heterólogo 2	78.95	15.78	0	0	5.27
Sujeto sano	+ heterólogo 3	97.06	2.94	0	0	0

\* Los datos que se muestran en esta tabla representan los porcentajes de los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas con respecto al número total de aberraciones observadas en cada cultivo.

## VI.-DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Los resultados muestran que en todos los casos de Anemia de Fanconi, la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC fué significativamente mayor que en los controles normales, lo cual demuestra una vez más que la respuesta a la MMC es una característica que permite apoyar y corroborar el diagnóstico de Anemia de Fanconi (30,31).

Es evidente que la adición de plasma normal modifica la respuesta a la MMC disminuyendo significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células de los tres pacientes, lo cual está de acuerdo con la existencia de un factor difusible, presente en el plasma normal, capaz de disminuir la susceptibilidad a la MMC y por lo tanto de realizar complementación. Estos hallazgos sugieren que en el plasma de las células normales pueden existir productos génicos que son indispensables para la reparación del ADN y que en el caso de las células AF, éstos productos pueden estar inactivos, modificados ó ausentes y por consiguiente no son capaces de reparar por sí mismas el daño inducido por la MMC.

Por otra parte, en este experimento se observó que la presencia del plasma AF del paciente 1 y 2 no incrementó la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas ni modificó la respuesta a la MMC de las células normales, lo cual sugiere que no existe un factor clastogénico en el plasma AF. Sin embargo, al cultivar células normales con el plasma del paciente 3, a pesar de haber encontrado una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas (0.68), no parece que exista un efecto clastogénico ya que la mayor parte de las aberraciones observadas fueron fracturas cromatídicas y cromosómicas (tabla 1) y no se encontraron rearrreglos complejos. Por esta razón y por el hecho de que hasta el momento no se ha demostrado que las células de AF produzcan un factor clastogénico como se ha observado en el Síndrome de Bloom (44) y en Ataxia telangiectasia (45) y como han su

gerido Zakrzewski y Sperling (46) al cocultivar fibroblastos de pacientes AF con células de ovario de hamster chino, se desconoce a que se debe el que la frecuencia de aberraciones cromosómicas observadas con el plasma 3 sea mayor que en el control pero es probable que este hallazgo sea causado por el azar.

Ahora bien, para demostrar heterogeneidad genética en este trabajo, los resultados teóricos deberían indicar efecto de complementación entre el paciente 3 con 1 y 2, si se supone que los genes involucrados son diferentes y ningún efecto entre los casos 1 y 2, ya que son hermanos, y por lo tanto los genes afectados son los mismos. Sin embargo, esto no se demostró y en su lugar se encontró una gran variabilidad en la respuesta de los linfocitos AF a la MMC en presencia del plasma de los otros pacientes.

En este trabajo llaman la atención dos datos que no apoyan la hipótesis planteada: por una parte, de una manera contraria a lo que se esperaba, se observó que el plasma del paciente 2 complementó con las células de su hermano; y por otra, en el paciente 3, aunque sus células complementaron con el plasma 1 y 2, lo cual apoya la posibilidad de heterogeneidad genética, su plasma no fué capaz de disminuir la frecuencia de aberraciones cromosómicas de las células de los otros pacientes con AF

Hasta el momento, solamente se ha demostrado heterogeneidad genética en AF mediante el análisis de complementación por fusión celular y se han identificado claramente dos grupos de AF, ya sea por análisis de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas con MMC y DEB (38) o por medición de la inhibición del crecimiento celular y de la síntesis de ADN en células expuestas a 8-metoxipsoralen (8-MOP) y radiación ultravioleta (49).

A pesar de que hasta ahora no se conocen los eventos moleculares que conducen a la complementación, es claro que

este efecto es demostrable en células híbridas que implican la presencia de ambos genomas.

En este trabajo, con la metodología de adición de plasma no pudo ponerse en evidencia el efecto de complementación, sin embargo, esto puede explicarse de dos formas:

- 1).- La primera sería considerar la posibilidad de que los genes afectados de nuestros pacientes fueran diferentes y que sus células (ó uno de los dos tipos celulares) no fueran capaces de producir un factor difusible que realice complementación. En este caso, aunque existiera heterogeneidad genética esta metodología no sería la adecuada para ponerla en evidencia.
- 2).- La segunda posibilidad es que en realidad no exista heterogeneidad genética entre estos pacientes con AF.

En relación a la primera posibilidad, aunque podrían estar de acuerdo los resultados que corresponden a las células y plasma del paciente 3, la complementación que se encontró en las células y en el plasma de los pacientes 1 y 2 hacen pensar que la discordancia entre los resultados observados y los esperados se deben a la gran variabilidad de la respuesta de las células estudiadas.

Hasta la fecha sólo se ha demostrado la existencia de dos tipos de AF que complementan uno con otro: Zakrzewski y Sperling (1980) encontraron una forma adulta de AF en la cual las manifestaciones hematológicas se inician en la segunda década y una forma infantil que comprende un gran número de casos entre los cuales los experimentos por hibridación celular no han demostrado efecto de complementación (38). Por otra parte, en un estudio independiente, Moustacchi y Diatloff-Zito demostraron un efecto de complementación en los fibroblastos de pacientes de diferentes orígenes.

nes geográficos (50-52) por medio de otro tipo de cuantificaciones, por tanto, cabe la posibilidad que existan más de dos grupos de complementación, como en el caso de las otras enfermedades de inestabilidad cromosómica.

Ahora bien, de acuerdo a los hallazgos de Zakrzewski y Sperling, los tres pacientes que se estudiaron aquí, corresponden a la variedad infantil, ya que desarrollaron aplasia medular antes de los 8 años por lo cual es más probable que se trate del mismo gen AF con variabilidad en la expresión clínica y citogenética.

Por último, es importante señalar que es necesaria la realización de nuevos estudios a nivel celular y molecular que permitan explicar la causa de la variabilidad en AF y demostrar a través de la correlación de los hallazgos clínicos y citogenéticos la existencia de variantes en el grupo infantil de AF.

VII.- REFERENCIAS.

- 1.- Schroeder-Kurth, M.T.: Whats is Fanconi's anemia. Clin.Genet. 25: 205-213, 1984.
- 2.- Duckworth-Rysiecki, G., Hultén, M., Mann, J. y Taylor, M.R.A.: Clinical and cytogenetic diversity in Fanconi's anemia. J.Med. Genet. 21: 197-203, 1984.
- 3.- Nora, J.J. y Fraser, F.C. Medical Genetics: Principles and Practice. Philadelphia, Lea & Febiger. 1981.
- 4.- Nyhan, M.D. y Sakati, M.D. Genetic & Malformation Syndromes in Clinical Medicine. Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc. 1979.
- 5.- Emery, A.E.H. y Rimoin, L.D. Principles and practice of medical genetics. New York, Churchill Livingstone, 1983.
- 6.- Stern, C. Principles of Human Genetics. San Francisco, Freeman and Company, 1973.
- 7.- Smith, M.D.D. Recognizable patterns of human malformation. Philadelphia, Saunders Company, 1982.
- 8.- Kidson, C.H.: Diseases of repair. Clin. Hematol. 9, 1: 141-157, 1980.
- 9.- Bushkell, L.L., Kersey, H.J. y Cervenka, J.: Chromosomal breaks in T and B lymphocytes in Fanconi's anemia. Clin.Genet. 9: 583-587, 1976.
- 10.- Nowell, P.C.: Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. Exp. Cell. Res. 33: 445-449, 1984.
- 11.-Berger, R., Bernheim, A., De Coniat, M., Vecchione, D. y Schaison, G.: Chromosomal studies of leukemic and preleukemic Fanconi's anemia patients. Hum.Genet. 56: 59-62, 1980.
- 12.-Poon, P.K., O'Brien, R.L. y Parker, J.W.: Defective DNA repair in Fanconi's anemia. Nature, 250: 223-225, 1974.
- 13.-Fujiwara, Y., Tatsumi, M. y Sasaki, M.: Crosslink repair in human cells. J.Mol.Biol. 113: 635- 649, 1977.
- 14.-Dutrillaux, B., Dubos, C., Viegas-Pequignot, E. y Buriot, D.: Partial endoreduplication: A new cytogenetic anomaly possibly related to a DNA repair defect. Ann.Genet.22:25-28, 1979.

- 15.-Guille, J.P., Wortelboer, M.H. y Joenje, H: Antioxidant status of Fanconi anemia fibroblasts. *Hum.Genet.* 77: 28-31, 1987.
- 16.-Nordenson, I.: Effect of superoxide dismutasa and catalasa on spontaneously occrring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia. *Lancet.* 1: 204, 1978.
- 17.-Joenje, H., Erikson, A.W., Franks, R.R., Arwert, F., Houwen, B: Eryocyte superoxide dismutasa deficiency in Fanconi's anemia. *Lancet.* 1:205, 1978.
- 18.-Joenje, H., Arwert., F., Erikson, A.W, M De Koing, H. y Costra, A.B.: Oxygen dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature.* 290: 142-143, 1981.
- 19.-Wunder, E., Burghardt, U., Lang. y Hamilton, L. Fanconi's Anemia: Anomaly of enzyme passage through the nuclear membrane? *Hum.Genet.* 58: 149-155, 1981.
- 20.-Wunder, E.: Further studies on compartmentalization of DNA-topoisomerase I in Fanconi anemia tissue. *Hum.Genet.* 68: 276-28., 1984.
- 21.-Sasaki, S.M. y Tonomura, A.: A high susceptibilty of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.* 33: 1829-1836, 1973.
- 22.-Novotná, B., Goetz, P. y Nadezda, I.S.: Effects of alkylating agents on lymphocytes from controls and from patients with Fanconi's anemia. *Hum.Genet.* 49: 41-50, 1979.
- 23.-Gutiérrez, L.M.: Mitomycin C in childhood cancer a review en: Mitomycin C. Currents status and new developments. Ed: Carter, S.K. y Crooke, S.T. Nueva York, Academic Press, 1979.
- 24.-Lown, J.W. The molecular mechanism of antitumor action of the mitomycins en: Mitomycin C. Current status and new developments. Ed: Carter, S.K. y Crooke, S.T. Nueva York, 1979.
- 25.-Cohen, M.M.y Shaw, M.W.: Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J.Cell.Biol.* 23: 386-395, 1964.
- 26.-Ishii, Y.: Nature of the mitomycin-C induced lesion causing sister-chromatid exchange. *Mut. Res.* 91: 51-52, 1981.
- 27.-Remers, A.W.: Mitomycin C and analog development. en: Mitomycin C. Current status and new developments. Ed: Carter, S.K. y Crooke, S.T. Nueva York, Academic Press, 1979.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 28.-Cervenka, J., Arthur, D. y Yasis, C.: Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic aplastic anemia and Fanconi anemia. *Pediatrics*. 67: 119- 127, 1981.
- 29.-Cohen, M.M., Simpson, S.J., Honig, G.R., Maurer, H.S., Niklas, Niklas, J.W. y Martin, A.O.: The identification of Fanconi anemia genotypes by clastogenic stress. *Am.J.Hum.Genet.* 34: 794-810, 1982.
- 30.-Cervenka, J. y Hirsch, A.B.: Cytogenetic differentiation of Fanconi anemia, "idiopathic" aplastic anemia and Fanconi anemia heterozygotes. *Am.J.Med.Genet.* 15: 211-223, 1983.
- 31.-Frias, S., Carnevale, A. y Del Castillo, V.: Utilidad de la prueba de exposición de linfocitos a Mitomicina C en el diagnóstico de anemia de Fanconi. *Rev.Invest.Clin.(Méx)* 36: 219-224, 1984.
- 32.-Voss, R., Kohn, G., Shaham, M., Benzur, Z., Añon, J., Ornoy, A., Yaffe, H., Golbus, M. y Auerbach, D.A.: Prenatal diagnosis of Fanconi anemia. *Clin.Genet.* 20: 185-190, 1981.
- 33.-Shipley, J., Rodeck, H.C., Garrett, C., Galbraith, J. y Giannelli, F.: Mitomycin C induced chromosome damage in fetal blood cultures and prenatal diagnosis of Fanconi's anemia. *Prenatal Diagnosis*, 4: 217-221, 1984.
- 34.-Pacheco, U.G., Sánchez, C.J. e Ibarra, C.B.: Errores innatos del metabolismo (EIM) en: *Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de enfermedades hereditarias*. Ed. Guizar-Vázquez, J.J. México, Manual Moderno, 1988.
- 35.-Stern, C. *Genética humana*. Madrid, Alhambra, 1979.
- 36.-Carnevale, A. Trastornos autosómicos dominantes en: *Genética clínica. Diagnóstico y manejo de enfermedades hereditarias*. Ed. Guizar-Vázquez, J.J. México, Manual Moderno, 1988.
- 37.-Mckusick, M.D.: *Mendelian inheritance in man*. Baltimore, The Johns Hopkins University, Press, 1986.
- 38.-Zakrzewski, S. y Sperling, K.: Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum.Genet.* 56:81-84, 1980
- 39.-Carnevale, A. y Frias, S.: Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la Mitomicina C de los linfocitos de Anemia de Fanconi. *Rev.Invest.Clin.(Méx)* 37: 31-34, 1985.

- 40.-Nordenson, I., Björkstén, B. y Lundh, B.: Prevention of chromosomal breakage in Fanconi's anemia. Cocultivation with normal cell. *Hum.Genet.* 56: 169-171, 1980.
- 41.-Yoshida, M.C.: Suppression of spontaneous and Mitomycin C induced chromosome aberrations in Fanconi's anemia by cell fusion with normal human fibroblasts. *Hum.Genet.* 55: 223-229, 1980.
- 42.-Moorhead, P.S., Nowell, P.D., Melman, W.J., Battips, D.M. y Hungerford, D.A.: Chromosomes preparation of leucocytes cultures from human peripheral blood. *Exp.Cell.Res.* 20: 630-635, 1960.
- 43.-Miller, R.T. Simultaneous statistical inference. Nueva York. McGraw-Hill Book Co., 1968.
- 44.-Tice, R., Winder, G. y Rary, J.M.: Effect of cocultivation sister chromatid exchange frequencies in Bloom's syndrome and normal fibroblast cells. *Nature.* 273: 538-540, 1978.
- 45.-Shaham, M., Becker, Y y Cohen, M.M.: A diffusible clastogenic factor in ataxia telangiectasia. *Cytogenet.Cell.Genet.* 27:155-161, 1980.
- 46.-Zakrzewski, S. y Sperling, K.: Antagonistic effect of cocultivation on MMC induced aberration rate in cells of patient with Fanconi's anemia. *Hum.Genet.* 56: 85- 88. 1980.
- 47.-Diatloff-Zito, C., Papadopoulo, D., Auerbeck, D. y Moustacchi, E.: Abnormal response to DNA cross-linking agents of Fanconi anemia fibroblasts can be corrected by transfection with normal human DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83: 7034-7038, 1985.
- 48.-Shaham, M., Adler, B., Ganguly, S. y Chaganti, R.S.K.:Transfection of normal human and Chinese hamster DNA corrects diepoxibutane-induced chromosomal hypersensitivity of Fanconi anemia fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84: 5853-5857, 1987.
- 49.-Gök, M.M. y Wunder, E.: Microinjection of normal cell extracts into Fanconi anemia fibroblasts corrects defective scheduled DNA synthesis recovery after 8-methoxypsoralen plus UV a treatment *Hum.Genet.* 75: 350-355, 1987.
- 50.-Moustacchi, E., Papadopoulo, D., Diatloff-Zito, C. y Buchwald, H.: Two complementation groups of Fanconi's anemia differ in their phenotypic response to a DNA-crosslinking treatment. *Hum.Genet.* 75: 45-47, 1987.

- 51.-Duckworth-Rysiecki, G., Cornish, K., Clarke, C.A., Buchwald, M.: Identification of two complementation groups in Fanconi's anemia. *Somatic.Cell.Mol.Genet.* 11: 35-43, 1985.
- 52.-Papadopoulo, D., Auerbeck, D. y Moustacchi, E.: The fate of 8-methoxypsoralen-photoinduced DNA interstrand crosslinks in Fanconi's anemia cells of defined genetic complementation groups. *Mutat.Res.* 184: 271-280, 1987.