



132
204
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**SINERGISMO MITOMICINA C - BROMODESOXIURIDINA EN LA
PRODUCCION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN
CUATRO PACIENTES CON 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
SAUL MENDOZA OROZCO

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
BALLA DE ORIGEN**

1991



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.

INDICE

	Pág.
I. ANTECEDENTES	1
II. OBJETIVO	16
III. HIPOTESIS	16
IV. MATERIAL Y METODOS	17
V. RESULTADOS	22
VI. DISCUSION	24
VII. CONCLUSIONES	30
VIII. REFERENCIAS	32
TABLAS	39

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Aberraciones por célula	(ab/cel.)
Anemia de Fanconi	(AF)
Anillos y Dicéntricos	ani y dic.
Bromodesoxiuridina	(BrdU)
Figuras Complejas	Fig. Com.
Figuras Radiales	Fig. Rad.
Fragmentos	Frag.
Incontables	Inctb.
Intercambio de Cromátidas Hermanas	ICHs
Luz Ultravioleta	(UV)
8 - Metoxipsoralen	(8 - MOP)
Mitomicina - C	(MMC)
Rupturas Cromosómicas	Rup. Crom.
Superóxidodismutasa	(SOD)

I. ANTECEDENTES

La Anemia de Fanconi (AF) fue descrita por primera vez en Zürich, por el Dr. Guido Fanconi en 1927. Es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por presentar pancitopenia, retraso en el crecimiento, malformación de radios y pulgares, hiperpigmentación en la piel, anomalías oculares cardíacas, renales y genitales; aproximadamente el 20% de los pacientes tienen retraso mental (1). En estos pacientes existe una alta incidencia de cáncer, sobre todo de los tipos: Leucemia aguda, carcinoma hepatocelular y carcinoma de células de la piel (2).

1.0 Cuadro Clínico

Existe variación clínica entre los pacientes; en esta enfermedad es muy frecuente el crecimiento intrauterino retardado, la mayoría de los afectados tienen peso y talla baja al nacimiento y muchos de ellos presentan retraso en el crecimiento postnatal (1).

Aproximadamente un 15% de los pacientes cursa con hipoplasia de radio, y el 75% presenta una variedad de anomalías de pulgares que puede variar de la aplasia total a un pequeño dedo pulgar hipoplásico con eminencia tenar atrofiada. Ocasionalmente el cúbito y radio son hipoplásicos. Otras anomalías incluyen sindactilia, duplicación de pulgares, centros de osificación del carpo hipoplásicos, deformación de la escápula, dislocación

congénita de cadera, escoliosis, hemivertebras y aplasia bilateral (1). El cráneo es pequeño y en ocasiones hay microcefalia.

La cara es característica, con fisuras palpebrales pequeñas, paladar alto, ptosis ocasional, estrabismo y microftalmos. Una de las características más comunes es la hiperpigmentación, que tiende a incrementarse con la edad (3, 4), e involucra cara, cuello, axila, tronco, muslos y área perineal. Existen defectos cardíacos tales como: anomalías de ductos arteriales, defecto ventricular septal y coartación de la aorta. Puede haber asplenia e hipoplasia de timo (1). En otros órganos del cuerpo se encuentra hipoplasia o agenesia renal unilateral y riñón en forma de herradura. En ambos sexos puede haber hipogonadismo; en los pacientes masculinos es frecuente encontrar micropene y criptorquidia, y en los femeninos hipoplasia uterina y vaginal (4). Algunos casos cursan con pérdida auditiva e hiperreflexia (2). Aproximadamente en un 20% de los pacientes se ha encontrado retraso mental (3).

La pancitopenia, que es una disminución progresiva de las células de la médula ósea, ocurre generalmente entre los 5 y 7 años de edad, aunque se han descrito casos de aparición en la edad adulta. La médula ósea por lo general, muestra hipoplasia con una hematopoyesis moderadamente activa (3). Hay un alto porcentaje de hemoglobina fetal, algunos eritrocitos son macrocíticos y su promedio de vida es corto. La leucopenia es predominantemente granulocitopenia. Se ha reportado neutrocitopenia y trombocitopenia así como un reducido número de glóbulos rojos circulantes (4).

2.0 Citogenética

2.1 Aberraciones Espontáneas

Ya que la AF se caracteriza por presentar un alto porcentaje de aberraciones cromosómicas espontáneas y que algunas veces es difícil identificar la enfermedad sólo desde el punto de vista clínico debido a la variabilidad fenotípica de los pacientes, las aberraciones cromosómicas se han utilizado con fines de diagnóstico (5, 6 y 7). Por este aumento en el número de aberraciones espontáneas y por tener un patrón de herencia autosómico recesivo, la AF forma parte del grupo de enfermedades de síndrome de inestabilidad cromosómica, como son el Síndrome de Bloom, Ataxia telangiectasia y Xeroderma pigmentoso.

Las aberraciones cromosómicas más frecuentes en AF son los rompimientos cromatídicos e isocromatídicos, figuras de intercambio de cromátidas homólogas o no homólogas, endoreduplicaciones en las cuales hay duplicación cromosómica sin división de centrómeros; cromosomas dicéntricos, producto de ruptura y unión de dos cromosomas; en algunas células los cromosomas pueden romperse en los extremos y con la reunión de estos dar origen a cromosomas en anillo (1).

2.2 Aberraciones Inducidas

Schuler en 1969 (8), descubrió que los agentes alquilantes producen en células de AF un incremento de aberraciones cromosómicas significativamente mayor que en las células normales. Las células AF se caracterizan por

presentar alta sensibilidad a los siguientes agentes: Mitomicina C (MMC) (9); zoniazida (INA), 4-Nitroquinolina tóxido (4NQO), Diepoxibutano (DEB) (10); tetradecanoil-acetato (TPA) (11); 8-metoxipsoralen y trimetilsoralen (8-MOP y TMP) éstos dos últimos en combinación con luz ultravioleta (UV) (12); mostaza de nitrógeno (HN^2) (13); Cis-diaminodichloroplatino II (cis-platino), Trans-diaminodichloroplatino I (Trans-platino) (14) y otros. Todos se caracterizan por ser agentes alquilantes bi o polifuncionales; sin embargo, con los agentes monofuncionales como Decarbamoil-mitomicina C (DMMC), las células AF tienen una respuesta similar a la de las células normales (15).

Por otra parte, agentes físicos como los rayos ultravioleta (UV), rayos X o rayos gamma, también provocan aumento en el número de aberraciones en células de individuos con AF, aunque no de la misma magnitud que el que producen los agentes alquilantes bifuncionales, lo que se ha interpretado como una reparación eficiente contra el daño producido por luz UV (16, 17).

2.3 Variabilidad Clínica y Citogenética

El diagnóstico de la enfermedad es en ocasiones difícil, debido a que en algunos casos, aunque los pacientes presenten pancitopenia, las características fenotípicas son mínimas. El cuadro clínico varía considerablemente, algunos niños afectados presentan alteraciones congénitas, mientras que otros muestran patrones de severas malformaciones de radio y pulgares sugestivas de AF, pero sin alteraciones hematológicas (19). En cualquiera de estos casos, la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas es menor del 10%. Se ha encontrado que en AF existe una

variante sin malformaciones congénitas típicas de AF pero con fragilidad cromosómica y anemia hipoplásica que conduce a leucemia (18).

Citogenéticamente en AF el número de aberraciones cromosómicas espontáneas varía de paciente a paciente, en linfocitos de sangre periférica el porcentaje de fracturas y configuraciones anormales fluctúa entre 10 y 15% (6). Aunque se han encontrado porcentajes de rompimiento hasta del 74%. Al exponer células AF a una concentración de 40 ng/ml de MMC se han obtenido porcentajes de aberraciones desde 320%, hasta incontables. Esto contrasta con lo que se observa en los individuos normales que tienen una frecuencia de aberraciones espontáneas inferiores al 10%, si se tratan con 40 ng/ml de MMC se inducen porcentajes de 26% hasta 42% (6.19).

3.0 Heterogeneidad genética

La gran variabilidad clínica y citogenética entre los individuos, sugiere heterogeneidad genética, que ocurre cuando un fenotipo clínico o bioquímico en particular puede ser producido por más de un genotipo, es decir; lo que parece ser el mismo padecimiento en un grupo de individuos puede originarse por mutaciones diferentes (3). La heterogeneidad genética se ha demostrado en enfermedades con inestabilidad cromosómica como Xeroderma pigmentoso, por medio de la detección de grupos de complementación, los cuales corrigen mutuamente las aberraciones inducidas.

En AF se han encontrado dos grupos de complementación, Zakrzewsky y Spelling en 1980 (20), demostraron que existe heterogeneidad genética en

AF al realizar una técnica de hibridación celular con dos diferentes formas fenotípicas de AF: La variedad adulta (tipo B) y la variedad infantil (tipo A), en las cuales se encontró un efecto de complementación entre sus células. En 1987 Moustacchi y Diatloff-Zito observaron en fibroblastos y en linfoblastos de AF que fueron expuestos a 8-MOP + radiación UV, y encontraron que las células provenientes de un paciente (tipo B) repararon las aberraciones inducidas después de 10 horas de tratamiento, mientras que las provenientes del otro paciente (tipo A) no repararon aun después de 24 horas (21).

Carnevale y Frías (22) encontraron una menor respuesta a la MMC en linfocitos de AF cuando crecieron en presencia de plasma de individuos normales; con esta metodología, intentaron demostrar heterogeneidad genética en diferentes pacientes con variedad infantil de AF y no encontraron complementación.

4.0 Hipótesis sobre el defecto básico en AF

Hasta ahora no se conoce con exactitud cuál es el defecto básico molecular en AF. De acuerdo con varios autores existen tres hipótesis al respecto (23):

A) Deficiencia a nivel de reparación del ADN

Desde 1975 se propuso que las células con AF podrían ser deficientes a nivel de la remoción de enlaces cruzados covalentes ADN-ADN producidos por agentes alquilantes bifuncionales (24). Poon y cols. sugirieron una deficiencia en una exonucleasa, que remueve el daño producido al ADN, ya que las células AF pueden realizar escisión endonucleotídica como el primer

paso del proceso de reparación y pueden polimerizar nucleótidos para reemplazar la cadena dañada; pero no pueden completar el proceso de reparación ya que no pueden eliminar la cadena dañada de ADN después de la escisión endonucleotídica (25).

Por otra parte, se ha propuesto que la alteración se encuentra a nivel de la ligasa; ya que Zakrzewsky (20) encontró una reducción en la actividad de esta enzima en células AF y Dutrillaux, (26), basado en el análisis de la frecuencia de endorreduplicaciones completas y parciales, apoyó esta idea. Berger (27) propuso que la alteración podía deberse a la existencia de niveles por debajo de los normales de NAD⁺ (nicotidamida adenina dinucleótido), una co-enzima posiblemente asociada con la actividad de la ligasa en los sistemas de reparación (27). Otro dato que involucra a la ligasa en el defecto molecular de AF es que se reduce la fosforilación de ADP durante la reparación que ocurre en el ADN después de tratar células AF con radiación UV, y al parecer la fosforilación es necesaria para activar la ligadura del ADN dañado (16).

8) Deficiencia en la detoxificación de radicales libres generados por el metabolismo

El defecto básico molecular de la enfermedad puede estar en la detoxificación de radicales libres endógenos, que involucra de Cu y Zn y peroxidasa (28, 20).

Joenje, et. al. en 1978, encontraron una actividad reducida de SOD en eritrocitos y leucocitos de pacientes AF y se ha observado que la administración *in vivo* de SOD bovina reduce el porcentaje de rupturas cromosómicas en linfocitos. Por otra parte, se ha encontrado una correlación directa entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas y la tensión de oxígeno aplicada a los cultivos de células AF y una disminución del daño cromosómico cuando se trata con agentes anti-oxidantes como la desferrioxamina (30, 31).

Por lo anterior, Porfirio (31) y Raj (32) han propuesto que los radicales libres generados por el metabolismo del oxígeno podrían dañar membranas, proteínas y ácidos nucleicos y como consecuencia provocar daño cromosómico y muerte celular por reacción directa con la cromatina o bien, indirectamente por dañar enzimas de reparación.

C. Alteración en el transporte de la topoisomerasa uno a través de la envoltura nuclear

Esta propuesta que fue hecha por Wunder y cols. (33), está relacionada con la enzima que cataliza el desenrollamiento del ADN en el momento de la replicación. Al investigar extractos nucleares en las células de placentas de pacientes con AF, se observó un decremento en la actividad de la enzima, en comparación con la actividad en citoplasma de células normales. Al parecer, la penetración de la topoisomerasa uno a través de la envoltura nuclear está alterada en células AF y por lo tanto, se acumula en el citoplasma, en el sitio de síntesis. Otra posibilidad es que la topoisomerasa

tenga un defecto estructural que le impida pasar a través de la envoltura nuclear (34).

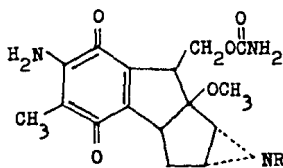
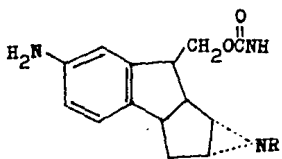
5.0 Acción de la MMC sobre el ADN

Debido a que las células de individuos con AF se caracterizan por su alta sensibilidad a la MMC, desde 1979 este agente se ha usado para diferenciar AF de otras anemias idiopáticas (35), así como para diagnóstico prenatal de esta enfermedad (36).

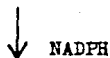
La MMC fue descubierta en 1958, en Japón; aislada de *Streptomyces caespitosus*; el tipo A y B son antibacteriales y antitumorales pero no son tan poderosos como el tipo C (37), que tiene un peso molecular de 334 daltones, es soluble en agua y en solventes orgánicos y poseen tres grupos potencialmente activos; Quinona, uretano y un anillo aziridina, por lo cual, es un agente bifuncional o trifuncional y actúa durante la fase S del ciclo celular (38).

En 1987 (38, 38, 40 y 41) se propuso un mecanismo de acción de la MMC (Fig. 1): hay una unión no covalente entre MMC-ADN (a) con ayuda de nicotinamida adeninucleótido fosfato reducido (NADPH), que ataca los oxígenos del grupo aromático de MMC y da como resultado una semiquinona, por una reacción de reducción (b). La semiquinona se reduce a su vez en hidroquinona (c) que posteriormente se convierte en aziridina-hidroquinona por medio de una reacción donde se pierde una molécula de metanol (d). La aziridina-hidroquinona es altamente activa tiene grupos alquilantes conjugados

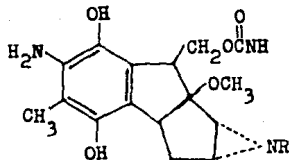
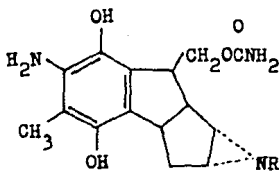
ACCION DE LA MMC SOBRE EL ADN



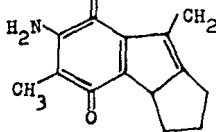
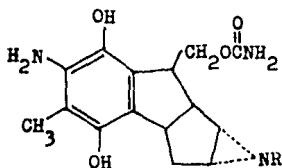
MITOMICINA C



c)



d)



a)

b)

e)

con indol-nitrógeno y se une al ADN covalentemente; esta reacción se favorece en presencia de O_2 y se hace reversible por NADPH, después se retira el radical carbamoiloxi ($OCN:H_2$) y el ADN se une a la MMC en el carbono 10, primer grupo de unión; así se establece una unión covalente del ADN en este sitio (e), principalmente en el oxígeno-6 de la guanina (O_6 -metil-guanina) y otra unión por medio del ciclopentano opuesto al carbono 10 en el radical NR, que es el segundo grupo alquilante, este último paso se favorece también por O_2 y es reversible por NADPH.

Al parecer, los efectos que provocan estos dos centros alquilantes en las células de AF son mutagénicos, clastogénicos y letales (42). Otro efecto letal es la liberación de peróxido de hidrógeno que ocurre cuando la MMC se une específicamente al ADN (38).

La MMC forma enlaces intracatenarios en el ADN, lo cual provoca su degradación e inhibe su síntesis. También forma enlaces intercatenarios y provoca la alquilación, adición de radicales metilo CH_3 , o etilo CH_3-CH_2 en distintas posiciones según el carbono, oxígeno o nitrógeno de la base con que reaccionen (39), forma dímeros de pirimidina que dan lugar a una distorsión en la cadena de ADN, así como metilación del oxígeno-6 de la guanina (42). El tratamiento con agentes alquilantes como la MMC produce la metilación (o etilación) de la guanina en el nitrógeno-7, en el oxígeno-6 o en el grupo amino unido al carbono-2; pero sólo se encuentra efecto mutagénico en O_6 -metil-guanina, porque el nitrógeno-7 no está implicado en la formación del enlace

de hidrógeno con la citosina, mientras que el oxígeno sí, lo cual provoca distorsión en el ADN (43).

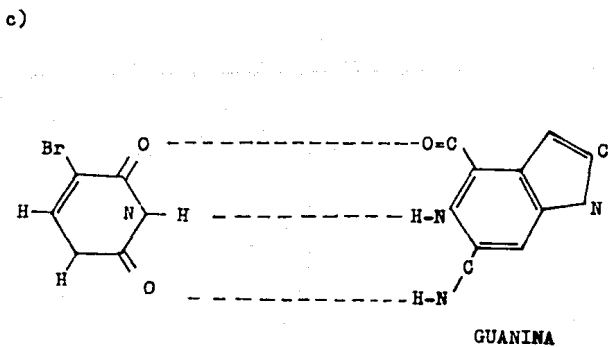
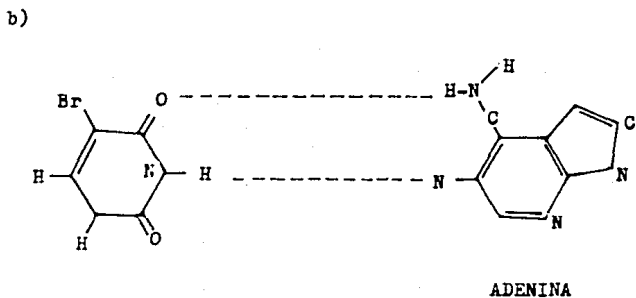
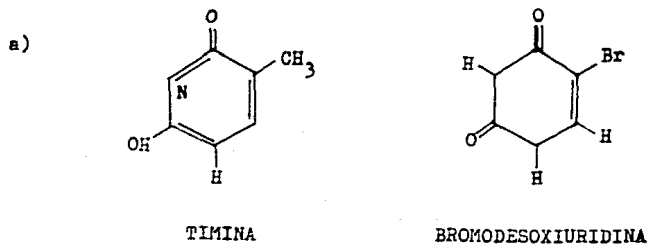
La MMC provoca que se formen enlaces entre O_6 -metil-guanina y proteínas nucleares, los cuales inducen Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs), pero la toxicidad de estos enlaces ADN-proteína no tiene repercusión aparente en lo que se refiere a la producción de aberraciones cromosómicas (14, 44).

6.0 Acción de la BrdU sobre ADN

La 5-Bromodesoxiuridina (BrdU) es una timina halogenada (45) y se ha comprobado que es un agente tóxico para las células. Se incorpora al ADN en lugar de la timina, (a) (ver Fig. 2) para aparearse con la adenina (b) la incorporación de este análogo al ADN no produce directamente mutaciones, sin embargo, si cambia a la forma enólica, puede formar tres puentes de hidrógeno y unirse a la guanina, (c) lo que da como resultado una mutación de tipo transición, que en las replications siguientes del ADN daría un cambio de pares de bases de T:A a C:G (45 y 46).

A nivel cromosómico, el daño que produce es del tipo Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs). De acuerdo con Bianchi (48), los ICHs se pueden provocar porque la BrdU bloquea la elongación de la cadena en replicación, ésta se rompe y entonces ocurren uniones entre replicones completos o parcialmente duplicados, lo cual da lugar a una doble cadena de ADN. La toxicidad de la BrdU no incorporada al ADN se debe quizá a la alteración de

ACCION DE LA ErdU SOBRE EL ADN



la reserva celular de nucleótidos, por la concentración misma de este nucleótido modificado y porque inhibe a la enzima ribonucleótido reductasa, la cual es esencial en la biosíntesis de desoxirribonucleótidos (47). Davidson (45), encontró que en células de ovario de hámster chino (CHO) la BrdU no incorporada produce un daño cromosómico a nivel de ICHs, mayor que el que produce la BrdU incorporada al ADN; aunque la frecuencia de aberraciones cromosómicas y los ICHs se forman por medio de diferentes mecanismos, y la frecuencia de aberraciones cromosómicas no se asocia directamente con el aumento en el número de ICHs, ambos son consecuencia del daño provocado al ADN.

Además de inducir ICHs, la BrdU provoca enlaces intercatenarios en el ADN, hace sensible al ADN a los rayos UV y radiación ionizante, inhibe la actividad mitótica e interfiere con la diferenciación celular (46). A pesar de que por lo anterior se puede afirmar que la BrdU es un agente que daña a las células, no se ha encontrado que sea un agente clastogénico, es decir, no provoca aberraciones cromosómicas (42).

7.0 Evidencias de sinergismo MMC-BrdU en Anemia de Fanconi

Se sabe que en células AF la toxicidad de la MMC puede modificarse cuando se agregan análogos de bases: Cuando se agrega MMC junto con 6-tioguanina o 6-mercaptopurina, la supervivencia celular decae considerablemente y por el contrario, cuando se agrega junto con adenina, la supervivencia celular aumenta en relación al tratamiento con MMC sola (49).

En cuanto a la BrdU en relación con el efecto de la MMC en células con AF, Cervenka y cols. (7) al realizar cultivos de linfocitos AF expuestos a diferentes concentraciones de MMC y de BrdU observaron una reducción del número de metafases y un gran porcentaje de muerte celular. Este efecto de muerte celular sugiere, que existe sinergismo entre estas dos sustancias sobre las células AF aunque estos autores no hacen mención de ello (23).

Por otra parte, Carnevale y Frías en 1985 (22), encontraron que el cocultivo de células normales-AF era capaz de corregir parcialmente las alteraciones cromosómicas inducidas por la MMC en las células AF pero cuando las células crecían en presencia de BrdU, el efecto corrector se enmascaraba, lo cual sugirió la existencia de un tipo de sinergismo entre BrdU y MMC.

Posteriormente, en un estudio realizado por Frías y colaboradores (23), cuyo objetivo fue el conocer si existía sinergismo entre la BrdU incorporada al ADN o a la del medio; se encontró que en células normales, la acción de estos dos agentes no fue sinérgica. En lo que se refiere a células AF, en un paciente se observó sinergismo entre la MMC y la BrdU que se manifestó como un incremento en el número de aberraciones cromosómicas. Si bien el ADN sustituido con BrdU presentó una mayor sensibilidad a la MMC, fue la BrdU que se encontraba en el medio la que contribuyó de manera significativa a la potencialización del daño cromosómico conferido por la MMC.

8.0 Justificación del estudio

El único trabajo que se ha realizado, específicamente para demostrar sinergismo entre la MMC y la BrdU en la inducción de aberraciones cromosómicas en AF, se hizo en un sólo paciente. Debido a la variabilidad y aun a la heterogeneidad genética en AF, el estudio de células de un sólo paciente no es suficiente para apoyar la existencia de sinergismo como una característica constante en la enfermedad y se requiere llevar a cabo los experimentos en otros individuos con AF.

II. OBJETIVO

Estudiar si existe sinergismo entre la BrdU y MMC en la producción de aberraciones cromosómicas, en linfocitos de pacientes con AF.

III. HIPOTESIS

Si el efecto sinérgico entre la BrdU y la MMC es una característica constante en las células con AF, entonces se observará un aumento en el número de aberraciones cromosómicas inducidas por la acción secuencial de ambos agentes en las células de todos los pacientes.

IV. MATERIAL Y METODOS

Características clínicas y citogenéticas de los sujetos de estudio:

- AF (MA) Paciente masculino de 6 años de edad con hipoplasia radial bilateral, ausencia de pulgar izquierdo, hipogenitalismo, retraso psicomotor y talla baja. Inició las alteraciones hematológicas a los 5 años de edad; el diagnóstico de AF se confirmó citogenéticamente ya que presentó 0.20 ab/cel. y su respuesta a la MMC correspondió a 5.52 ab/cel.
- AF (YA) Paciente femenina de 10 años de edad con pancitopenia detectada desde los 7 años e hiperpigmentación. Antecedente de una hermana fallecida por leucemia. El diagnóstico de AF fue confirmado citogenéticamente por que se observaron 0.36 ab/cel. de manera espontánea; su respuesta a la MMC fue de 5.52 ab/cel.
- AF (CL) Paciente femenino de 8 años de edad, con pancitopenia, hipoplasia de la región tenar, hipoplasia de pulgar izquierdo, talla normal e hiperpigmentación. El diagnóstico de AF se complementó con los datos citogenéticos en los cuales se encontraron 0.72 ab/cel. y cuando se expusieron sus células a MMC la frecuencia fue de 5.80 ab/cel.
- AF (RI) Paciente masculino de 12 años de edad con pancitopenia, hiperpigmentación, manchas café con leche y talla baja. Tiene una hermana de 7 años de edad que también está afectada con

AF; la frecuencia de ab/cel. en el paciente fue de 0.36, mientras que tratadas con MMC se obtuvieron 3.12 ab/cel.

TESTIGO Sujeto de 7 años de edad, clínica y citogenéticamente sano.

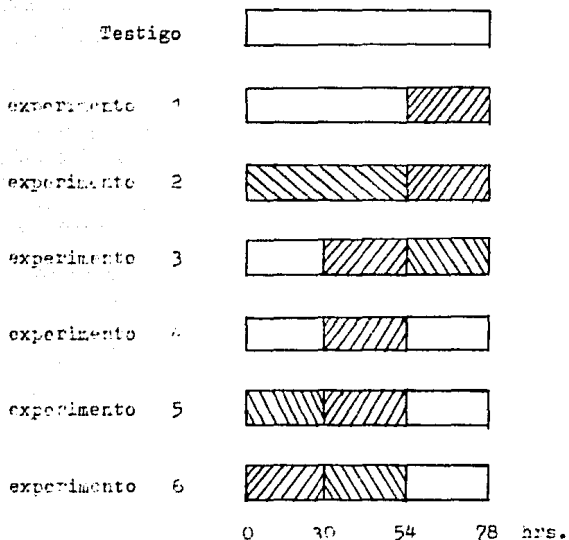
De los cuatro pacientes AF y el testigo se obtuvo una muestra de 10 ml. de sangre periférica heparinizada.




SIEMBRA DE LINFOCITOS: Cada muestra se sembró por duplicado en frascos tipo antibiótico de 60 ml. a los cuales se agregaron: 4.0 ml. de medio de cultivo Mc COY's 5A modificado; 0.25 ml. de fitohematoglutina y 0.02 ml. de antibiótico (penicilina-estreptomicina) con 0.4 ml. de sangre periférica heparinizada. Los cultivos se incubaron a 37° C durante 78 horas. De acuerdo a la adición de BrdU y MMC, para cada sujeto se realizaron 7 diferentes tipos de cultivo (Fig. 3).

Para cada sujeto de estudio se realizaron cultivos controles, en los cuales las células crecieron en presencia de medio de cultivo sin tratamiento de MMC o BrdU (medio no suplementado), con estos cultivos se cuantificó el número de aberraciones espontáneas. En el exp. # 1, se les agregó MMC a una concentración de 40 ng/ml. durante las últimas 24 horas, para conocer la frecuencia basal de aberraciones inducidas por la MMC. En el exp. # 2 los cultivos crecieron las primeras 54 horas en presencia de 10 µg/ml. de BrdU, las células se lavaron y se agregó medio suplementado con MMC durante las últimas 24 horas, con este experimento se eliminó la BrdU de el medio y se valoró si existía sinergismo entre la MMC y la BrdU incorporada al ADN. En el exp. # 3 se agregó MMC de las 30 a las 54 horas de incubación, las células se

M E T O D O

Tipo de cultivo



-  Medio de cultivo no suplementado.
-  Medio de cultivo suplementado con 40 ng/ml de MMC.
-  Medio de cultivo suplementado con 10 µg/ml de BrdU.

lavaron y se incubaron 24 horas más en medio suplementado, con BrdU, para observar el efecto de la BrdU presente en el medio. En el exp. # 4 los cultivos se expusieron a MMC en el intervalo comprendido entre las 30 y las 54 horas de cultivo, después de lo cual se lavaron y se incubaron durante 24 horas más en medio no suplementado. En el exp. # 5 los linfocitos se incubaron durante las primeras 30 horas en medio con BrdU, se lavaron y se incubaron por 24 horas más en medio suplementado con 40 ng/ml. de MMC, las últimas 24 horas se incubaron con medio no suplementado. En el exp. # 6 los cultivos se expusieron a MMC en las primeras 30 horas, luego se lavaron y se les agregó medio suplementado con BrdU hasta las 54 horas, después de este tiempo, se lavaron y se incubaron las últimas 24 horas en medio no suplementado. Estos últimos tres experimentos se realizaron con el fin de observar la reacción de las células AF cuando se les permite pasar durante un ciclo más de replicación del ADN, fase durante la cual se supone que se lleva a cabo la reparación de daño conferido por la MMC.

COSECHA DE LINFOCITOS: Una hora antes de terminar la incubación, se agregaron 0.2 mg/ml. de colchicina a cada cultivo. Se vaciaron los cultivos a los tubos de ensayo y se centrifugaron a 400g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se agregó al botón celular 7 ml. de solución hipotónica (KCL 0.075 M) y se incubaron a 37° C durante 15 minutos, después de los cuales se centrifugaron de nuevo, se desechó el sobrenadante y las células se fijaron con una solución de metanol-ácido acético 3:1. Se dejaron reposar durante 10 minutos y se centrifugaron, se desechó el sobrenadante y

se volvió a agregar fijador y a centrifugar tantas veces como fue necesario, hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente y un botón celular limpio.

Una vez obtenido el botón celular, se hicieron preparaciones por goteo con pipeta Pasteur sobre portaobjetos húmedos y fríos. Las preparaciones se tiñeron durante 5 minutos en una solución de wright en buffer Sörensen (pH 6.8) 1:1 y posteriormente en una solución de giemsa al 20% en buffer Sörensen (pH 6.8) durante 5 minutos.

Las preparaciones fueron codificadas por una persona ajena al estudio, con el objeto de llevar a cabo el análisis de éstas a ciegas. Se analizaron 50 metafases para cada tipo de cultivo y en cada una de las células se cuantificó el número de aberraciones cromosómicas, que se agruparon en 4 categorías: Fracturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos céntricos y acéntricos, anillos y dicéntricos y finalmente figuras radiales.

El análisis de las metafases para cuantificar aberraciones cromosómicas, se llevó a cabo con un microscopio óptico; es importante señalar que en los casos donde las aberraciones se encontraban en un número de 15 ó más por célula, se les consideró como incontables y se les asignó el número de 15 aberraciones, que se consideró como el máximo analizable.

Para hacer el análisis estadístico se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de intervalos por el método de Friedman (50).

V. RESULTADOS

Los resultados de las aberraciones por individuo se presentan tanto en tipo como en frecuencia en las tablas 1-11.

En la tabla 1, se observa la frecuencia total de aberraciones por célula (ab/cel.) para los cuatro pacientes AF y el testigo, en él se encontró una frecuencia de 0.04 aberraciones espontáneas por célula, a partir de la cual se obtuvo un aumento en la frecuencia de ab/cel. en todos los experimentos, hasta de 0.76 en el exp. # 6; de acuerdo a la prueba de Friedman no hay diferencia significativa entre ninguno de estos valores. En esta serie de experimentos, la mayoría de las células presentaron entre 0 y 3 aberraciones (tabla 2), las cuales fueron primordialmente rupturas cromatídicas (tabla 3).

De los 4 pacientes con AF, se obtuvo el promedio de las frecuencias de ab/cel. para cada experimento, como se muestra en las columnas de promedios (\bar{X}) y de desviación estándar (S) en la tabla 1. Se encontró una gran variabilidad en la respuesta a ambos agentes entre los pacientes, su comportamiento fue evidentemente diferente a lo que se encontró en células testigo. En las células AF, el número de aberraciones espontáneas fue variable, con frecuencias de 0.24 a 1.04 y un valor promedio de 0.47. En el exp. # 1 al tratar a las células con MMC las últimas 24 horas, la frecuencia de aberraciones aumentó en comparación con el cultivo control, este aumento se observó en todos los pacientes excepto en uno (AF(R1)=0.94). La diferencia

entre estas frecuencias y las obtenidas en el exp. # 2, donde se trató a las células con BrdU hasta las 54 horas y después MMC las últimas 24 horas ($\bar{X}=1.72$) no fue estadísticamente significativa. En el exp. # 3, cuando las células se expusieron a MMC entre las 30 y las 54 horas y posteriormente a BrdU hasta el final del cultivo, se observó un aumento considerable en la frecuencia de aberraciones inducidas, con un promedio de 4.92 ab/cel., dicho incremento se encontró en todos los individuos con AF, con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$ con respecto a los tres experimentos anteriores.

Un aumento similar al obtenido en el exp. # 3 se mostró en el exp. # 4, que son células que crecieron en presencia de MMC entre las 30 y las 54 horas y las últimas 24 horas en medio de cultivo, sin BrdU, donde se encontró un promedio de 5.20 ab/cel. En el exp. # 5 se expuso a las células a BrdU las primeras 30 horas y posteriormente se incubaron con MMC de las 30 a las 54 horas, las últimas 24 horas sólo crecieron en medio de cultivo y también aumentó la frecuencia de aberraciones ($\bar{X}=5.38$). En el exp. # 6, que es muy similar al anterior pero con MMC primero y luego BrdU se obtuvo la mayor frecuencia de ab/cel. que fue de 6.40, de manera que al comparar los resultados de los experimentos 3, 4, 5 y 6 no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ellos (tabla 1, Fig. 5).

A pesar de que en la columna de promedios de aberraciones (\bar{X}), la frecuencia aumenta en cada uno de los experimentos, esto no ocurre en todos los pacientes AF, ya que después del exp. # 3, la frecuencia disminuye

en algunos experimentos y aumenta en otros sin mostrar una respuesta homogénea (tabla 1).

En los dos primeros experimentos (testigo 1 y 2), se encontraron entre 0 y 7 aberraciones en la mayoría de las células AF (tablas 4, 6, 8 y 10), las cuales fueron principalmente rupturas cromatídicas y figuras radiales (tablas 5, 7, 9 y 11). La prueba de Friedman indicó que no hubo diferencias significativas entre estos experimentos. En los siguientes experimentos (3, 4, 5 y 6) se observaron aberraciones cromosómicas de todos los tipos y en casi todas las células (tablas 4-11). La prueba de Friedman no indicó diferencias significativas entre estos últimos experimentos.

En la figura 4 se puede observar que a partir del exp. # 3 hay un aumento en el promedio de la frecuencia de aberraciones con respecto a los exp. # 1 y # 2, que son considerablemente diferentes de los demás experimentos, lo que indica que cuando se agrega MMC antes de las últimas 24 horas independientemente si se da el tratamiento con BrdU, o no, se encuentra un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de aberraciones.

VI. DISCUSION

Células Testigo

En el testigo se observó una frecuencia de aberraciones espontáneas

menor que en los pacientes con AF, como se ha mencionado, una de las características por la que forma parte de los síndromes de inestabilidad cromosómica es su elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas (37), que se observan entre 0.20 y 0.44 ab/cel. (19).

En presencia de MMC, todas las células testigo mostraron un incremento en la frecuencia de aberraciones. Esto es por la gran toxicidad de la MMC en las células. Como se ha descrito, la molécula de MMC afecta al ADN por medio de la alquilación de bases y formación de uniones covalentes cruzadas intracatenarias e intercatenarias. Se ha reportado que las lesiones intercatenarias persisten durante largo tiempo: De 14 a 18 horas y es muy probable que sean las responsables de la formación de aberraciones cromosómicas (15).

En cuanto al daño provocado a las células normales por BrdU y MMC, aunque se observó una tendencia a la elevación de la frecuencia de aberraciones cuando actuaron ambos agentes secuencialmente, este incremento, comparado con el daño que se produjo la MMC sola no fue significativo como se puede observar en la Fig. 4 y tablas 1, 2 y 3. Así, por lo menos con las concentraciones utilizadas en este estudio, no se puede fundamentar que exista sinergismo entre la MMC y la BrdU en células normales.

Células con AF

En todos los casos con AF, la frecuencia de aberraciones inducidas por la MMC fue significativamente mayor que la obtenida en el testigo, lo que

demuestra una vez más que la respuesta a la MMC es una característica que permite apoyar y corroborar el diagnóstico de AF. Existe evidencia de que en células AF la MMC causa uniones cruzadas de tipo intracatenario e intercatenario, que presumiblemente forman lesiones de una sola hebra, lo que puede dar lugar a aberraciones cromatídicas o cromosómicas al llevar a cabo incisiones en los enlaces cruzados (15,51).

Se observó una variabilidad muy amplia entre los pacientes, lo cual es frecuente en esta enfermedad, ya que como se mencionó son individuos que presentan aun sin tratamiento una gran variabilidad en el número de aberraciones. Como se puede observar en la Fig. 4 y tabla 1, todos los sujetos con AF respondieron de manera similar a la acción de los agentes aplicados en los primeros tres experimentos, sin embargo, en los experimentos siguientes la respuesta fue heterogénea.

Si existiera sinergismo entre la BrdU y la MMC para producir daño cromosómico, en los experimentos en que el tratamiento fue con ambos agentes (exp. #2, #3, #5 y #6), la frecuencia de aberraciones debió haber sido significativamente mayor que en los experimentos en que el tratamiento fue sólo con MMC (exp. #1 y #4).

Más aun, si existiera sinergismo debido a la presencia de BrdU en el medio más que a la BrdU incorporada como podría esperarse (23, 45), el experimento #6 en que se expuso a las células primero a MMC y después a BrdU, debería presentar una frecuencia mayor de aberraciones que el exp. #5

en el que primero se incorporó la BrdU y posteriormente se dejó el tratamiento con MMC.

Nuestros resultados no están de acuerdo con lo esperado respecto a la acción sinérgica, ya que en los experimentos donde se expuso a las células primero a MMC y posteriormente a BrdU, se encontró una elevación en la frecuencia de aberraciones, pero ésta también se encontró en los cultivos cuyo tratamiento primero fue con BrdU y posteriormente con MMC y aun en los cultivos en los que sólo se agregó MMC sin BrdU (Fig. 4, tabla 1). Como se puede observar en la Fig. 4, el único de los pacientes que mostró un comportamiento parecido a lo esperado fue AF (CL), pero los restantes no tuvieron esta respuesta.

Estas observaciones no concuerdan con lo reportado por Frías y cols. (23), quienes encontraron aumento de la frecuencia de aberraciones inducidas en células AF tratadas primero con MMC y después con BrdU, dicho incremento en la frecuencia de aberraciones fue diez veces mayor al observado con el tratamiento de MMC sola, lo que sugirió la existencia de sinergismo. De acuerdo con nuestros resultados en las células de los pacientes con AF no se puede apoyar la existencia de sinergismo entre ambos agentes. Un hallazgo muy constante, sin embargo, fue que siempre que existió un lapso mínimo de 24 horas entre la exposición de la MMC y la cosecha, la frecuencia de aberraciones fue significativamente mayor que en los experimentos donde no se dio tal lapso, independientemente de la acción de la BrdU incorporada o presente en el medio. Esta diferencia se puede observar en la Fig. 4, donde

en los experimentos #3, #4, #5 y #6 existe un aumento en la frecuencia de las aberraciones sin importar si se les trató con BraU o no.

Estos resultados podrían indicar que en células de AF existe una reparación deficiente del ADN. Dutrillaux en 1982 (52) reportó que en estas células el ciclo celular es más largo, con una fase G_2 que dura aproximadamente el doble que la de las células normales (52) y cuando se someten a la acción de agentes alquilantes, la fase G_2 más larga presenta una mayor cantidad de aberraciones, principalmente cromatídicas, las cuales se forman después de la replicación del ADN (53).

Como se puede apreciar en las tablas 5, 7, 9 y 11, se encontró una mayor cantidad de figuras radiales, figuras complejas, anillos y dicéntricos en los experimentos #3, #4, #5 y #6; y el número de ab/cel. aumentó a partir de los mismos (tablas 4, 6, 8 y 10), lo cual indica que las células AF de estos experimentos fueron más dañadas.

En el presente trabajo, en los experimentos #3, #4, #5 y #6, las células de AF se trataron con MMC, que causa daño al ADN en la fase S, al retirar la MMC y mantener a los cultivos 24 horas más en incubación, es posible que hayamos cosechado las células más retrasadas en la fase de G_2 y por lo tanto, las más dañadas, y por esta razón la frecuencia de aberraciones en estos experimentos fue alta y semejante lo que no indica sinergismo. Esto aunado al hecho de que la mayoría de las aberraciones cromosómicas que encontramos son del tipo cromatídico (tablas 5, 7, 9 y 11), está de acuerdo

con la hipótesis de que el defecto básico en AF es una alteración en la reparación post-replicativa.

Por otra parte, se debe considerar la posibilidad de que el aumento en la frecuencia de aberraciones podría deberse no sólo a la posición del pulso de MMC en nuestros cultivos, sino también a la oxigenación que recibieron las células cuando se lavaron en los experimentos #3, #4, #5 y #6 ya que diversos estudios han demostrado que un exceso de oxígeno es altamente tóxico para la células AF (54, 55), y que cuando se les trata con agentes antioxidantes, la frecuencia de aberraciones disminuye considerablemente, de manera que los radicales libres generados por el metabolismo del oxígeno pueden dañar directamente a la cromatina o impedir el correcto funcionamiento de las enzimas de reparación (16, 32). Sin embargo, al igual que en este trabajo, las observaciones de Sabatier y Dutrillaux (53) mostraron que las células con AF con G2 más larga presentan una mayor cantidad de aberraciones, estos autores obtuvieron sus resultados en células que no estuvieron en contacto con oxígeno, hasta su cosecha.

Por lo anterior, pensamos que nuestros resultados son debidos a una reparación post-replicativa deficiente más que a una oxigenación en los cultivos.

El hecho de haber encontrado una gran cantidad de aberraciones en los cultivos donde se dio un lapso mínimo de 24 horas después del tratamiento con MMC, indica que es conveniente realizar este tipo de estudios, ya que esta

respuesta de las células puede ser útil para corroborar el diagnóstico de la enfermedad, sobre todo en aquellos casos en los cuales el cuadro clínico del paciente y la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas, si bien son sugestivos, no son concluyentes. Actualmente algunos estudios para diagnóstica y clasificación de células de AF incluyen pruebas de tensión de oxígeno, niveles de SOD, actividad de la ligasa, niveles de NADPH y escisión de timinas además de la prueba con MMC (14, 56); la MMC se ha utilizado también para obtener información adicional sobre la sensibilidad a agentes clastogénicos de homocigotos y heterocigotos (24), por lo que una prueba con MMC como la realizada en este trabajo podría proporcionar resultados más claros en cuanto al diagnóstico de cierto tipo de pacientes con AF.

VII. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con nuestros resultados, no se encontró sinergismo entre MMC y BrdU en células testigo.
2. Existe variabilidad en la respuesta de cada uno de los pacientes AF, con respecto a los diferentes experimentos efectuados.
3. El presente trabajo no apoya la existencia de sinergismo entre MMC y BrdU como una característica generalizada en AF.
4. El cosechar las células 24 horas después del tratamiento con MMC, permite recuperar células con daño cromosómico significativamente mayor que cuando la cosecha es inmediata al pulso y por lo tanto se

puede utilizar como una prueba para diagnosticar citogenéticamente la enfermedad.

5. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el defecto básico molecular en la AF es una deficiencia en la reparación post-replicativa del ADN.

REFERENCIAS

1. Salomon, M.A.: Developmental defects and syndromes. HM + M Publishers LTD, 1978.
2. Lambert, W.C.: Genetics diseases associated with DNA chromosomal instability. *Derm. Clin.* 5:85-108, 1982.
3. Molina, B.: Heterogeneidad genética en Anemia de Fanconi. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, 1990.
4. Smith, D.W.: Recognizable patterns of human malformation. W.B. Saunder Company, 1982.
5. Kelly, T.E.: Clinical genetics and genetics counseling. Year Book Medical Publishers, INC., 1980.
6. Bushkell, L.L., Kersey, H.L. y Cervenka, J.: Chromosomal breaks in T and B lymphocytes in Fanconi's anemia. *Clin. Gen.* 9:583-587, 1976.
7. 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.
8. Kano, Y., Fujiwara, Y.: Roles of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister chromatid exchange and higher induction in Fanconi anemia cells. *Mut. Res.* 81:365-370, 1981.
9. Zakrzewski, S. y Sperling, K.: Antagonistic effect of cocultivation of MMC induced aberration rate in cells of patients with Fanconi's anemia. *Hum. Genet.* 56:85-88, 1980.

10. Cohen, M.M., Simpson, S.J., Honing, G.R., Maurer, H. S., Nicklas, J.W. and Martin, A.O.: The identification of Fanconi anemia genotypes by clastogenic stress. *Am. J. Hum. Genet.* 34:794-810, 1982.
11. Nowel, P.C.: Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin C in human leukocyte cultures. *Exp. Cell. Res.* 33:445-449, 1984.
12. Sasaki, M.S. and Tanomura, A.: A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross linking agents. *Cancer Res.* 33:1829-1836, 1973.
13. Novotná, B., Goets, P. and Nadezda, I.S.: Effects of alkylating agents on lymphocytes from controls and from patients with Fanconi's anemia. *Hum. Genet.* 49:41-50, 1979.
14. Poll, E.H.A., Arwert, F., Joenje, H. and Wanamarta, A.H.: Differential sensitivity of Fanconi's anemia lymphocytes to the clastogenic action of Cis-diammine dichloroplatinum II and Trans-diamminedichloroplatinum II. *Hum. Genet.* 71:206-210, 1985.
15. Bender, M.A.: Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production, in: *DNA repair and Mutagenesis in eukaryotes*. Ed: Generoso W.M., Shelby MD and de Serres F.J. New York, Plenum Publ. Corp. 1980.
16. Klocker, H., Burstcher, H.J., Auerbach, B., Hirsh-kauffman, M.: Fibroblasts of patients with Fanconi's anemia are not deficient in excision of thymidine dimer. *Eu. Jour. Cell. Biol.* 37:240-244, 1985.

17. Sasaki, M.S.: Fanconi's anemia, a condition possibly associated with defective DNA repair, in: DNA repair Mechanisms. In Hanwait PC, Friedberg EC, Fox CF (eds.) New York, Academic Press, 1978.
18. De Koning, J. and Schoeder, T.M.: Clinical and genetic aspects of Fanconi's anemia. Abstracts from workshop at free university. Clin. Genet. 25:205-213, 1984.
19. Frías, S., Carnevale, A., Molina, B. y Del Castillo, V.: Estudio de heterogeneidad genética en Anemia de Fanconi por medio de la adición de plasma. Rev. Inv. Clín. (Méx.), 38:269-271, 1986.
20. Zackzewsky, S. y Sperling, K.: Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell-híbrids cell-híbrids. Hum. Genet. 56:81-84, 1980.
21. Moustacchi, E., Papadopulo, D., Diatloff-Zito, C. and Buchwald, M.: Two complementation groups of Fanconi's anemia differ in their phenotypic response to a DNA-cross linking treatment. Hum. Genet. 75:45-47, 1987.
22. Carnevale, A. y Frías, S.: Efecto de la cocultivación la adición de plasma normal sobre la respuesta a la mitomicina-C de los linfocitos de Anemia de Fanconi. Rev. Inv. Clín. (Méx.) 37:31-34, 1985.
23. Frías, S., Carnevale, A. y Molina, B.: Sinergismo Bromodesoxiuridina - Mitomicina C en la producción de aberraciones cromosómicas en Anemia de Fanconi. Rev. Inv. Clín. (Méx.) 41:31-35, 1989.
24. Sasaki, M.S.: Fanconi's anemia defective in a process essential to the repair of DNA cross links? Nature. 257:501-503, 1975.

25. Poon, P.K., O'Brien, R.L. y Parker, J.W.: Defective DNA repair in Fanconi's anemia. *Nature*, 250:223-225, 1974.
26. Dutrillaux, B., Dubos, C., Viegas-Pequinot, E. y Buirot, D.: Partial endoreduplication: A new cytogenetic anomaly possibly related to a DNA repair defect. *Ann. Genet.* 22:25-28, 1979.
27. Berger, R., Bernheim, A., De Coniat, M., Vecchione, D. y Schaison, G.: Chromosomal studies of leukemic and pre-leukemic Fanconi's anemia patients. *Hum. Genet.* 56:59-62, 1980.
28. Gille, J.P., Wotelboer, M.H. y Joenje, H.: Antioxidant status of Fanconi anemia fibroblast. *Hum. Genet.* 77:28-31, 1987.
29. Joenje, H., Artwert, F., Erickson, F., De Koning, A.W.M. y Costra, A.B.: Oxygen dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature*. 290:142-143, 1981.
30. Joenje, H.: Letter to the editor. *Lancet*. 1:28, 1978.
31. Porfirio, B., Ambrosio, G., Issachi, G. y Dallapicola, B.: Partial correction of chromosome instability in Fanconi anemia by desferrioxamina. *Hum. Genet.* 83:49-51, 1989.
32. Raj, A.S. y Heddle, S.: The effect of superoxide dismutase, catalase and L-cysteine on spontaneous and mitomycin C induced chromosomal breakage in Fanconi's anemia abnormal fibroblasts as measured by the micronucleus methods. *Mut. Res.* 78:59-66, 1980.
33. Wunder, E.: Further studies on compartmentalization of DNA-topoisomerase I in Fanconi anemia tissue. *Hum. Genet.* 58:149-155, 1981.

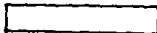






34. Wunder, E., Burtghardt, U., Lang y Hamilton, L.: Fanconi's anemia: Anomaly of enzyme passage through the nuclear membrane? *Hum. Genet.* 58:149-155, 1981.
35. Cervenka, J. and Hirish, A.B.: Cytogenetic differentiation of Fanconi anemia, "idiopathic" aplastic anemia and Fanconi anemia heterozygotes. *Am. J. Med. Genet.* 15:211-223, 1983.
36. Voss, R., Kohn, G., Shaham, M., Benzor, Z., Arnon, J., Ornoy, A., Yaffe, H., Globus, M. and Auerbach, A.: Prenatal diagnosis of Fanconis anemia. *Clin. Genet.* 20:185-190, 1981.
37. Remers, A.W.: Mitomycin C an analog development, in: *Mitomycins C current status and new developments.* Ed. Carter S.K. Crook S.T. New York Acad. Press. 1979.
38. Lown, J.W.: The molecular mechanism of antitumor active of the mitomycins in: *Mitomycin C. Current status and new developments,* Ed. Carter S.K. and Crook S.T. New York. Acad. Press. 1979.
39. Blanco, M.: Reparación del material genético. *Inv. Ci. (Barcelona)*, 40:6-15, 1980.
40. Schendel, P.F. and Isaac, M.: A model for the mechanism of alkylation mutagenesis. *Mut. Res.* 125:1-14, 1984.
41. Palitti, F., Tanzarella, C. and Degrassi, F.: Formation of chromatid type aberrations in G2 stage of the cell cycle. *Mut. Res.* 110:343-350, 1983.
42. Claassen, E., Kortbeek, H. and Artwert, F.: Effects of mitomycin C on the rate of DNA synthesis in normal and Fanconi anemia cells. *Mut. Res.* 165:15-19, 1985.

43. Ishii, Y.: Nature of the mitomycin-C induced lesions causing sister chromatid exchange. *Mut. Res.* 91:51-52, 1981.
44. Plooy, A. C. M.: Formation and repair of DNA interstrand cross-links in relation to cytotoxicity and unscheduled DNA synthesis induced in control and mutant human cells treated with Cis-diammine dichloroplatinum II (Cis-platino). *Cáncer. Res* 45:4178-4184, 1985.
45. Davidson, R.L., Kauffman, E.R., Dougherty, C.P., Overleete, A.M., Difolco, C.M. and Latt, S.A.: Induction of sister chromatid exchanges by BrdU is largely independent of BrdU content of DNA. *Nature.* 284:74-76, 1985.
46. Reinhard, E.: *Biología farmacéutica.* p. 100. Ed. Manuel Company, 1983.
47. Latt, S.A., Stelen, G., Joergens, L.A., Buchanan, G.R., Gerald, P.S.: Induction by alkylating agents of sister chromatid breaks in Fanconi's anemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72:4066-4070, 1975.
48. Bianchi, N. O. and Larramendi, M.L.: The effects of incorporated tritium and Bromodesoxyuridine on the frequency of sister chromatid exchanges. *Chromosoma (Berl.)*, 88:11-15, 1983.
49. Frazelle, H., Harris, J.S. and Swift, M.: response of Fanconi anemia fibroblasts to adenine and purine analogues *Mut. Res.* 80:373-378, 1981.
50. Miller, R.T. *Simultaneous statistical inference.* New York. McGraw Hill Book Co., 1968.
51. Fujiwara, Y.: Defective repair of mitomycin-C crosslinks in Fanconi anemia and loss in confluent normal human and Xeroderma pigmentosum cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 699:217-225, 1982.

52. Dutrillaux, B., Aunas, A., Dutrillaux, A.M., Buftot, D. and Prieur, M.: The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum. Genet.* 62:327-332, 1982.
53. Sabatier, L. and Dutrillaux, B.: Effect of caffeine in Fanconi anemia. *Hum. Genet.* 79:242-244, 1988.
54. Joenje, H., Erickson, A.W., Franks, R.R., Artwert, F. and Hoywen, B.: Eritrocyte superoxidodismutase deficiency in Fanconi's anemia. *Lancet.* 1: p. 24, 1978.
55. Izacovic, V., Sterbakcova, E., Kaiserova, E. and Krizan, P.: Bovine superoxide dismutase in Fanconi anemia, Therapeutic trial in two patients. *Hum. Genet.* 70:181-182, 1985.
56. Digweed, M., Zakrzewski, S. and Sperling, K.: Fanconi's anemia: Correlation of genetic complementation group with psoralen/UVA response. *Hum. Genet.* 78:51-54, 1988.

TABLA 1

FRECUENCIA DE ABERRACIONES INDUCIDAS POR MITOMICINA C Y BROMODESOXIURIDINA EN 4 PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI Y TESTIGO

Experimento	Testigo	AF(MA)	AF(YA)	AF(CL)	AF(RI)	X	S	
Testigo		0.04	0.24	0.46	0.14	1.04	0.47	0.40
1		0.26	0.82	0.92	0.56	0.94	0.81	0.17
2		0.48	0.92	1.68	0.88	3.42	1.72	1.18
3		0.48	3.72	4.82	3.76	7.38	4.92	1.71
4		0.18	5.80	5.94	2.10	6.98	5.20	2.30
5		0.36	2.38	7.10	4.08	7.09	5.38	2.60
6		0.76	6.94	5.28	7.90	5.50	6.40	1.23




	Medio de cultivo no suplementado
	Medio de cultivo suplementado con 40 ng/ml de MMC
	Medio de cultivo suplementado con 10 µg/ml de BrdU

TABLA 2

DISTRIBUCION DEL NUMERO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS
EN 50 CELULAS DE CADA EXPERIMENTO EN EL SUJETO TESTIGO

#ab	0	1	2	3	4	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	inctb	total ab.
Control	48	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
exp. 1	37	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
exp. 2	37	7	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
exp. 3	31	14	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
exp. 4	42	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
exp. 5	35	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18
exp. 6	25	16	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38

TABLA 3

TIPO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN 50 CELULAS
DEL SUJETO TESTIGO

	rupt. crom.	frag.	anl. y dic.	fig. rad.	fig. com.	inctb.	total.	frec. ab/cel.
Control	2	0	0	0	0	0	2	0.04
exp. 1	13	0	0	0	0	0	13	0.26
exp. 2	22	1	0	0	1	0	24	0.48
exp. 3	19	2	0	3	0	0	24	0.48
exp. 4	8	1	0	0	0	0	9	0.18
exp. 5	14	2	0	2	0	0	18	0.36
exp. 6	35	1	0	2	0	0	38	0.76

TABLA 4

DISTRIBUCION DEL NUMERO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS
EN 50 CELULAS DE CADA EXPERIMENTO EN AF (MA)

#ab	0	1	2	3	4	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	inctb	total ab.
Control	40	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
exp. 1	30	9	4	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41
exp. 2	30	8	5	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	46
exp. 3	9	7	10	9	3	1	1	2	3	0	0	0	0	2	0	3	186
exp. 4	6	2	6	5	4	5	3	1	6	0	1	3	4	2	0	2	290
exp. 5	12	19	5	5	1	0	2	0	1	2	1	1	1	0	0	0	119
exp. 6	3	8	0	7	6	5	1	0	1	2	1	1	2	1	1	11	347

TABLA 5

TIPO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN 50 CELULAS
DE AF (MA)

	rupt. crom.	frag.	anl. y dic.	fig. rad.	fig. com.	inctb.	total.	frec. ab/cel.
Control	11	1	0	0	0	0	12	0.24
exp. 1	30	3	0	6	2	0	41	0.82
exp. 2	31	4	0	10	1	0	46	0.92
exp. 3	109	7	0	24	1	45	186	3.72
exp. 4	194	21	6	36	3	30	290	5.80
exp. 5	90	7	4	18	0	0	119	2.38
exp. 6	128	12	1	38	3	165	347	6.94

TABLA 6

DISTRIBUCION DEL NUMERO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS
EN 50 CELULAS DE CADA EXPERIMENTO EN AF (YA)

#ab	0	1	2	3	4	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	inctb	total ab.
Control	36	10	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23
exp. 1	19	19	9	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46
exp. 2	17	16	7	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84
exp. 3	7	5	10	6	1	3	2	5	3	1	0	1	0	1	0	5	241
exp. 4	5	2	6	5	9	2	0	6	2	1	1	3	2	0	2	4	297
exp. 5	2	5	7	2	1	5	4	3	5	1	2	2	0	0	0	11	355
exp. 6	6	6	2	6	4	6	3	3	6	0	3	0	0	0	2	3	264

TABLA 7

TIPO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN 50 CELULAS
DE AF (YA)

	rupt. crom.	frag.	ani. y dic.	fig. rad.	fig. com.	inctb.	total.	frec. ab/cel.
Control	22	1	0	0	0	0	23	0.46
exp. 1	38	2	0	3	2	0	46	0.92
exp. 2	44	6	0	19	0	15	84	1.68
exp. 3	128	8	2	27	1	75	241	4.82
exp. 4	177	11	4	41	4	60	297	5.94
exp. 5	134	16	4	33	3	165	355	7.10
exp. 6	157	18	2	38	4	45	264	5.38

TABLA 8

DISTRIBUCION DEL NUMERO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS
EN 50 CELULAS DE CADA EXPERIMENTO EN AF (CL)

#ab	0	1	2	3	4	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	inctb	total ab.
Control	43	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
exp. 1	29	14	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28
exp. 2	19	23	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43
exp. 3	8	9	11	2	4	5	3	0	2	1	0	1	1	0	1	2	188
exp. 4	12	13	5	9	8	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	105
exp. 5	11	7	9	2	3	2	2	4	4	0	1	1	0	1	0	3	204
exp. 6	2	4	4	3	2	3	4	2	2	5	4	1	2	1	1	10	395

TABLA 9

TIPO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN 50 CELULAS
DE AF (CL)

	rupt. crom.	frag.	ani. y dic.	fig. rad.	fig. com.	inctb.	total.	frec. ab/cel.
Control	22	1	0	0	0	0	23	0.46
exp. 1	24	2	0	2	0	0	28	0.56
exp. 2	39	0	1	3	0	0	43	0.86
exp. 3	118	14	0	26	0	30	188	3.76
exp. 4	80	5	0	20	0	0	105	2.10
exp. 5	110	14	1	34	0	45	204	4.08
exp. 6	166	36	1	42	0	150	395	7.90

TABLA 10

DISTRIBUCION DEL NUMERO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS
EN 50 CELULAS DE CADA EXPERIMENTO EN AF (R1)

#ab	0	1	2	3	4	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	inctb	total ab.
Control	25	9	10	4	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	52
exp. 1	23	15	9	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	47
exp. 2	6	6	10	13	4	3	0	3	1	0	2	1	0	0	0	1	171
exp. 3	0	3	4	6	4	7	5	0	3	2	1	2	2	2	0	9	369
exp. 4	2	3	3	5	4	5	4	1	2	3	7	4	1	3	0	3	349
exp. 5	0	0	5	2	4	7	2	8	3	4	2	0	3	1	1	8	398
exp. 6	2	6	11	5	6	1	2	4	2	0	0	2	3	0	1	5	275

TABLA 11

TIPO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN 50 CELULAS
DE AF (R1)

	rupt. crom.	frag.	ani. y dic.	fig. rad.	fig. com.	inctb.	total.	frec. ab/cel.
Control	36	0	1	6	0	0	52	1.04
exp. 1	38	3	0	5	1	0	47	0.94
exp. 2	128	11	2	15	0	15	171	3.42
exp. 3	189	8	3	33	1	135	369	7.38
exp. 4	215	19	6	62	2	45	349	6.98
exp. 5	201	17	3	53	4	120	398	7.96
exp. 6	149	21	3	23	4	75	275	5.50

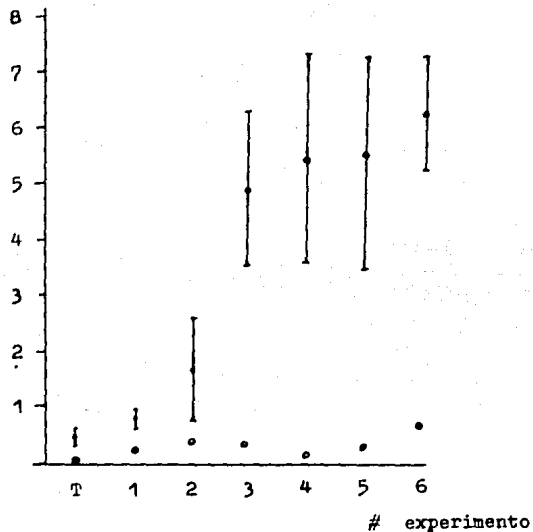


fig.4 - Distribución de los promedios de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en 4 pacientes con Anemia de Fanconi y un testigo .

□ = Testigo

• = AF

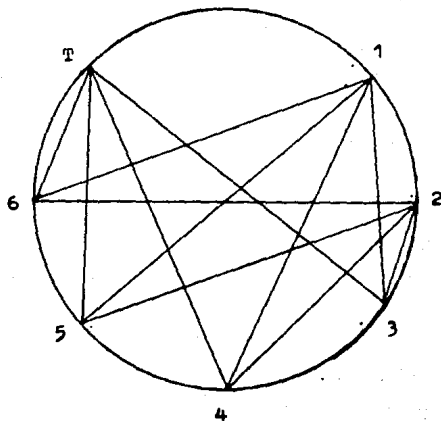


fig.5 - Análisis estadístico:

Prueba para comparaciones múltiples de intervalos , para el método de Friedman. ——— la línea continua indica que hay diferencia significativa con una $p < 0.05$

T = Testigo

1-6 = Experimentos