

72  
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFEECTO DE LA ADICION DE MEDIOS CONDICIONADOS  
SOBRE LA RESPUESTA A LA MITOMICINA- C DE LOS  
LINFOCITOS DE 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 :**

**LAURA GOMEZ LAGUNA**

**MEXICO, D.F.**

**1982**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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**

	<b>NO PAGINA</b>
<b>I.- RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>II.- INTRODUCCION</b>	
<b>1. ASPECTOS CLINICOS DE LA ANEMIA DE FANCONI.</b>	<b>3</b>
<b>2. ASPECTOS CITOGENETICOS.</b>	<b>4</b>
<b>3. LA MITOMICINA -C.</b>	<b>5</b>
<b>4. ASPECTOS MOLECULARES</b>	<b>7</b>
<b>III.- OBJETIVO E HIPOTESIS</b>	<b>11</b>
<b>IV.- MATERIAL Y METODO</b>	<b>12</b>
<b>V.- RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>VI.- DISCUSION</b>	<b>22</b>
<b>VII.- CONCLUSIONES</b>	<b>24</b>
<b>VIII.-REFERENCIAS</b>	<b>25</b>

## RESUMEN

La anemia de Fanconi es una enfermedad autosómica recesiva que pertenece a los síndromes de inestabilidad cromosómica. Las células de estos pacientes son hipersensibles a agentes alquilantes bifuncionales como la mitomicina C. Hay evidencias de que la alteración básica de esta enfermedad está a nivel de la reparación del ADN. En un estudio previo se observó que el plasma normal tiene un factor difusible capaz de disminuir las aberraciones cromosómicas en las células de anemia de Fanconi tratadas con mitomicina -C. En el presente trabajo, se investigó si este factor de corrección puede ser producido por células normales *in vitro* y si pertenece a un sistema inducible de reparación (probablemente deficiente en la anemia de Fanconi). Para esto se utilizaron medios condicionados por células normales con diferentes tratamientos que se agregaron a los cultivos de las células de anemia de Fanconi las últimas 24 horas. La forma de identificar la presencia e inducción del factor se hizo a través del efecto de corrección de la frecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por la mitomicina-C en células de pacientes con AF. Los resultados indican que solo los medios condicionados que contienen plasma normal pueden producir de forma constante el efecto de corrección.

## INTRODUCCION

### ASPECTOS CLINICOS

La anemia de Fanconi (AF), se reportó por primera vez en 1927 por el doctor Guido Fanconi profesor de pediatría y director del hospital infantil de Zurich, quien describió a tres hermanos que murieron de anemia y presentaban además retraso en el crecimiento, microcefalia, hiperpigmentación de la piel, hiperreflexia, hipoplasia genital y anomalías esqueléticas de radio y pulgar. (1)

Actualmente, se sabe que esta enfermedad sigue un patrón de herencia autosómico recesivo con una frecuencia aproximada de uno de cada 360 000 individuos (2,3). Los estudios del padecimiento han mostrado que el cuadro clínico es muy variable; las características clínicas más comunes se señalan a continuación:

Los pacientes desarrollan pancitopenia entre los 5 y 10 años de edad, aunque hay un grupo que la presenta en la adolescencia e incluso en edad adulta. Esta pancitopenia se produce por una falla progresiva en la médula ósea, comprende todos los tipos celulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y produce anemia, leucopenia y/o trombocitopenia, lo que conduce a un alto riesgo de infecciones y hemorragias. Con frecuencia se ha observado un incremento en el número de macrófagos, lo cual indica hemofagocitosis.

La mayoría de los casos presenta hiperpigmentación de la piel, la cual puede ser generalizada y/o con manchas café oscuro de tamaño variable principalmente en el tronco. También puede haber zonas pequeñas de hipopigmentación.

Las alteraciones esqueléticas más comunes son las de radio y pulgar en el 60% de los casos. El pulgar puede estar ausente, rudimentario, trifalángico o carecer del primer metacarpiano; la ausencia del pulgar se puede asociar con la falta de radio y pueden estar afectados ambos brazos. Otras alteraciones esqueléticas son la microcefalia, micrognatia y microftalmia, así como cambios en los centros de osificación y adelgazamiento de las falanges.

La mayoría de los casos presentan bajo peso al nacimiento y retraso en el crecimiento.

Las anomalías renales son comunes y consisten en riñón pélvico y riñón en herradura, lo que puede producir pielonefritis por vía retrógrada.

Por lo general los pacientes no tienen problemas neurológicos, sin embargo algunos casos presentan hiperreflexia y/o retraso mental.

En el sexo masculino es frecuente la hipoplasia genital y la criptorquidia.

Los pacientes con AF tienen alto riesgo de desarrollar leucemia, la más frecuente es la mieloblástica aguda, aunque también se presenta la monoblástica, la eritroleucemia y la leucemia aguda no linfoblástica. A pesar de que la susceptibilidad a cambios malignos está confinada principalmente al sistema hematopoyético, también se ha descrito cáncer del sistema gastrointestinal y carcinoma hepatocelular.

Aún no se ha encontrado un manejo terapéutico adecuado para estos pacientes. El tratamiento para la pancitopenia consiste en transfusiones de paquete celular, las cuales sólo producen bienestar temporal al paciente. Por otra parte, para estimular la proliferación de las células sanguíneas, se administran andrógenos por largos períodos de tiempo, sin embargo, este régimen de tratamiento se ha asociado con neoplasia hepática y con leucemia, por lo que se ha postulado que el incremento en la incidencia de estos procesos malignos es el resultado de la terapia con andrógenos más que la consecuencia del defecto básico de la enfermedad. La falla en médula ósea no se puede suplir por trasplante por la hipersensibilidad de estos pacientes a los inmunosupresores que deben administrarse para que no haya rechazo del tejido huésped (4).

#### **ASPECTOS CITOGENETICOS**

La AF pertenece al grupo de los síndromes con inestabilidad cromosómica junto con la Ataxia Talangiectasia, el síndrome de Bloom y el Xeroderma Pigmentoso, entre otros. Todos estos síndromes son autosómicos recesivos, con la característica de presentar rompimientos cromosómicos espontáneos y/o inducidos por hipersensibilidad a agentes físicos y químicos, así como predisposición al desarrollo de neoplasias.(5).

La inestabilidad cromosómica en AF fue observada por primera vez en 1964 por Schroeder y colaboradores (6). Los linfocitos de estos pacientes se caracterizan por presentar de manera espontánea rupturas cromatídicas y "gaps" y con menor frecuencia rupturas cromosómicas, fragmentos y multirradios entre cromosomas no homólogos. También se pueden observar otras anomalías como alta frecuencia de endorreducción y formación de micronúcleos.

La inestabilidad cromosómica también se pone de manifiesto en cultivos de fibroblastos y preparaciones de médula ósea; en esta última se han reportado clones de rearreglos cromosómicos, aunque no son características del padecimiento.

El intercambio de cromátidas hermanas no está incrementado en estos pacientes con respecto a los normales. (7)

Cuando las células AF se tratan con agentes alquilantes bifuncionales, como la mitomicina-C (MMC), el diepoxibutano, la mostaza de nitrógeno, el 8-metoxipsoralen activado con luz ultravioleta, la ciclofosfamida o el cis-diaminodicloroplatino, presentan frecuencias de rompimientos cromosómicos significativamente mayores que las que se encuentran en células normales. (8). La especificidad al daño producido por los agentes alquilantes bifuncionales se ha utilizado para el diagnóstico de esta enfermedad (9,10).

Los radicales libres también se han propuesto como agentes clastógenos a los que las células AF son hipersensibles. El butilhidroperóxido y el peróxido de hidrógeno inducen daño cromosómico en linfocitos AF y su efecto se reduce por tratamientos con antioxidantes. Además la frecuencia de aberraciones cromosómicas muestra una correlación positiva con la tensión de oxígeno por encima del 50%, concentración a la cual se genera una gran cantidad de radicales libres del oxígeno. (11, 12)

#### MITOMICINA - C

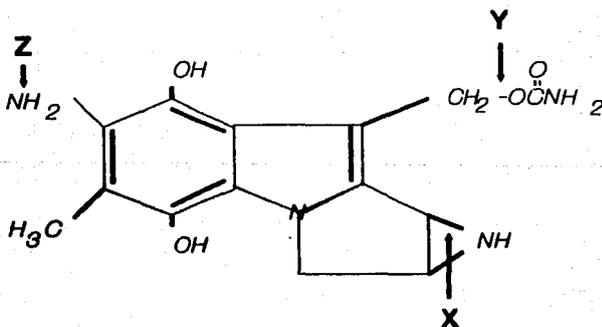
La Mitomicina-C fue aislada de *Streptomyces caespitosus*, forma cristalina azul violeta, tiene un peso molecular de 334 daltones y es soluble en agua y en solventes orgánicos. Es un agente alquilante y tiene tres grupos potencialmente activos: una quinona, un uretano y un anillo de aziridina.

Esta sustancia ha sido usada como antibiótico y agente antitumoral ya que inhibe la división en bacterias, células tumorales y líneas celulares en cultivo, los estudios sobre los efectos de la MMC demuestran que produce inhibición mitótica y las células que se dividen subsecuentemente a su exposición presentan aberraciones cromosómicas; su toxicidad es más efectiva durante la fase G1 tardía o S del ciclo celular.

LA MMC no reacciona por si misma con el ADN a menos que sea activada por reducción. Al incorporarse en la célula, la MMC se convierte a su forma reducida activa por un sistema reductasa dependiente de NADH. Esta reacción induce la activación en el anillo de aziridina y en el ion carbonico en la posición C<sub>10</sub>, (fig.1 posición X y Y respectivamente) y aunque estos dos sitios reactivos son suficientes para explicar su actividad como agente alquilante bifuncional, no se puede excluir un tercer sitio en el carbono 7 (fig.1 posición Z), el cual puede actuar como potenciador para la formación de enlaces cruzados en el ADN. La posición O<sub>6</sub> del residuo de guanina puede ser preferencialmente alquilado y eventualmente se pueden formar enlaces cruzados de residuos de guanina en hebras opuestas del DNA. Por esto, el grado de enlaces cruzados de MMC es proporcional al contenido de bases G-C en el ADN.

Cuando la MMC esta activada es un potente agente alquilante bifuncional o trifuncional e induce enlaces cruzados interhebra e intrahebra en el ADN, pero los enlaces interhebra tienen un efecto más deletéreo en la función y supervivencia celular (13-15).

**FIGURA 1**  
**ESTRUCTURA DE LA MITOMICINA-C**



Tomado de Iyer 1964.

## ASPECTOS MOLECULARES

El defecto básico en AF aún no se conoce, por lo que se han planteado varias hipótesis:

- 1.- Deficiencia de enzimas de protección contra radicales libres generados por el metabolismo del oxígeno (16-18).
- 2.- Alteración en el transporte a través de la envoltura nuclear de la topoisomerasa. (19,20).
- 3.- Defecto en la reparación del ADN. (21-23).

De estas tres hipótesis, la que cuenta con mas evidencia experimental es la última:

Se ha demostrado que las células AF son deficientes en la reparación de los enlaces cruzados producidos por la MMC (23); esto se corrobora en un estudio reciente donde se encontró que en genes de RNA ribosomal de linfoblastos AF, la eliminación de enlaces cruzados producidos por la MMC era del 30% 24 horas después del tratamiento y de 50% a las 48 horas, mientras que en las células normales era del 80% a las 24 horas y a las 48 ya casi no se detectaba este daño. (24)

Esta remoción defectuosa de enlaces cruzados puede tener consecuencias en la supervivencia celular y en el tiempo de ciclo celular, como pudo observarse cuando se trató a las células de estos pacientes con otro agente que produce enlaces cruzados, el 8-Metoxipsoralen más luz ultravioleta, ya que se encontró que no hay progresión de la síntesis de ADN tal vez por la persistencia de las lesiones causadas por estos agentes; estas mediciones han servido para identificar dos grupos de complementación: el A que no puede recuperar la tasa de síntesis normal y el B que se recupera después de un tiempo aproximado de 24 horas. (25).

Por otra parte, las aberraciones cromosómicas producidas por los agentes que forman enlaces cruzados, son principalmente de tipo cromatídico, lo que sugiere que ocurren en fase S y G2 del ciclo celular. En células AF se ha demostrado que la fase G2 es muy larga, aproximadamente el doble de la duración normal y las metafases de las células con G2 más lenta son las que presentan la frecuencia más alta de aberraciones cromosómicas. Este retraso en G2 puede corresponder al periodo de reparación postreplicativa que puede ser anormal en AF, ya que al utilizar cafeína que es un inhibidor de este tipo de reparación, se observa un ciclo celular más rápido debido a que G2 recupera su periodo normal (26).

Por lo anterior, las evidencias apuntan a que la posible alteración en AF esté en el mecanismo de reparación postreplicativo, del cual se conoce poco en células eucariontes en general y mucho menos en células de mamífero.

En bacterias el sistema de reparación post-replicativo está constituido por varias proteínas, entre ellas Rec-A. Esta proteína recibió su nombre debido a su capacidad de intercambiar hebras de ADN, posteriormente se le encontró otra función: cuando la células se tratan con radiación ultravioleta o con otro agente que produzca daño al ADN y bloquea la replicación, esta proteína causa la ruptura proteolítica de proteínas blanco responsables de la expresión de muchos genes, cuyos productos incluyen funciones de reparación.

Muchos tratamientos que dañan el ADN e inhiben la replicación en *E.coli* inducen una serie compleja de fenómenos conocidos como "Respuesta SOS". Esta respuesta de la célula para reparar el ADN dañado induce la síntesis de componentes del sistema de reparación por excisión y de la vía de reparación por recombinación o postreplicativa, además de inhibir la división celular.

El evento inicial en respuesta al daño es la activación de la función de proteasa de Rec-A que responde a ADN monohebra y requiere de ATP. Rec-A activada interactúa con un represor Lex-A de 22 000 daltones, codificado por el gen *lex-A*, la ruptura proteolítica de este represor induce los operones a los que la proteína Lex-A está normalmente unida.

Los genes blanco para la represión por Lex-A incluyen algunos de los genes que se conocen como parte de la respuesta SOS tales como *rec-A*, *lex-A*, *uvrA*, *uvrB*, *umuC*, *himA*, varios de ellos son constitutivos pero incrementan sus productos por ruptura de Lex-A.

Durante la inducción, Rec-A se incrementa de un nivel basal de aproximadamente 1200 moléculas por célula a un nivel 50 veces mayor, esto produce que todos los represores Lex-A estén rotos, ya que *lex-A* tiene represión autógena y al estar en estado de inducción también se produce en gran cantidad, así al desaparecer la señal de inducción, Rec-A pierde la capacidad de proteasa y en el medio quedan suficientes moléculas de represor para unirse a las cajas SOS y apagar la expresión de los genes que regula. (27).

En células de mamífero se han encontrado proteínas cuyas propiedades *in vitro* sugieren que pueden ser parte de un sistema de reparación inducible, las cuales son seleccionadas por sus semejanzas con las proteínas de la respuesta SOS de bacterias: baja abundancia, inducción rápida e incremento en la transcripción hasta de 10 veces, sin embargo la inducción de estos genes puede representar una respuesta a estres sin ser específicos de daño al ADN.

En el humano hay ejemplos de enfermedades en las que hay defectos en la reparación del ADN. El Xeroderma pigmentoso cuya característica es la hipersensibilidad a la luz ultravioleta y el daño severo en la piel, se atribuye a una falta en la reparación por excisión, ya que las células cultivadas de estos pacientes no muestran remoción de los dímeros de pirimidina y de otros aductos. El síndrome de Bloom cuyo cultivo celular se caracteriza por tener incrementado el número de intercambio de cromátidas, puede estar relacionado a la reparación por recombinación.

El hecho de que las células de Xeroderma pigmentoso tengan cerca de nueve veces mayor sensibilidad al daño producido por la luz ultravioleta que las células normales y las AF, indica que las células AF pueden reparar monoadductos, esto sugiere que en células de mamífero (a diferencia de bacterias) puede haber vías de reparación diferentes para el tipo de lesión al ADN y que las células AF son deficientes específicamente en la vía de remoción de enlaces cruzados (28).

En el estudio de los diferentes síndromes de inestabilidad cromosómica, se han identificado factores biológicos de dos tipos: 1.-Clastogénicos producidos por células anormales y 2.-Correctivos producidos por las células normales. Los primeros pueden ser consecuencia de la degradación anormal de sustratos o de la síntesis de un producto génico alterado, y al estar en contacto con células normales inducen la misma respuesta patológica que presentan las células que lo producen. Los factores correctivos son capaces de restaurar la función normal en las células defectuosas y pueden corresponder a las moléculas responsables de la complementación en los síndromes genéticos. La identificación y caracterización de ambos tipos de factores puede llevar al conocimiento de la actividad metabólica defectuosa del padecimiento e incluso a encontrar el gen dañado.

En el síndrome de Ataxia Talangiectasia se ha aislado un factor clastogénico del plasma, suero e inclusive del medio condicionado de estas células. El cultivo de células normales en presencia de este factor les produce un incremento de dos a cinco veces más rompimientos cromosómicos.

En el síndrome de Bloom también se ha reportado un factor clastogénico en el suero concentrado y el medio condicionado por las células de estos pacientes. La cocultivación de estas células con normales, induce elevada frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en las células normales; estos resultados han causado controversia, ya que también se han obtenido resultados negativos (3).

En AF diversos autores han encontrado que las células dañadas por MMC pueden ser restauradas parcialmente por cocultivación o hibridación con células normales (29). En estudios realizados en nuestro laboratorio con cocultivación de células AF con normales y cultivo de células AF solo con el plasma normal, se encontró que en ambos había disminución en las aberraciones cromosómicas producidas por la MMC en las células AF. Estos resultados sugirieron la existencia, en células normales de un factor corrector difusible, pues la sola presencia del plasma fue capaz de corregir parcialmente el daño y por tanto complementar el defecto inherente a las células AF (30).

Debido a que existen evidencias de que la alteración en AF está a nivel de la reparación postreplicativa y de que existe un factor difusible que es capaz de complementar parcialmente la falla, es probable que este factor pertenezca al sistema de reparación deficiente en la AF y sea de tipo inducible. Si es así entonces su producción puede ser estimulada en células normales por exposición de éstas a agentes clastogénicos como la MMC y la forma de identificar la presencia e inducción del factor puede ser a través del efecto de corrección sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por la MMC en células de AF.

**OBJETIVOS**

- 1.- Investigar si el factor de corrección presente en el plasma normal, puede ser producido por las células normales in vitro.
- 2.- Obtener evidencias de que el factor de corrección:
  - a) Pertenece a un sistema de reparación inducible del ADN.
  - b) Es difusible al medio de cultivo.
  - c) Es capaz de complementar a las células AF.

**HIPOTESIS**

Si el factor de corrección forma parte de un sistema de reparación inducible, entonces su producción en células normales será estimulada por la previa exposición a la MMC y se demostrará por su efecto de corrección de las aberraciones cromosómicas inducidas por MMC en células AF.

## **MATERIAL Y METODO**

Este trabajo se realizó con la cooperación voluntaria de un sujeto sano y cuatro pacientes con AF. El diagnóstico del padecimiento se estableció clínicamente: por presencia de pancitopenia, talla baja, hiperpigmentación de la piel y/o anomalías esqueléticas. Citogenéticamente: por inestabilidad cromosómica e hipersensibilidad a la acción de la MMC.

## **SIEMBRA**

En cada caso se obtuvo muestra de sangre periférica con una jeringa previamente heparinizada y se prepararon cultivos de linfocitos de la siguiente manera:

En frascos estériles de tipo antibiótico de 60 ml, se agregaron: 4.5 ml de medio Mc Coy 5a modificado, 0.25 ml de fitohemaglutinina, 0.02 ml de antibiótico (penicilina - estreptomycin) y 0.4 ml de la muestra de sangre, en estas condiciones se incubaron a 37°C.

A los cultivos de linfocitos AF se les agregaron 40 ng/ml de MMC a las 30 horas de incubación, se dejaron expuestos a este agente hasta las 54 horas, luego se lavaron 2 veces con solución isotónica (NaCl 0.9%) y los paquetes celulares se reincubaron con 4 diferentes tipos de medios condicionados por células normales y un control con medio Mc Coy, al concluir las 78 horas de cultivo se cosecharon.

## **PREPARACION DE MEDIOS CONDICIONADOS**

Los cultivos de células normales recibieron cuatro diferentes tratamientos:

- 1.-Cultivos que crecieron sin modificación en las condiciones ya mencionadas hasta las 54 horas.
- 2.-Cultivos que a las 30 horas de incubación se lavaron (con esto se eliminó el plasma autólogo) y el paquete celular se reincubó con 5 ml de medio Mc Coy hasta las 54 horas.
- 3.-Cultivos en los que se agregaron 80 ng/ml de MMC desde el inicio del cultivo, se lavaron a las 30 horas y se les agregó 5 ml de medio Mc Coy para reincubarlos 24 horas más.
- 4.-Cultivos que también crecieron las primeras 30 horas con 80 ng/ml de MMC, se lavaron y a los paquetes celulares se les agregó además de medio Mc Coy, 0.5 ml de plasma autólogo y se incubaron las últimas 24 horas.

Estos cuatro tipos de cultivos normales, una vez transcurridas las 54 horas de incubación se vaciaron a tubos de ensaye, se centrifugaron a 400g por 10 minutos, se desechó el paquete celular y el sobrenadante se utilizó como medio condicionado para suplementar a los cultivos de las células AF de las 54 a las 78 horas de incubación. (fig 2).

Con el experimento 1 se determinará la presencia del factor de corrección en el medio condicionado con plasma normal.

Con el experimento 2 se determinará si las células *in vitro* son capaces de producir el factor de corrección, ya que se elimina el plasma autólogo y se incuban 24 horas sólo con medio Mc Coy.

Con el experimento 3 se determinará si las células normales poseen un sistema inducible por la MMC, para producir el factor de corrección, pues se exponen al mutágeno desde el inicio del cultivo y luego se incuban en medio fresco sin plasma autologo durante 24 horas.

Con el experimento 4 se investigará si el factor de corrección pertenece a un sistema inducible y si es activo por si mismo o requiere de algún otro factor del plasma, para esto se exponen las células al mutageno igual que en el experimento anterior y despues de lavadas se incuban con medio Mc Coy y plasma autologo.

Tanto los cultivos AF como los normales se hicieron por duplicado.

#### COSECHA

La cosecha de las células AF se realizó por la técnica convencional: una hora antes del termino de incubación, a cada frasco de cultivo se le agregó 0.2 ml de colchicina a una concentración de 1mg/ml, transcurrida esta hora, los cultivos se vaciaron a tubos de ensaye y se centrifugaron a 400g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se incubó el paquete celular con 6 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M) a 37°C durante 10 minutos, después de los cuales se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se fijó el paquete celular con una solución de metanol : ácido acético (3:1), se dejaron reposar 10 minutos, luego se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante tantas veces como fue necesario, hasta obtener un paquete celular blanco y un sobrenadante transparente.

Las laminillas se prepararon por goteo del material celular en un portaobjetos y se fijaron a la flama, después de unos días de maduración se tiñeron las laminillas con Wriqth al 50% y Giemsa al 10% en buffer de fosfatos, 3 minutos en cada colorante.

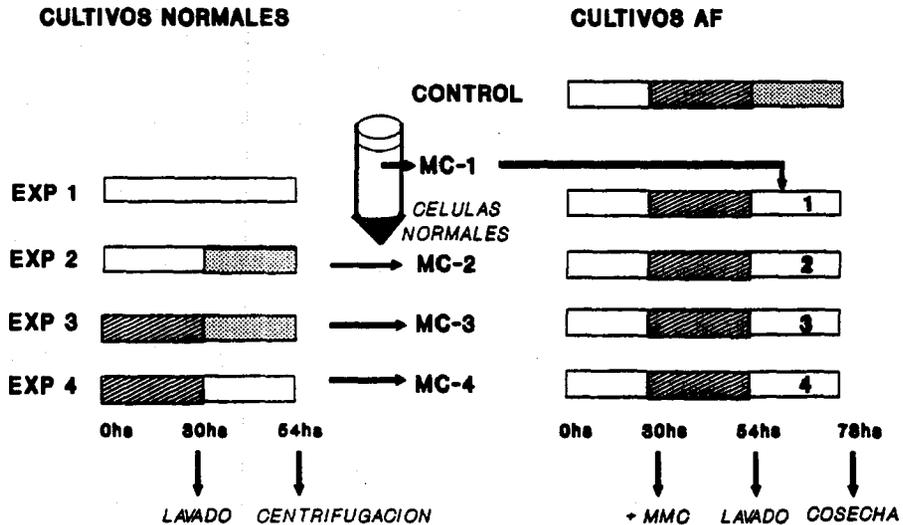
Las laminillas fueron codificadas por una persona ajena al estudio, para hacer un análisis ciego de éstas.

#### **ANALISIS**

Se analizaron 50 metafases por experimento, por paciente y se cuantificó el número de aberraciones cromosómicas, las cuales consistieron en rupturas: cromatídicas y cromosómicas, fragmentos: céntricos y acéntricos, anillos, dicéntricos y figuras radiales.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba no paramétrica para intervalos de comparaciones múltiples de Steel Dwass (31).

## FIGURA 2 ESQUEMA DE LA METODOLOGIA



-  **MEDIO NORMAL CON PLASMA AUTOLOGO**
-  **MEDIO NORMAL CON PLASMA AUTOLOGO Y MMC**
-  **MEDIO CONDICIONADO (MC)**
-  **MEDIO SIN PLASMA AUTOLOGO**

## RESULTADOS

En la tabla 1 se encuentran las frecuencias de aberraciones cromosómicas por célula encontradas en cada paciente para cada experimento.

En el experimento control, el promedio de los cuatro pacientes es de 6.6 aberraciones por célula y no hay variación significativa entre cada paciente. Esta frecuencia disminuyó en el experimento 1 donde el medio condicionado contenía el plasma de las células normales.

En el experimento 2, donde se eliminó el plasma autólogo y en el medio condicionado estaban solo los productos difusibles de las células normales sin tratamiento con MMC, se observó una frecuencia de aberraciones cromosómicas muy similar al control, en promedio 7.02 ab/cel.

En el experimento 3, donde el medio condicionado sin plasma tenía los productos difusibles de las células normales tratadas con MMC, se encontró que en dos pacientes (CL y ML) si hay complementación, ya que disminuye la frecuencia de aberraciones cromosómicas, sin embargo los otros dos pacientes (MA y FM) no muestran esta disminución.

Finalmente en el experimento 4 cuando el medio condicionado tenía los productos difusibles de las células normales tratadas con MMC y plasma normal, el promedio de los cuatro pacientes disminuyó a 3.6 ab/cel.

En las gráficas de distribución de las células con respecto al número de aberraciones por célula de cada paciente, se observa la tendencia hacia un número mayor de células con pocas aberraciones en los cultivos cuyos medios condicionados contienen plasma normal (experimentos 1 y 4). En los pacientes CL y ML esta tendencia se observa también en el experimento 3.

El análisis estadístico de esta distribución se realizó por la prueba de Steel Dwass que demostró diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0.05$  entre el control y los experimentos 1 y 4, así como entre el control y los pacientes CL y ML en el experimento 3.

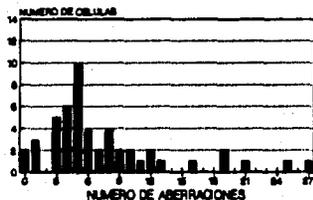
**TABLA 1**  
**FRECUENCIA DE ABERR/CEL EN CUATRO PACIENTES AF**

	PACIENTES			
	CL	ML	MA	FM
<b>CONTROL</b>	<b>7.60</b>	<b>6.30</b>	<b>6.34</b>	<b>6.26</b>
<b>EXP. 1</b>	<b>3.46*</b>	<b>3.30*</b>	<b>2.96*</b>	<b>4.44*</b>
<b>EXP. 2</b>	<b>7.02</b>	<b>6.40</b>	<b>7.66</b>	<b>----</b>
<b>EXP. 3</b>	<b>3.84*</b>	<b>3.96*</b>	<b>7.64</b>	<b>8.41</b>
<b>EXP. 4</b>	<b>2.90*</b>	<b>2.44*</b>	<b>4.29*</b>	<b>4.82*</b>

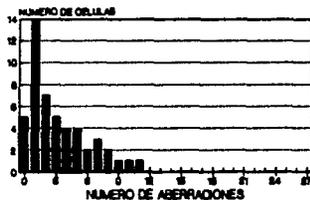
\* STEEL DUNN: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA  
 p: 0.05 CON RESPECTO AL CONTROL

## DISTRIBUCION DE LAS CELULAS AF(CL) CON RESPECTO AL No. DE ABERRACIONES

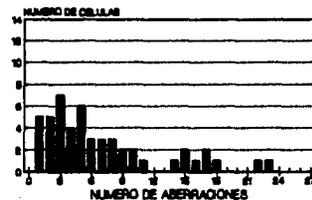
**CONTROL**



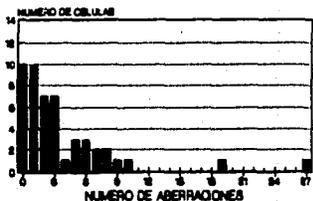
**EXPERIMENTO 1**



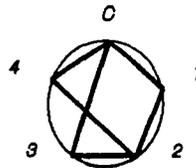
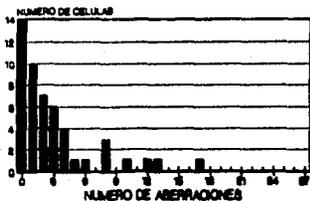
**EXPERIMENTO 2**



**EXPERIMENTO 3**



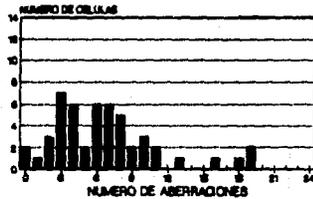
**EXPERIMENTO 4**



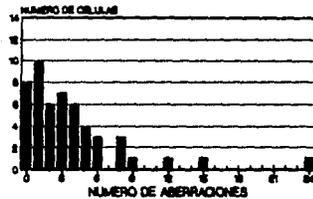
**PRUEBA DE STEEL DWASS**  
LA LINEA CONTINUA ENTRE CADA EXP.  
REPRESENTA DIFERENCIA ESTADISTICA  
SIGNIFICATIVA  $p < 0.05$

## DISTRIBUCION DE LAS CELULAS AF(ML) CON RESPECTO AL No. DE ABERRACIONES

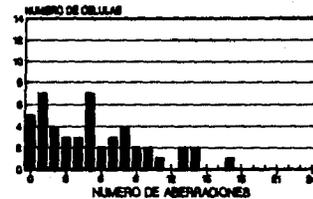
**CONTROL**



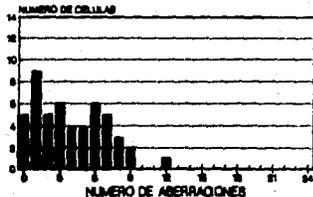
**EXPERIMENTO 1**



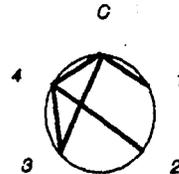
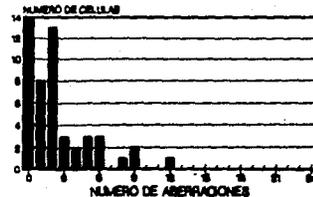
**EXPERIMENTO 2**



**EXPERIMENTO 3**



**EXPERIMENTO 4**



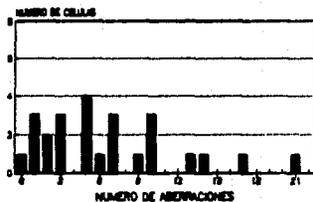
**PRUEBA DE STEEL DWASS**

LA LINEA CONTINUA ENTRE OADA EXP.  
REPRESENTA DIFERENCIA ESTADISTI-  
CAMENTE SIGNIFICATIVA  $p < 0.05$ .

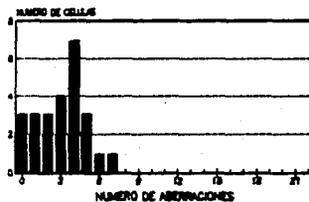
ESTA TESIS NO PUEDE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

## DISTRIBUCION DE LAS CELULAS AF(MA) CON RESPECTO AL No. DE ABERRACIONES

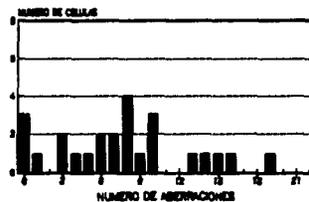
CONTROL



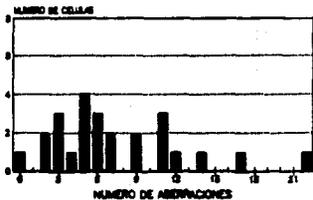
EXPERIMENTO 1



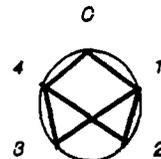
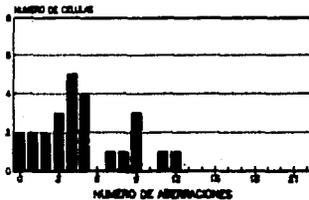
EXPERIMENTO 2



EXPERIMENTO 3



EXPERIMENTO 4

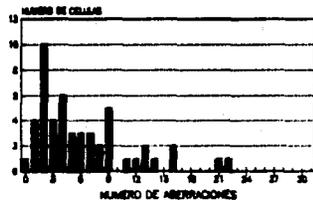


EN ESTE PACIENTE SOLO SE ANALIZARON  
25 METAFASES POR EXPERIMENTO

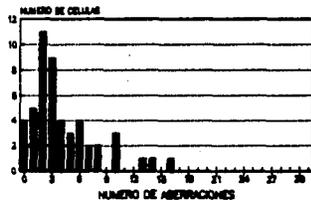
PRUEBA DE STEEL DWASS  
LA LINEA CONTINUA ENTRE CADA EXP.  
REPRESENTA DIFERENCIA ESTADISTICA  
GAMENTE SIGNIFICATIVA  $p < 0.05$

## DISTRIBUCION DE LAS CELULAS AF(FM) CON RESPECTO AL No. DE ABERRACIONES

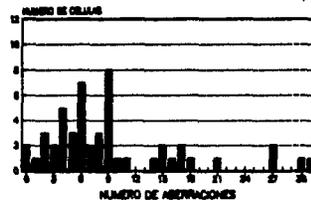
CONTROL



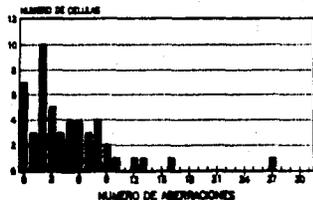
EXPERIMENTO 1



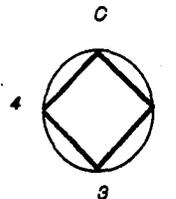
EXPERIMENTO 3



EXPERIMENTO 4



EN LOS CULTIVOS  
DEL EXPERIMENTO  
No. 2 NO HUBO  
CRECIMIENTO



**PRUEBA DE STEEL DWASS**  
LA LINEA CONTINUA ENTRE CADA EXP.  
REPRESENTA DIFERENCIA ESTADISTI-  
GAMENTE SIGNIFICATIVA  $p < 0.05$ .

## DISCUSION

En este trabajo, se utilizó la MMC como agente clastogénico por la ya probada hipersensibilidad de los cultivos AF a este agente y en todos los casos se observó la elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas esperada (Tabla 1 control).

Con el experimento 1 se corroboró la presencia del factor de corrección en el plasma normal. En estudios anteriores se había observado que la cocultivación de células AF con normales, producía disminución de las aberraciones cromosómicas en las células AF (29). Además, al agregar únicamente el plasma normal al cultivo Carnevale y Frías observaron el mismo efecto (30). En este experimento el cultivo de células normales conservó su plasma, por lo que era de esperarse una disminución de las aberraciones como la que se observa en los cuatro pacientes.

En el experimento 2 donde si se eliminó el plasma del cultivo normal, la frecuencia de aberraciones en células AF no mostró diferencia con respecto al control. Por lo tanto con este experimento no se demostró la presencia del factor de corrección en el medio condicionado por células normales. Es posible que este factor lo produzcan diferentes estirpes celulares del organismo y alcance una concentración tal en el plasma, que sea capaz de complementar a las células AF y que las células nucleadas (alrededor de 4 millones) en el cultivo normal no logren producir el factor en cantidades suficientes para que se observe disminución de las aberraciones cromosómicas en células AF.

El experimento 3 tuvo resultados variables ya que sólo en dos de los cuatro pacientes disminuyeron las aberraciones de manera comparable a aquellos en los que el medio condicionado tenía plasma normal, (exp. 1 y 4). Esta disminución sugirió, que al inducir daño con la MMC a las células normales, éstas habían producido el factor de corrección en cantidades mayores que en condiciones normales y que por tanto este factor podía pertenecer a un sistema inducible capaz de corregir parcialmente el defecto en AF. Sin embargo, puesto que los otros dos pacientes no mostraron disminución de aberraciones cromosómicas, no se puede sostener lo anterior. Esta diferencia entre los pacientes no puede explicarse por la heterogeneidad genética que se ha descrito en AF (32,33) ya que se hicieron repeticiones de todos los experimentos en dos pacientes y en el experimento 3 se encontró variación intraindividuo, por lo que debe haber variables que no se pudieron controlar, ya sea en el individuo voluntario normal o bien en los pacientes.

En los cultivos del experimento 4 se observó disminución de la frecuencia de aberraciones cromosómicas con respecto al control, sin embargo, esta disminución no fue significativamente diferente a la observada en el experimento 1. La diferencia entre el experimento 1 y el 4 fue que en el segundo las células normales estuvieron expuestas a la MMC para producir en mayor cantidad el factor de corrección si es que éste perteneciera a un sistema inducible. Por tanto estos resultados por un lado no demuestran que este factor sea inducible por MMC en células normales en cultivo y por otro indican que en el medio condicionado que contiene plasma esta presente un factor de corrección que es capaz de complementar parcialmente el daño producido por la MMC en los linfocitos AF.

Por otra parte, no sabemos cual es el mecanismo que hace que disminuya la frecuencia de aberraciones en las células AF. Se sabe que la MMC induce enlaces cruzados interhebra que no pueden ser reparados por las células AF (8,23), esto produce inhibición de la síntesis de ADN, bloqueo en la progresión del ciclo celular y alargamiento de la fase G2 (25). En base a esto, se sugiere que el factor de corrección presente en el plasma normal participe en la reparación del ADN.

Otra posibilidad es que el factor de corrección induzca división celular y seleccione así las células menos dañadas a entrar a mitosis. Un trabajo que apoya esta última hipótesis se realizó con medios condicionados por una línea celular para estimular la proliferación en cultivo de células de médula ósea extraída de 18 pacientes con leucemia, se encontró que en 12 de los 18 pacientes disminuyó la cantidad de células con alteraciones cromosómicas; ya que los cultivos tenían células normales y células con aberraciones y se interpretó que con la adición del medio condicionado, proliferaron preferencialmente las células normales y se enmascaró la clona anormal (34). Algo similar podría ocurrir en nuestros cultivos; esto es que el medio condicionado con plasma normal seleccionara para proliferación a las células AF menos dañadas.

Por lo anterior, es necesario llevar a cabo, experimentos en los cuales se determine si el mecanismo de acción del factor de corrección es a través de inducir la división celular o de cooperar en la reparación del ADN.

**CONCLUSIONES**

Se corroboró la existencia de un factor de corrección de aberraciones cromosómicas de AF en el medio condicionado con plasma de células normales.

Se encontró variabilidad en cuanto a: que las células normales sean capaces de producir el factor de corrección *in vitro* y que este factor de corrección pertenezca a un sistema inducible por daño al ADN en células normales.

**REFERENCIAS**

- 1.-Eriksson AW. Clinical and Genetic aspects of Fanconi's anemia. *Clinical Genetics*. 1984;25:205-213.
- 2.-Kidson CH. Diseases of repair *Clin. Haematol.*1980; 9:141-155.
- 3.-Harris H y Hirschhorn K. *Advances in Human Genetics*. New York. Plenum Press. 1989.
- 4.-Gordon-Smith EC y Rutherford TR. Fanconi anemia-Constitutional, familial aplastic anaemia *Baillière's clinical Haematology*. 1989; 2:139-152.
- 5.-Terry L Timme, Robbe Moses MD. Diseases with DNA, Damage processing defects. *Am. J. Med. Sci.* 1988; 295:40-48.
- 6.-Schroeder TM, Anschutz F y Knoop A. Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy. *Hum.Gen.* 1964; 1: 194-196.
- 7.-Novotna B, Goetz P y Surkava NI. Effects of alkylating agents on lymphocytes from controls and from patients with Fanconi's anemia. *Hum. Gen.*1979;49:41-50.
- 8.-Sasaki MS y Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA crosslinking agents. *Cancer Res.* 1973; 33:1829-1836.
- 9.-Frias S, Carnevale A y Del Castillo V. Diagnóstico de anemia de Fanconi en linfocitos expuestos a mitomicina-C. *Rev. Inv. Clin.* 1984; 36: 219-221.
- 10.-Cervenka J y Hirsch BA. Cytogenetic Differentiation of Fanconi anemia, "Idiopathic" aplastic anemia and FA heterozygotes. *Am J. Med. Genet.* 1983; 15: 211-223.
- 11.-Dollapiccola B, Porfirio B, Mokini V, Alimena G, Isacchi G y Gandini E. Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi anemia lymphocytes. *Hum. Genet.* 1985; 69: 62-65.
- 12.-Schindler D y Hoehn H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Hum. Genet.* 1988; 43: 429-435.
- 13.-Gutiérrez LM. Mitomycin C Current status and new developments. Ed: Carter SK y Crooke ST. New York. Academic Press 1979.
- 14.-Iyer VN y Szybalski W. Mitomycins and porfiromycins: Chemical mechanism of activation and cross-linking of DNA. *Science* 1964;145:55-58.

- 15.-Nowell PC. Mitotic inhibition and chromosomal damage by mitomycin-C in human leukocytes cultures. *Exp.Cell Res.*1964; 33:445-449.
- 16.-Joenje H, Arwert F, Erikson AW, Koing de MH y Costra AB. Oxigen dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature.* 1981;290:142-143.
- 17.-Nordenson I. Effect of superoxide dismutasa and catalasa on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia. *Lancet* 1978; 1: 205.
- 18.-Guille JP, Wortelboer MH y Joenje H. Antioxidants status of Fanconi anemia fibroblasts. *Hum. Genet.* 1987; 77: 28-31.
- 19.-Wnder E, Burghardt U, Lang y Hamilton L. Fanconi's anemia: anomaly of enzyme passage through the nuclear membrane. *Hum. Genet.* 1981; 58: 149-155.
- 20.-Wnder E. Further studies on compartamentalization of DNA-topoisomerase I in Fanconi anemia tissue. *Hum. Genet.* 1984; 68: 276-281.
- 21.-Dutrillaux B, Dubos C, Viegas-Pequignot E, y Buriot D. Partial endoreduplication: A new Cytogenetics anomaly possibly related to a DNA repair defect. *Ann. Gebet* 1979; 22-25.
- 22.-Poon FK, O'Brien RL y Parker JL, Defective DNA repair in Fanconi's anemia. *Nature* 1974; 250: 223-225.
- 23.-Fujiwara Y, Tatsumi M y Sasaki MS. Crosslink repair in human cells and its possible defect in Fanconi's anemia cells. *J. Mol. Biol.* 1977; 113:635-649.
- 24.-Matsumoto A, Vos J-HH y Hanawalt PC. Repair analysis of mitomycin-C induced DNA crosslinking in ribosomal RNA genes in lymphoblatoid cells from Fanconi's anemia patients. *Mut. Res.* 1989; 217: 185-192.
- 25.-Moustacchi E, Papadopoulo D, Diatloff-Zito C y Buchwald M. Two complementation grups of Fanconi's anemia differ in their phenotypic response to DNA crosslinking treatment. *Hum. Genet.* 1987; 75:45-47.
- 26.-Sabatier L, Dutrillaux B. Effect of caffeine in Fanconi anemia. I. Restoration of a normal duration of G2 phase. *Hum gen.* 1988; 79:242-244.
- 27.-Lewin B. *Genes IV.* oxford cell press 1990.

- 28.-Bohr VA, Evans MK y Fornace AJJr, Biology of disease DNA repair and its pathogenetic implications. Lab. Inv. 1989; 61: 143-161.
- 29.-Zakrzewski S, Sperling K. Antagonistic effect of cocultivation on MMC induced aberration rate in cells of patient with Fanconi's anemia. Hum. Genet. 1980; 56: 85-88.
- 30.-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. Inv. Clin.(Mex) 1985;37: 31.
- 31.-Miller RT. Simultaneous statistical inference. New York, Mc Graw-Hill Co. 1968.
- 32.-Zakrzewski S y Sperling K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. Hum. Genet. 1980; 56: 81-84.
- 33.-Frias 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. Clin. (mex). 1986; 38: 269-271.
- 34.-Sun G, Koeffler P, Gale RP, Sparkes RS y Schreck RR. Use of conditioned media in cell culture can mask cytogenetic abnormalities in acute Leukemia. Cancer Genet. Cytogenet. 1990; 46: 107-113.