

184
209



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto de la Cafeína y el Plasma Humano
Normal en Líneas Linfoblásticas 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
SILVIA ROSALIA SANCHEZ SANDOVAL



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Director de Tesis:
DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

EFFECTO DE LA CAFEINA Y EL PLASMA HUMANO NORMAL EN LINEAS
LINFOBLASTOIDES DE ANEMIA DE FANCONI.

realizado por SILVIA ROSALIA SANCHEZ SANDOVAL

con número de cuenta 8824122-3 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ. *S. Frias V.*

Propietario DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO. *M. Altamirano*

Propietario BIOL. BERTHA MOLINA ALVAREZ. *Bertha Molina*

Suplente BIOL. LAURA GOMEZ LAGUNA. *L. Gomez*

Suplente BIOL. MARCELA BEATRIZ BLANCO IBAREZ. *M. Blanco*

Consejo Departamental de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

A mi padre

A mi madre
porque con su fuerza y valentía,
he llegado a ser lo que ahora soy.

A mis hermanos Chayo, Gus y Luis
por el apoyo brindado
en este largo camino.

A Paco
“... si te quiero es porque sos
mi amor, mi cómplice y todo
y en la calle codo a codo
somos mucho más que dos...”

A Onin
Por tu amistad sincera, ayuda y
apoyo a cada instante. Gracias.

Mi más sincero agradecimiento

A la Dra. Sara Frías Vázquez
por su confianza y gran apoyo en mi desarrollo profesional
y en la elaboración de este trabajo.

A mis amigos
Paola, Karla, Gaby, Laura y Carlos,
porque con su amistad y cariño incondicional,
la vida se hace más fácil.

A las biólogas
Laura Gómez, Bertha Molina y Luz Velasco,
por sus consejos y enseñanzas.

A Chelo y Angélica
por hacer que la genética, sea más divertida.

INDICE

RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	
Cuadro clínico	3
Fenotipo celular	4
Citogenética	6
Diagnostico	7
Heterogeneidad genética	8
Posible defecto básico de la AF	12
a) Reparación de ADN	12
b) Radicales libres y metabolismo de oxígeno	13
Mitomicina C	15
Mecanismo de acción de la MMC	16
Cafeína	17
Cafeína y ADN	17
Plasma	20
II. OBJETIVOS	22
III. HIPOTESIS	23
IV. METODOLOGÍA	24
Análisis	28
V. RESULTADOS	
Línea normal	29
Efecto de la MMC en células AF	30
Efecto de la cafeína en células AF con y sin tratamiento de MMC	32
Efecto del plasma humano normal en células AF con y sin tratamiento de MMC y/o cafeína	32
VI. DISCUSIÓN	
Línea normal	39
Efecto de la MMC en células AF	39
Efecto de la cafeína sola en células AF	40
Efecto de la cafeína y MMC en células AF	43
Efecto del plasma humano normal en las líneas AF	45
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. REFERENCIAS	47

**EFEECTO DE LA CAFEINA Y EL PLASMA HUMANO
NORMAL EN LINEAS LINFOBLASTOIDES DE ANEMIA DE
FANCONI.**

RESUMEN

La anemia de Fanconi es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por varios defectos congénitos, desarrollo de pancitopenia y alta predisposición al cáncer. Las células AF tienen una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas y son hipersensibles a agentes alquilantes como la MMC. Las células AF tienen una fase G2 del ciclo celular muy larga y al agregar cafeína que es un inhibidor de la reparación post-replicativa, restaura la duración normal de esta fase, produciendo un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

El presente trabajo se realizó con líneas linfoblastoides de 4 grupos de complementación de AF (A, B, C y D) a las que se les trató con MMC, cafeína y plasma humano normal, con el objetivo de determinar si presentan un fenotipo celular diferente en base al análisis de las aberraciones cromosómicas. Los resultados mostraron que al agregarles MMC a los cuatro grupos de complementación se indujo un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas con respecto a sus frecuencias basales. Por otro lado, al agregar cafeína a estas líneas celulares, no se observó un aumento en la frecuencia de las aberraciones cromosómicas con respecto a las espontáneas, ni en la línea normal, ni en las AF-A, B y C, mientras que la línea AF-D sí presentó sensibilidad a la cafeína. Cuando se agregó cafeína a células previamente tratadas con MMC, se encontró una potenciación del daño cromosómico, en las líneas AF-A, AF-B y AF-C, mientras que en AF-D no se vió modificada la frecuencia de aberraciones.

Cuando las cuatro líneas linfoblastoides de AF son tratadas con cafeína y/o MMC, el plasma humano normal, que en linfocitos AF corrige parcialmente el daño producido por la MMC, no tiene efecto alguno sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por estos agentes.

Los resultados de este trabajo sugieren que el grupo de complementación AF-D tiene un defecto básico diferente a el de los demás grupos AF estudiados.

INTRODUCCION

La anemía de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva, incluida dentro de los síndromes de inestabilidad cromosómica junto con otras tales como la Ataxia Telangiectasia (AT), el Síndrome de Bloom y la Xeroderma Pigmentosum (XP), por compartir las siguientes características: incremento en la frecuencia de aberraciones espontáneas e inducidas, hipersensibilidad a agentes físicos y/o químicos y predisposición al desarrollo de neoplasias (Cohen y Levy, 1989).

CUADRO CLINICO

Clinicamente fue descrita por primera vez por Guido Fanconi en el año de 1927. Se detecta por la presencia de varios defectos congénitos en el desarrollo como bajo peso y talla al nacer, hiperpigmentación de la piel, que tiende a aumentar con la edad; ausencia o malformación del radio y pulgares, anomalías genitales como hipogonadismo en ambos sexos: micropene y criptorquidia en niños e hipoplasia uterina y vaginal en niñas; alteraciones renales como hipoplasia o agenesia de riñón y riñón en forma de herradura; microftalmia, estrabismo y retraso mental en diferentes grados (Gordon-Smith y Rutherford, 1989; Cohen y Levy, 1989).

A nivel hematológico, cursan con pancitopenia o disminución progresiva de células de la médula ósea, esta alteración se presenta entre los 5 y 7 años (Auerbach et al, 1989). En general, de todas las anemias aplásicas que se presentan en la infancia, el 20% son AF (Chaganti y Houldsworth, 1991).

Los pacientes con AF, muestran una mayor incidencia de diferentes tipos de neoplasias principalmente tumores hepáticos y leucemias, lo cual puede deberse a predisposición genética o a los tratamientos a los que son sometidos los enfermos (Cohen y Levy, 1989). A pesar de que la AF es un síndrome bien reconocido, existe gran variabilidad clínica, como se puede apreciar en la tabla 1, en la que se observa que ninguna de las anomalías se presenta en el 100% de los pacientes con diagnóstico indudable de anemia de Fanconi.

FENOTIPO CELULAR

En la AF se han reportado varias alteraciones a nivel celular, las más importantes son: una baja tasa de crecimiento y de eficiencia en la formación de colonias celulares en cultivo, se encuentra también un ciclo celular largo a expensas de la fase G₂, hipomutabilidad y alteración en la recuperación de la síntesis de ADN después de tratamiento con mutágenos. Las células AF muestran una hipersensibilidad a los agentes alquilantes bifuncionales que provocan enlaces covalentes cruzados en las hebras de ADN, como la Mitomocina C (MMC), el diepoxibutano (DEB), la mostaza nitrogenada y el 8-metoxipsoralen (8-MOP) activado con rayos UV. También son hipersensibles a otras sustancias como la cafeína, el cloranfenicol y la ciclofosfamida

TABLA 1 (Alter, 1993)

CARACTERISTICAS CLINICAS EN PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI

<u>Anormalidad</u>	<u>%</u>
Bajo peso al nacer	13
Talla baja	62
Anormalidades craneofaciales	28
Alteraciones oculares	27
Pabellones auriculares	11
Cardiopulmonares	7
Gastrointestinales	4
Malformaciones renales	24
Alteración en miembros superiores	50
Alteración en miembros inferiores	9
Hipogonadismo masculino	40
Hipogonadismo femenino	3
Pigmentación anormal de la piel	51
Manchas café con leche	23
Retardo mental	13
Reflejos osteomusculares aumentados	8

(Chaganti y Houldsworth, 1991); la hipersensibilidad se manifiesta como una disminución en la supervivencia celular, alteración del ciclo celular y elevación en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Strathdee et al, 1992). De hecho, esta respuesta celular es característica de los pacientes AF, de manera que algunos de estos agentes se han utilizado para realizar el diagnóstico de certeza de este padecimiento (Cohen y Levy, 1989).

CITOGENETICA DE AF.

Schroeder en 1964 observó que el 25% de las metafases de los pacientes AF mostraban una o más alteraciones cromosómicas de manera espontánea. Esto fue confirmado posteriormente por varios grupos de trabajo; el tipo de aberraciones cromosómicas que se encuentran con mayor frecuencia son: rupturas cromosómicas y cromatídicas, gaps, figuras radiales de intercambio entre cromosomas no homólogos y translocaciones (Gordon-Smith y Rutherford, 1989)

En 1973, Sasaki y Tonomura mostraron que el tratamiento con MMC resultaba en un incremento significativo de la frecuencia de aberraciones cromosómicas y posteriormente se encontró que las células AF eran hipersensibles a todos los agentes que introducen enlaces covalentes cruzados en el ADN (Chaganti y Houldsworth, 1991).

En un estudio realizado en una población mexicana, se reportó que en las células AF la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas en linfocitos de sangre periférica varía entre un 10 y 60% y al exponerlas a MMC en una concentración de 40ng/ml, se obtienen porcentajes de aberraciones de alrededor de 300%; estos resultados son significativamente diferentes de los que se observan en individuos normales expuestos a la misma concentración, cuyas frecuencias de aberraciones oscila alrededor del 35% (Frias *et al*, 1986).

DIAGNOSTICO.

El diagnóstico clínico de esta enfermedad es complicado, ya que los pacientes pueden presentar características fenotípicas mínimas. En los 60's, el diagnóstico se hacía en base al cuadro clínico y al estudio de las aberraciones cromosómicas espontáneas presentes, más tarde, en los 80's la prueba de rompimiento cromosómico se hizo más específica con el uso de agentes clastogénicos específicos: MMC y DEB lo cual discrimina las anemias aplásticas de la anemia de Fanconi (Frias *et al*, 1984).

Actualmente, el diagnóstico de certeza de AF se establece citogenéticamente por presentar hipersensibilidad a tales mutágenos, de manera que ahora se pueden diagnosticar pacientes que no tienen alteraciones congénitas o sin anemia aplástica. En un estudio realizado se encontró que del total de pacientes AF diagnosticados citogenéticamente, 37% no tenían alteraciones congénitas, 31% no tenían anemia aplástica (incluidos niños menores de 10 años) y 7% no tenían ni alteraciones congénitas ni anemia aplástica y solamente fueron identificados

porque tenían un familiar con AF (Alter, 1993). Estos estudios indican claramente que si bien el cuadro clínico puede ser sumamente variable, el fenotipo celular es constante y es claro que sólo hasta que se encuentre un diagnóstico basado en el estudio directo de los genes, se resolverán los dilemas de la heterogeneidad fenotípica que presentan los individuos AF.

HETEROGENEIDAD GENÉTICA

Como se mencionó anteriormente, se ha encontrado que existe una gran variabilidad en cuanto a características clínicas y edad de inicio de las alteraciones hematológicas, lo cual hizo sospechar que existía heterogeneidad genética, esto implica que los genes involucrados en esta enfermedad probablemente sean diferentes (Auerbach *et al.*, 1989). Lo anterior se hizo evidente ya que al fusionar células somáticas de diferentes pacientes AF y analizar la susceptibilidad de los híbridos a la MMC, se observó que la sensibilidad a la MMC se perdía en los híbridos formados entre pacientes con diferente edad de inicio de la pancitopenia, lo mismo que ocurría entre híbridos de células de cualquier paciente AF con células normales (Zakrzewski y Sperling, 1980). Esto evidenció que las líneas celulares parentales pertenecían a diferentes grupos de complementación y por lo tanto muy probablemente los genes involucrados eran diferentes (Auerbach *et al.*, 1989). Una vez demostrada la heterogeneidad genética en AF, los estudios de fusión celular han mostrado hasta la fecha, que existen cinco grupos de complementación: AF-A, AF-B, AF-C, AF-D y más recientemente en un estudio realizado por Joenje, *et al.* (1995) se evidenció la existencia del grupo AF-E.

Se han hecho estudios de evaluación de la síntesis semi-conservativa de ADN en células de los diferentes grupos de complementación de AF luego de haberlos sometido a un tratamiento con 8-MOP mas rayos UV (UVA). Las líneas celulares fueron tratadas con una solución de 8-MOP durante 15 minutos, para después exponerlas a varias dosis de UVA y posteriormente se marcaron con timidina tritiada para detectar la síntesis replicativa del ADN. Las marcas radioactivas mostraron que un grupo de células AF (posteriormente identificadas como AF-NO A), tenían una respuesta al tratamiento muy similar a los heterocigotos y a las células normales, mientras que en otras se observó que había una inhibición de la síntesis semi-conservativa de ADN y no se recuperaban aún 24 horas después del tratamiento, éstas se identificaron como células AF-A. (Digweed *et al*, 1988)

Los primeros estudios mostraron dos grupos de complementación: el A y el no A, posteriormente se determinó que el grupo no A estaba formado por los grupos de complementación B, C y D (Strathdee *et al*, 1992).

Se piensa que la inhibición transitoria de la síntesis semi-conservativa de ADN observada después de exponer las células a agentes que dañan el ADN (incluyendo 8-MOP+UVA), se debe a una alteración en la elongación de la cadena del ADN debido a las lesiones presentes. En contraste, la inhibición inducida por MMC parece resultar del decremento en el número de células sintetizadoras de ADN (Moustacchi *et al*, 1987).

Gracias a estos y a otros estudios (Digweed *et al*, 1988) se pudo caracterizar parcialmente a los grupos de complementación AF-A y AF-B:

AF-A

- Estas células no recuperan su síntesis de ADN después de exponerlas a 8-MOP+UVA,
- reducen su actividad de ligasa y su consumo de NAD⁺ después de radiación UV,
- presentan una frecuencia elevada de rupturas cromosómicas luego de tratarlas con MMC,
- tienen una reducción del índice mitótico después de tratarlas con MMC,
- son deficientes en la reparación de los enlaces covalentes cruzados en el ADN.

AF-B

- Recuperan su síntesis de ADN después de la exposición a 8-MOP+UVA, de manera similar a las células normales.
- presentan una reparación normal de las rupturas de doble hebra
- tienen moderados niveles de rupturas cromosómicas después de tratarlas con MMC,
- hay una reducción moderada de su índice mitótico luego del tratamiento con MMC,
- presentan reparación más eficiente de los enlaces covalentes cruzados en el ADN
- muestran un patrón de síntesis de ADN similar a las células normales, capaces de remover fotolesiones.

Los cinco grupos de complementación que se han descrito hasta la fecha: AF-A, AF-B, AF-C, AF-D y AF-E, son una herramienta muy útil para dilucidar las bases genéticas de esta enfermedad (Auerbach et al, 1989, Gibson et al, 1993).

En años pasados se encontró y clonó el gen asociado al grupo de complementación C (FACC) localizado en 9q22.3 (Gibson et al 1993; Strathdee et al, 1992), y recientemente en 1994 Yamashita et al y Youssoufian: localizaron el polipéptido FACC en el citoplasma de células de mamífero

En 1993, Alter localizó un posible gen causante del grupo AF-A en el cromosoma 20q, por medio de análisis de ligamiento, pero una investigación más reciente realizada por Pronk y cols. en 1995, mostró evidencia concluyente de que el gen está localizado en el cromosoma 16q24.3.

Por otro lado, en ese mismo año (1995) Whitney y cols., mediante la técnica de transferencia de cromosomas por medio de microcélulas, mapearon el gen de AF-D dentro de la región 3p22-26.

Para los grupos AF-B y AF-E aún no se conoce la localización de sus genes.

POSIBLE DEFECTO BASICO DE LA ANEMIA DE FANCONI

a) REPARACION DE ADN

Se propone que en las células AF existe un defecto en el sistema de reparación del ADN. Después de hacer estudios en el ciclo celular en células de pacientes con AF se ha observado que su fase G2 es muy prolongada y que esto corresponde al período de reparación post-replicativa de las lesiones ya existentes (Sabatier *et al.*, 1988).

Estos defectos se han atribuido a diferentes factores:

Pincheira y Bravo en 1988 mencionan tres causas: 1) Falta de una exonucleasa específica para eliminar los pedazos dañados de la cadena de ADN y completar así la reparación, 2) deficiencia de una ADN-ligasa, lo cual apoya la idea de Zakrzewsky y Sperling (1980) quienes encontraron una reducción en la actividad de esta enzima en células AF y la de Dutrillaux y colaboradores (1979) quien se basó en la frecuencia de endorreduplicaciones parciales y completas; y 3) niveles bajos en NAD⁺ (nicotidamida adenina dinucleótido) que es una coenzima probablemente asociada a la actividad de la ligasa en el sistema de reparación (Berger *et al.*, 1980).

b) RADICALES LIBRES Y METABOLISMO DE OXIGENO.

Porfirio et al en 1989, propusieron que los radicales libres generados en el metabolismo del oxígeno pueden dañar proteínas y ácidos nucleicos provocando daño cromosómico y muerte celular. Estos autores apoyan que es probable que las células AF tengan una falla en la capacidad de remover especies activas de oxígeno como el superóxido, para lo cual usan desferrioxamina (DFO), que es un quelante de hierro y tiene una acción protectora contra el daño oxidativo catalizado por este metal.

Joenje y cols. (1981) reportaron que la frecuencia de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos de pacientes AF, está relacionada positivamente con la tensión de oxígeno a la que son sometidas éstas células; sugieren que el sitio en el cual pueden estar afectadas las células AF es el sistema de defensa que se encarga de la protección y reparación de su material genético contra la toxicidad genética del oxígeno. Observaron que los radicales libres formados por el metabolismo natural del oxígeno pueden contribuir al daño cromosómico de dos formas: 1) por interacción química con la cromatina, ya sea de manera directa o por medio de la lipoperoxidación, cuyos productos interactúan con la cromatina provocándole daño; o bien por 2) interferencia directa con las enzimas de reparación del ADN.

Por otro lado, Gordon-Smith y Rutherford (1989) mencionan que en las células AF, puede haber algún defecto en la adenosin-difosfato ribosil transferasa; además de una deficiencia de la acción de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa que son enzimas que sirven de protección a las células contra radicales libres generados por el metabolismo del oxígeno, los cuales como ya se mencionó, dan lugar a rupturas cromosómicas, con lo cual se muestra, que estas células son sensibles a condiciones oxidantes.

MITOMICINA C (MMC)

La MMC es un antibiótico que fue aislado de Streptomyces caespitosus en Japón en 1958, tiene un peso molecular de 334 daltones, es soluble en agua y en solventes orgánicos (Remers, 1979).

Químicamente se caracteriza por ser un agente alquilante que contiene tres grupos potencialmente activos: la aziridina, el carbamato y la quinona.

Se ha usado ampliamente como agente quimioterapéutico en el tratamiento de algunos carcinomas y se ha establecido que es altamente mutagénico y clastogénico (Cohen y Shaw, 1964).

El principal blanco de acción de la MMC es el ADN, en donde induce la formación de uniones covalentes cruzadas intra e intercatenarias, que dependen directamente de la composición de bases. Además actúa como inhibidor de la síntesis de ADN en la fase S del ciclo celular (Gutiérrez, 1979, Remers, 1979).

MECANISMO DE ACCION DE LA MMC.

El primer paso es que la MMC se reduce a semiquinona en presencia de NADPH, el cual se une no covalentemente al ADN. Posteriormente se reduce a hidroquinona y al perder una molécula de metanol, se forma la hidroquinona aziridinomitoseno, que es capaz de unirse al ADN de manera covalente.

La aziridina queda como un anillo abierto en el carbono 1 y pierde el sustituyente carbonilo del carbono 10 (es por esto que la MMC es un agente alquilante birreductor). Estos dos grupos alquilantes (carbono 1 y carbono 10 con valencias libres) son altamente reactivos y facilitan la formación de uniones covalentes cruzadas y la alquilación de bases de ADN, lo cual altera el metabolismo celular y en células AF estos sitios producen los efectos mutagénicos, clastogénicos y letales (Claassen *et al.*, 1986).

CAFEINA

La cafeína es una metilxantina natural que bloquea los receptores de adenosina, se tienen 3 hipótesis sobre sus mecanismos farmacológicos de acción: a) la movilización del calcio, b) la inhibición de fosfodiesterasas y c) el antagonismo de receptores de adenosina (Daly, 1993).

CAFEINA Y ADN

La cafeína interactúa de diferentes maneras en la estructura y el metabolismo del ADN: Existen evidencias de que la cafeína se intercala en el ADN de doble hebra provocando un mal apareamiento de bases de la doble hélice, que causa un leve incremento en su tasa de elongación y disminuye su punto de fusión (IARC, 1991).

Se sabe que la cafeína actúa en regiones monohebra de ADN (desnaturalizado) y se une preferencialmente en regiones ricas en A-T, induce ligeros incrementos de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en linfoblastos con Xeroderma pigmentosum y aumenta la expresión de sitios frágiles en pacientes con fragilidad heredable (IARC 1991, Timson 1977).

En estudios con linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina y con 2mM de cafeína en el medio, se encontró que hay una inhibición de la poli (ADP-ribosa)polimerasa. Esto es importante porque las reacciones de poli ADP-ribosilación están distribuidas ampliamente entre los eucariontes e intervienen en el ciclo celular normal de células de mamíferos, particularmente en los eventos moleculares que ocurren en la fase S. La inhibición de las reacciones de poli ADP-ribosilación por las metilxantinas puede dar como resultado efectos genéticos y modular a su vez efectos genéticos inducidos por otros agentes como luz UV, radiación ionizante y químicos mutagénicos y cancerígenos. Estas reacciones están involucradas en la mayoría de las funciones de la cromatina, como son: reparación de ADN, actividades de replicación y transcripción del ADN (IARC, 1991).

En el proceso de reparación por excisión del ADN, se requiere de la producción de rupturas de hebras de ADN por radiación ionizante o enzimáticamente, para la estimulación de la biosíntesis de la poli(ADP-ribosa). En la reparación por excisión se ha observado que muchos de sus pasos están afectados por los inhibidores de la poli(ADP-ribosa)polimerasa: la incisión y ligación se inhiben, la excisión se reduce y la síntesis de reparación se estimula. La inhibición de la síntesis de poli(ADP-ribosa) por metilxantinas como la cafeína, normalmente da como resultado una reducción en la reparación, entonces, en células con daño en el ADN, los inhibidores de la ADP-ribosilación incrementan significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por agentes alquilantes y otros tipos de mutágenos (IARC, 1991).

Existen mecanismos de reparación de DNA como la reparación por excisión que son cafeína-sensitivos en *E. coli* y en otros microorganismos, pero no se ha demostrado aún que la cafeína inhiba este tipo de reparación, en ningún sistema celular de mamíferos (Fimson, 1977). Esta sustancia aplicada después del tratamiento con un agente clastogénico incrementa las aberraciones cromosómicas inducidas y se ha demostrado que es un inhibidor potencial de la reparación post-replicativa en la fase G2 del ciclo celular (González-Fernández y López Sáez, 1982). Este aumento de aberraciones se revierte parcialmente por el efecto de adenosina. González-Fernández et al (1985), postulan que la cafeína tiene dos efectos diferentes en la fase G2 de células con ADN previamente dañado: a) cancela el retraso mitótico y b) inhibe algunas vías de reparación del ADN.

En estudios realizados por Sabatier y Dutrillaux (1988), se encontró que la cafeína aumenta el índice mitótico, reduce la duración de la fase G2 y aumenta la supervivencia de las células AF.

En otros reportes el uso de la cafeína en células AF, aún cuando han sido tratadas previamente con MMC, aumenta significativamente su supervivencia celular, lo cual sugiere que la falla en el evento de reparación de estas células puede definirse por un defecto en alguna vía bioquímica básica (Frazelle et al, 1981).

PLASMA

En un estudio realizado por Carnevale y Frias (1985), se encontró que la adición de plasma normal a linfocitos de AF, disminuye significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC, lo cual apoya que el plasma normal posee un factor difusible capaz de realizar complementación en células AF.

Aún no se sabe cual puede ser el factor difusible, pero por experimentos realizados en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, indican que se trate de una o varias moléculas de menos de 60 kD.

Se sabe que es posible que la adición de nucleótidos disminuya el daño producido por agentes alquilantes, entonces es probable que al agregar plasma humano normal a los cultivos aumente la reserva de nucleótidos intracelular y esto permita tener una mejor respuesta, pero el plasma tiene una gran variedad de factores antioxidantes y linfocinas que podrían también contribuir a una mejora de las condiciones celulares en AF.

Específicamente se sabe que la interleucina 6 (IL-6) que es una linfocina presente en el plasma, agregada al medio de cultivo aumenta la resistencia de las células AF a la toxicidad de la MMC con un efecto dosis-dependiente. La concentración endógena de IL-6 liberada al medio por células AF A y B, es muy baja, estos datos sugieren que la mayor característica de la anemia de Fanconi, la pancitopenia, puede estar relacionada con la baja producción de IL-6, en comparación con las células normales (Rosselli et al, 1992).

En experimentos previos realizados con linfocitos de pacientes con AF, cuyo grupo de complementación no estaba determinado aún, se observó que el plasma humano normal disminuía la frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por efecto de la MMC; debido a este antecedente, es necesario conocer si este efecto es común para los grupos de complementación AF-A, AF-B, AF-C y AF-D y si esta disminución de frecuencia de aberraciones cromosómicas se observa también en cultivos de linfoblastos AF expuestos a cafeína la cual se sabe que es un potenciador del daño producido por la MMC y que probablemente inhibe la reparación post-replicativa, acortando la fase G₂ del ciclo celular de estas células. además es importante determinar si la cafeína actúa o no de igual forma en los cuatro grupos de complementación de AF.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por MMC es diferente en los cuatro grupos de complementación de la anemia de Fanconi AF-A, B, C y D y si esta respuesta se modifica por la adición de la cafeína y/o el plasma humano normal.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Establecer si los grupos de complementación AF-A, B, C y D tienen una respuesta diferente al tratamiento con MMC.

-Conocer si hay efecto sinérgico entre la MMC y la cafeína en las células AF.

-Determinar si el plasma humano normal disminuye la frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por la MMC y/o la cafeína.

HIPOTESIS

-La cafeína provocará un efecto sinérgico del daño producido por la MMC, de manera diferente en cada uno de los grupos de complementación de AF trabajados.

-El plasma humano normal corregirá parcialmente el daño cromosómico causado por la MMC y/o por la cafeína

METODOLOGIA

Se utilizaron líneas linfoblastoides donadas por el Dr. Manuel Buchwald pertenecientes a los primeros cuatro grupos de complementación de Anemia de Fanconi: HSC 99 (AF-A), HSC 230 (AF-B), HSC 536 (AF-C) y 62N (AF-D) y una línea normal (NL-E) transformada en el laboratorio con virus Epstein-Barr, no fue posible trabajar con los cinco grupos de complementación, debido a que el grupo AF-E se publicó hace apenas unos meses y aún no se ha podido conseguir la línea celular.

Las células se cultivaron en medio RPMI (GIBCO) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (GIBCO), aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y L-glutamina al 1% (GIBCO) y antibiótico antimicótico al 1% (GIBCO).

Para realizar los experimentos se usaron células con más del 90% de viabilidad cuantificada en cámara de Neubauer con azul tripano en proporción 1:1. Se pusieron 1.5×10^6 células en tubos estériles de 11 ml en un total de 5 ml de medio RPMI suplementado como se mencionó anteriormente.

Para obtener las concentraciones adecuadas para tratar a las líneas linfoblastoides con MMC y cafeína, se realizó una evaluación de índice mitótico, probando las concentraciones de MMC : 10, 20, 30 y 40ng/ml y para cafeína . 0.25, 0.50, 1 y 2mM.

Se encontró que las concentraciones equitóxicas de MMC fueron de 40ng/ml para las líneas AF-A, AF-C y NL-E, y de 10ng/ml para las líneas AF-B y AF-D. Así como también se observó que la concentración de cafeína con la que se obtuvo una cantidad analizable de metafases en todas las líneas fue la de 0.25mM.

A las 24 horas de iniciado el cultivo, éstos se dividieron en dos grupos: el primero, se trató con MMC durante 24 horas. A las 48 horas se lavaron con solución salina balanceada Hank's y se reincubaron con los siguientes tratamientos:

1. Con 5 ml de medio RPMI suplementado.

(para evaluar la sensibilidad de las líneas celulares tanto normal como AF a este agente).

2. Con 5 ml de medio RPMI suplementado y cafeína.

(para valorar el efecto de la cafeína en células con daño previo producido por la MMC).

3. Con 4 ml de medio RPMI suplementado, 1 ml de plasma humano normal tipo "A".

(Para ver si hay algún efecto corrector del plasma sobre el daño producido por la MMC).

4. Con 4 ml de medio RPMI suplementado, 1 ml de plasma humano normal tipo "A" y cafeína.

(Con el fin de ver si hay efecto corrector del plasma en las células dañadas por ambos agentes: MMC y cafeína).

El segundo grupo de cultivos se mantuvo sin MMC' y también se lavó a las 48 horas para reincubarse con:

1. 5 ml de medio RPMI suplementado.

(Como control para los diferentes tratamientos, con la finalidad de conocer la frecuencia de aberraciones espontáneas de cada una de las líneas celulares).

2. 5 ml de medio RPMI suplementado y cafeína.

(Este segundo tratamiento se puso para conocer la frecuencia de aberraciones cromosómicas provocada por la cafeína).

3. 4 ml de medio RPMI suplementado, 1 ml de plasma humano normal tipo "A" y cafeína

(Este último, con el propósito de conocer si tiene efecto corrector el plasma sobre el daño conferido por la cafeína).

Todos los experimentos se hicieron por duplicado

La cosecha se hizo a las 72 horas, una hora antes se agregaron 4 μ g/ml de colchicina a cada tubo, transcurrido este tiempo se centrifugaron a 400g por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregaron 6 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M), se resuspendieron los paquetes celulares en esta solución y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se agregó 1 ml de solución fijadora de Carnoy (metanol : ácido acético en proporciones 3:1) a cada tubo, para hacer una prefijación, se homogeneizaron y se centrifugaron a 400g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se fijaron los paquetes celulares con la solución fijadora. Por último se hicieron dos lavados del botón celular con el mismo fijador.

Se hicieron preparaciones por goteo del paquete celular en portaobjetos húmedos y fríos, en los cuales se fijaron las células a la flama, posteriormente se tiñeron con una solución 1:3 de Wright y buffer Sørensen pH 6.8 (preparado con 6.63 gr de KH_2PO_4 y 2.56 gr de Na_2HPO_4 en 1000 ml de agua destilada) y Giemsa diluido también al 10% en este mismo buffer.

Las laminillas se codificaron por una persona ajena al estudio para hacer el análisis de las mismas a ciegas.

ANALISIS.

En un microscopio óptico se cuantificaron las siguientes aberraciones cromosómicas: Rupturas cromosómicas y cromatídicas; fragmentos céntricos y acéntricos; anillos, dicéntricos y figuras radiales de intercambio.

Se analizaron 25 metafases por repetición en cada tratamiento y se calculó la frecuencia de aberraciones por célula (No. de aberraciones totales/No. de metafases analizadas).

La prueba estadística usada para el análisis de los resultados entre líneas celulares fue el Análisis de Varianza de Fisher cuando se encontró homogeneidad de varianzas y de tener heterogeneidad de varianzas se usó la prueba F de Tukey; para analizar los resultados intralínea celular se realizó la prueba "t de Student", ambos mediante el paquete computacional de estadística "PAQUEST", desarrollado por investigadores del Instituto Nacional de Pediatría.

RESULTADOS

LINEA NORMAL

La línea NL-E sin tratamiento presenta daño espontáneo significativamente menor con respecto al obtenido en todas las líneas AF ($p < 0.05$) (Tabla 2).

Al tratar las células normales con 40ng/ml de MMC no hay un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas con respecto a las no tratadas. El plasma humano normal no produce efecto en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células tratadas previamente con MMC (Tabla 2, figura 1a).

Cuando las células NL-E se trataron con 0.25mM, de cafeína no se produce un incremento significativo en la frecuencia de rupturas cromosómicas. La frecuencia de aberraciones cromosómicas de las células tratadas con cafeína y plasma normal aumenta, pero de manera no significativa en relación a las no tratadas, ni a las tratadas con cafeína únicamente (Tabla 2, figura 1b).

Al agregar cafeína por 24 hrs. después del tratamiento con MMC, se produjo un incremento estadísticamente significativo en el daño cromosómico ($p=0.03$), mostrando un efecto sinérgico del daño producido al combinar los dos agentes.

Cuando se agrega plasma normal a las células con este último tratamiento, se observa una disminución significativa en la frecuencia de aberraciones cromosómicas ($p=0.04$) (Tabla 2, figura 1c).

EFECTO DE LA MMC EN CELULAS AF.

El esquema general de tratamiento se planeó con una concentración de 40ng/ml de MMC, sin embargo las líneas AF-B y AF-D mostraron mayor sensibilidad, por lo cual en dos experimentos independientes, todos los cultivos que se trataron con MMC se vieron severamente afectados, tanto en población celular como en índice mitótico, por esto se decidió hacer una prueba con concentraciones de 10, 20, 30 y 40 ng/ml para encontrar la concentración adecuada de MMC.

De acuerdo con estas pruebas, como ya se mencionó anteriormente, se decidió tratar a las líneas más sensibles (AF-B y AF-D) con 10ng/ml de MMC ya que con esta concentración se obtuvo un número analizable de metafases y una buena población celular, similar a lo que se encontró con 40ng/ml en AF-A y AF-C, de manera que se manejaron como concentraciones equitóxicas.

La MMC indujo una gran cantidad de aberraciones cromosómicas estadísticamente diferentes en las líneas AF, comparadas con la línea NL-E ($p < 0.05$). Se observaron variaciones en la sensibilidad de acuerdo al grupo de complementación (figura 2): Con las concentraciones equitóxicas manejadas, la línea AF-B fué la que presentó mayor daño cromosómico como respuesta a la MMC, AF-A presentó una distribución del daño cromosómico muy similar a la línea anterior y tuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) en su frecuencia de aberraciones cromosómicas comparándola con sus valores basales de aberraciones (Tabla 2), el daño cromosómico de las otras dos líneas celulares AF-C y AF-D, mostraron pocas células distribuidas en los intervalos con mayor daño, aunque siempre se observó la gran sensibilidad de las células AF a este agente (Figura 2).

Tomando en cuenta el manejo de concentraciones equitóxicas de MMC para los cuatro grupos de complementación, las frecuencias de aberraciones cromosómicas nos indican que la sensibilidad de los diferentes grupos a este agente va de la siguiente manera: AF-B > AF-D > AF-A > AF-C (Tabla 2).

EFEECTO DE LA CAFEINA EN CELULAS AF CON Y SIN TRATAMIENTO DE MMC

Al igual que en las células normales, en las células AF la cafeína no produjo, un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los grupos AF-A, AF-B y AF-C, en cambio en AF-D se encontró un incremento significativo ($p < 0.05$) (Tabla 2, figura 3). Cuando se trató previamente a las células con MMC, la cafeína potenció significativamente el daño producido por la MMC en las líneas AF-A ($p < 0.01$), en la línea AF-B se observa una potenciación del daño que da una $p = 0.07$ quedando así cerca de la significancia estadística y AF-C no muestra diferencia significativa debido a que las desviaciones estándar de cada uno de los tratamientos son muy grandes, mientras que en la línea AF-D, el comportamiento fue completamente diferente, ya que en este grupo no se observó ninguna modificación cuando se agregó cafeína a los cultivos tratados con MMC y la distribución de su daño cromosómico muestra pocas células con gran cantidad de daño (Figura 4).

EFEECTO DEL PLASMA HUMANO NORMAL EN CELULAS AF CON Y SIN TRATAMIENTO DE MMC Y/O CAFEINA.

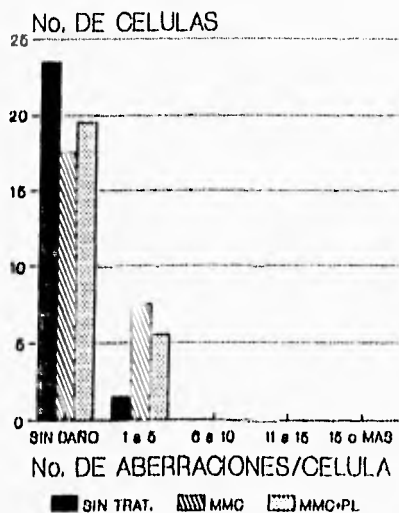
Debido a que en trabajos previos se había observado que el plasma humano normal tenía un efecto de corrección de las aberraciones inducidas por MMC, en este trabajo se probó la actividad correctora del plasma en las células AF tratadas con MMC y cafeína, sin embargo en estas condiciones no se encontró ninguna disminución significativa en la frecuencia de

aberraciones cromosómicas provocadas por ninguno de los dos agentes clastogénicos. Sin embargo, aunque en nuestros experimentos no obtuvimos crecimiento celular en el tratamiento MMC+plasma para AF-A; en otro estudio paralelo realizado en nuestro laboratorio, sí se encontró actividad correctora del plasma en esta línea celular con dicho tratamiento.

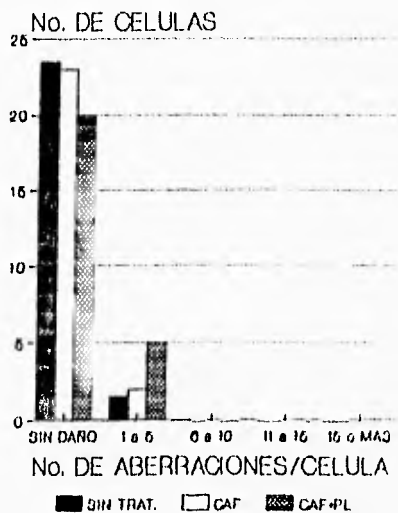
TRATAMIENTOS	NL-E	AF-A	AF-B*	AF-C	AF-D*
SIN TRATAMIENTO	0.06±0.02	0.36±0.05	0.40±0.05	0.26±0.14	0.34±0.02
MMC	0.24±0.11	4.64±0.01 [^]	3.74±0.19 [^]	1.80±1.30	1.34±0.19 [^]
MMC+PL	0.26±0.19	————	4.36±0.50 [^]	1.58±0.59	1.94±0.02 [^]
MMC + CAF	0.66±0.02 [^]	9.56±2.74 [^]	8.72±2.09 [^]	5.66±1.89 [^]	1.06±0.25
MMC + CAF + PL	0.38±0.08 [^]	8.00±0.37 [^]	6.84±1.07 [^]	6.12±1.75 [^]	2.46±0.98 [^]
CAFEINA	0.08±0.01	0.42±0.14	0.40±0.00	0.22±0.02	1.52±0.39 [^]
CAF + PL	0.28±0.05	0.30±0.14	0.28±0.16	0.38±0.02	1.32±0.22 [^]

TABLA 2. Frecuencias de aberraciones cromosómicas por célula. Los datos representan el promedio de dos repeticiones ± Desviación estándar. Los tratamientos fueron: [0.25mM de cafeína; [40ng/ml de MMC, *[10ng/ml de MMC y 20% de plasma humano normal. [^] Diferencia significativa con respecto al no tratado p < 0.05.

a) NL-E



b) NL-E



c) NL-E

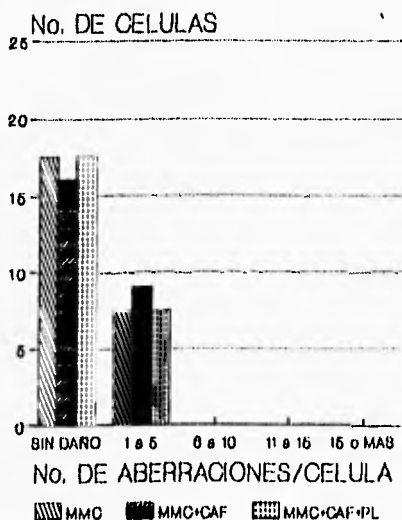
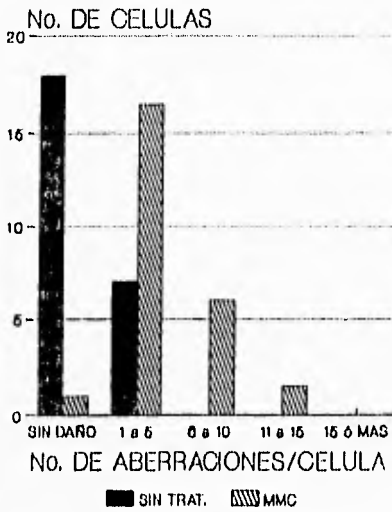
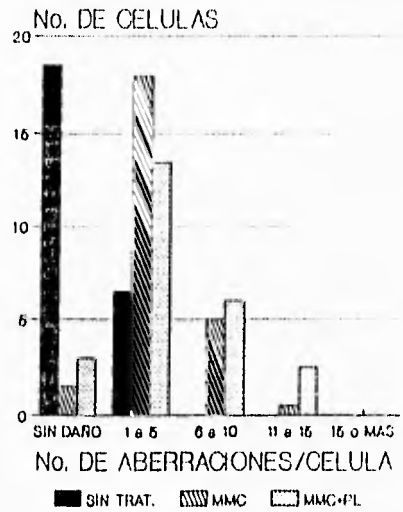


FIGURA 1. LINEA NORMAL CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.
 a) Efecto de la MMC y la MMC con plasma.
 b) Efecto de la cafeína y cafeína con plasma.
 c) Efecto de la cafeína y el plasma en células tratadas con 40ng/ml de MMC.

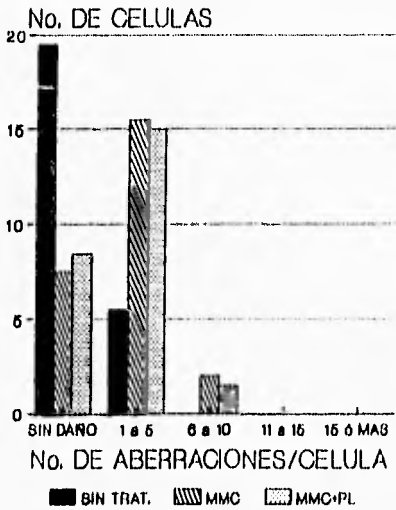
AF-A



AF-B



AF-C



AF-D

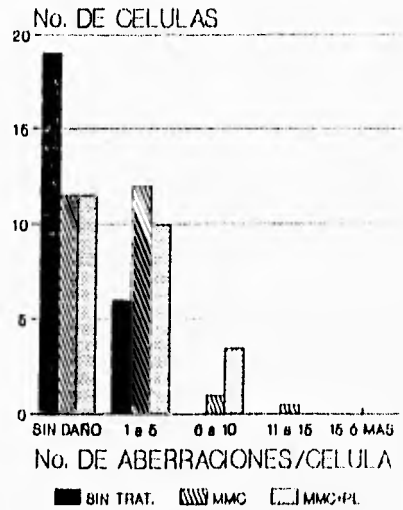
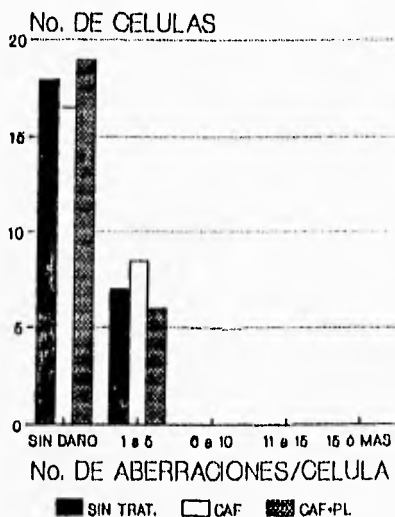
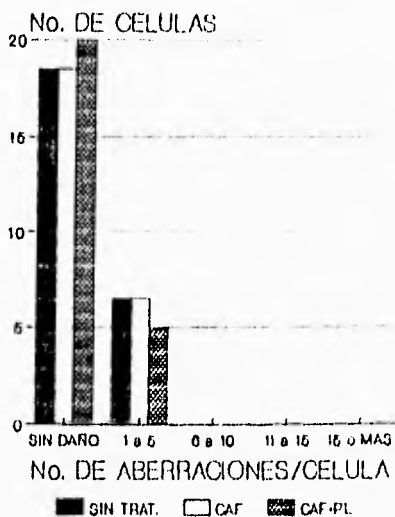


FIGURA 2. Líneas de grupos de complementación AF sin tratamiento y con daño inducido con MMC y efecto del plasma humano normal. Los grupos AF-A y C se trataron con 40ng/ml y AF-B y D con 10ng/ml de MMC. En AF-A no hubo crecimiento con el tratamiento de MMC + plasma.

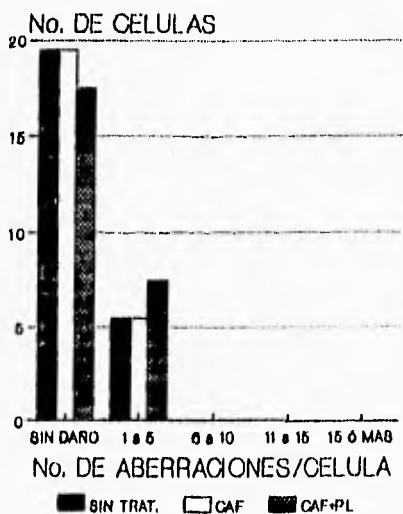
AF-A



AF-B



AF-C



AF-D

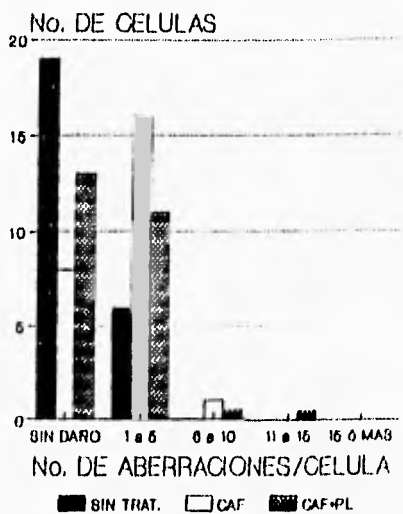
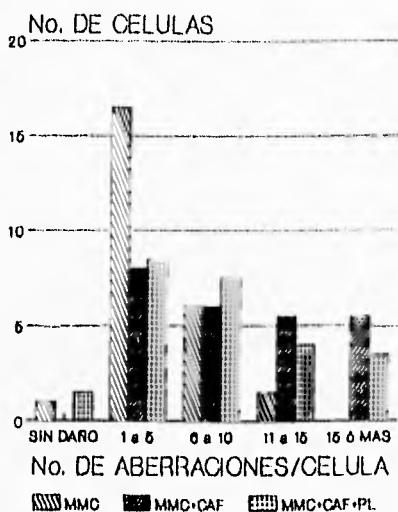
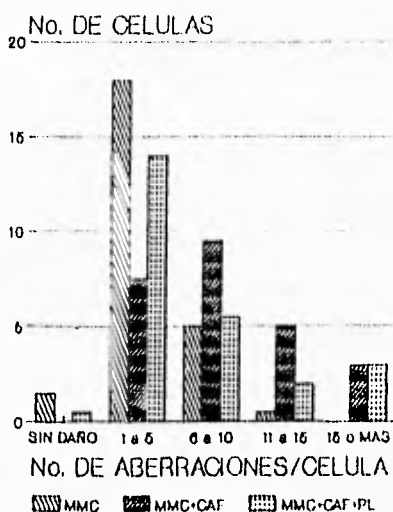


FIGURA 3. Efecto de la cafeina y de la cafeina + plasma humano normal en las cuatro lineas linfoblastoides AF, sin tratamiento con MMC.

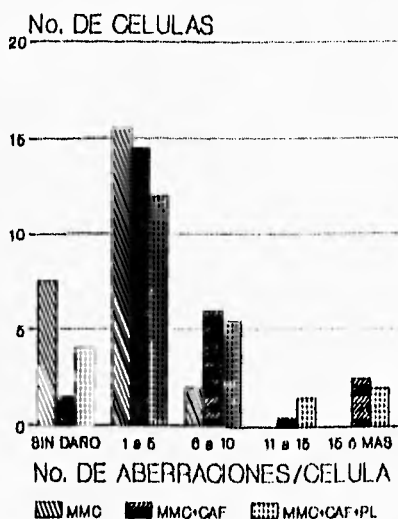
AF-A



AF-B



AF-C



AF-D

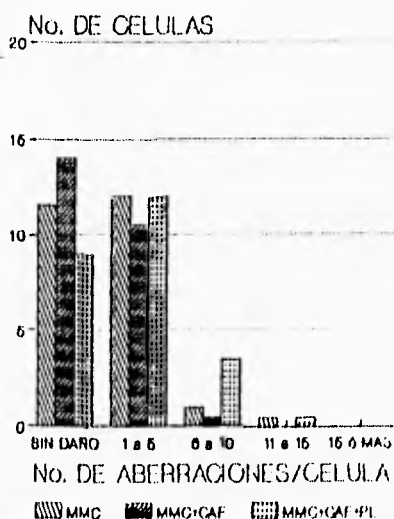


FIGURA 4. Efecto de la cafeina y de la cafeina más el plasma humano normal en líneas linfoblastoides de AF tratadas previamente con MMC. AF-A y C con 40ng/ml y AF -B y D con 10ng/ml de este agente.

DISCUSION

LINEA NORMAL.

En el presente estudio se encontró que la línea linfoblastoide NL-E, al agregarle cafeína no muestra un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas; esto concuerda con el conocimiento de que la cafeína a bajas concentraciones en cultivos celulares, no incrementa la incidencia de rupturas cromatídicas en células humanas (tanto células HeLa, como linfocitos) a menos que éstas sean expuestas a concentraciones muy altas durante un largo período de exposición (Timson, 1977).

Al adicionar cafeína al cultivo de células normales después del tratamiento con MMC, se observó un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas; esto apoya lo descrito por Timson en 1977, quien observó en fibroblastos y linfocitos de individuos normales esta potenciación en la frecuencia de rupturas cromosómicas, al agregar cafeína a células previamente tratadas con MMC.

EFECTO DE LA MMC EN CELULAS AF

De acuerdo a la literatura, nuestros resultados confirmaron que las células AF, sin importar el grupo de complementación son hipersensibles a la MMC en comparación con células normales, mostrando un gran incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

En reportes previos (Strathdee *et al*, 1992) se había demostrado que los diferentes grupos de complementación presentaban un fenotipo diferente con respecto a la respuesta a agentes que introducen uniones covalentes cruzadas en el ADN, se sabía que la respuesta al DEB era similar en las cuatro líneas, sin embargo la respuesta a MMC se encontró evidentemente diferente. En nuestro trabajo, también encontramos que existe una gran variabilidad de respuesta a MMC de acuerdo a cada línea celular, encontramos que la línea más sensible fue la AF-B y la menos sensible la AF-C, lo cual no concuerda con lo reportado previamente (Ishida y Buchwald, 1982), en donde se menciona que la línea más sensible de los grupos de complementación que manejamos es AF-A, es necesario hacer más experimentos para encontrar una explicación a estos resultados.

EFECTO DE LA CAFEINA SOLA EN LAS CELULAS AF

Cuando se hicieron los tratamientos con cafeína, encontramos un efecto diferente en el grupo de complementación AF-D, que mostró alrededor de cuatro veces más aberraciones cromosómicas que los demás grupos con cafeína sola. Esto nos hace pensar que el defecto básico de este grupo es diferente de los demás y probablemente esto se deba a que cada uno de ellos está dado por la expresión de un gen diferente (Whitney *et al*, 1995, Pronk *et al*, 1995 y Strathdee *et al*, 1992).

En linfocitos de pacientes AF, se ha encontrado un tiempo de duración del ciclo celular anormalmente largo a expensas principalmente de la fase G2; al tratar estas células con cafeína, se restaura el ciclo celular, acortando esta fase, periodo en el que se realiza la reparación post-replicativa (Sabatier y Dutrillaux, 1988, Seyschab *et al.*, 1994). Esta alteración del ciclo celular tendrá que ser estudiada posteriormente para ver si existen diferencias en el grupo de complementación AF-D, que fue en el que se obtuvo una respuesta diferente a los demás grupos.

Por otro lado, se ha visto en células HeLa y linfocitos humanos, que la cafeína inhibe la reparación post-replicativa del daño conferido por diversos agentes (Timson, 1977), particularmente en el llenado de gaps en el ADN recién sintetizado, y se sabe que las aberraciones cromosómicas son el resultado de la mala reparación o de falta de la misma (Brogger, 1974; Ishii y Bender, 1978).

También se ha reportado que en linfocitos humanos expuestos a rayos X, la cafeína puede potenciar o proteger del daño cromosómico, según las condiciones en las que ésta sea aplicada como lo es la concentración y temperatura (Stoilov *et al.*, 1994). Por este antecedente, es posible pensar que la acción de la cafeína en la línea AF-D fue de ayuda o disminución del daño conferido previamente por la MMC el cual se observa aún después de haber lavado las células y mantenerlas en buenas condiciones de cultivo.

Otra posible interpretación al efecto de la cafeína sobre AF-D es que este agente afecte las enzimas involucradas en la síntesis del ADN, específicamente en esta línea celular. Se ha visto en varios sistemas celulares que la actividad de la ADN polimerasa es inhibida por la acción de la cafeína. También hay reportes de que inhibe enzimas del metabolismo de purinas (grupo al cual pertenece la cafeína) y puede alterar la concentración basal normal de la reserva de nucleótidos precursores del ADN, causando con esto errores en el apareamiento, además, se sabe que la cafeína inhibe la incorporación de timidina al ADN tanto en sistemas procariontes como en eucariontes (IARC, 1991).

Si comparamos la frecuencia de aberraciones producida por la cafeína, tanto en la línea normal como en las líneas AF veremos que existe diferencia significativa solo entre NL-E y AF-D, mientras que en los demás grupos (AF-A, B y C) encontramos valores mayores que los obtenidos en las células normales, pero sin significancia estadística. Al comparar éstas últimas líneas con sus respectivos valores basales de aberraciones tampoco hay diferencia significativa, esto quizá sea debido a la baja concentración de cafeína que se aplicó y es preciso aclarar que la cafeína tiene un efecto nocivo sobre las células AF, pero este efecto no se aprecia en este estudio debido a la concentración manejada, ya que con concentraciones mayores disminuía considerablemente la proliferación celular y no fue posible obtener metafases para las lecturas.

Algo muy importante para este trabajo es que en algunos estudios se sugiere que la cafeína tiene un papel "anti-reparador" porque existe cierta competencia entre esta xantina y derivados de nucleótidos de adenina como el ATP, el cual es requerido para la reparación en G2 y altera de esta manera el pool de nucleótidos que se requiere para este proceso (González-Fernández y López-Saez, 1982).

EFFECTO DE LA CAFEINA Y MMC EN CELULAS AF

Al agregar las diferentes concentraciones de MMC a nuestras líneas celulares en estudio, se observó en la línea normal un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Por otro lado en las líneas AF el aumento fue significativamente mayor con respecto a la normal, aunque en la línea AF-C no se obtuvo diferencia significativa debido a la gran desviación estándar que tienen los datos, se demostró la gran clastogenicidad de este agente sobre células AF (Ishida y Buchwald, 1982).

Al agregar cafeína a las células previamente tratadas con MMC se observó en los grupos AF-A, B y C un efecto sinérgico del daño conferido por la MMC al igual que en las células normales con este mismo tratamiento. Esto ya ha sido descrito anteriormente en células de individuos normales, tratadas previamente con varios agentes alquilantes incluyendo MMC (Brogger, 1974), sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, el grupo de complementación AF-D tuvo un comportamiento diferente, ya que disminuyó la frecuencia de rupturas

cromosómicas de manera no significativa con respecto al tratamiento con cafeína sola lo que hace pensar nuevamente que el defecto básico de este padecimiento puede ser diferente en este grupo de complementación.

Existen estudios (Ishii y Bender, 1978) en los que se confirma la existencia de mecanismos de reparación sensibles a cafeína en linfocitos humanos y probablemente estos sistemas de reparación, se saturan y sólo sean capaces de reparar una fracción de aquellas lesiones inducidas por MMC. Es posible entonces, que las células de la línea AF-D no saturan dichos mecanismos por la acción de la cafeína y reparen mínimamente el daño producido por la MMC o bien que este grupo de complementación no disponga de estos mecanismos sensibles a la cafeína.

Es probable también, que los dos agentes que se manejaron en esta ocasión, MMC y cafeína, en AF-D actúen a nivel de una misma vía metabólica y sea por esto que no se percibe la potenciación que se encontró en las demás líneas de AF al agregar ambos agentes en un mismo tratamiento.

Hasta la fecha no se conoce con exactitud la causa de esta enfermedad, pero estos datos sugieren que los genes que están defectuosos pueden estar implicados en diferentes mecanismos bioquímicos.

EFFECTO DEL PLASMA HUMANO NORMAL SOBRE LAS LINEAS AF

Con respecto a la respuesta del plasma normal, en nuestro laboratorio (Camevale y Frias, 1985, Frias *et al*, 1991) en diversas ocasiones se ha demostrado su efecto corrector en linfocitos AF tratadas previamente con MMC, sin embargo, en el presente estudio, los linfoblastos no mostraron este comportamiento, esto deberá ser motivo de estudios posteriores para determinar la causa. Es importante recordar que en un estudio paralelo realizado en el laboratorio, si se encontró una disminución de aberraciones cromosómicas por la acción del plasma en células del grupo AF-A tratadas con MMC.

El plasma no tuvo efecto en ninguna línea celular cuando los linfoblastos fueron tratados con cafeína, o con MMC-cafeína. Es posible que el factor de corrección no actúe sobre daño causado por cafeína o que no se exprese en estas células por las modificaciones intrínsecas de los linfoblastos.

CONCLUSIONES

Los grupos de complementación de AF tienen una respuesta diferente a la MMC y a la cafeína, pero no corresponde una baja sensibilidad a MMC con una baja sensibilidad a cafeína, por lo cual se deduce que los mecanismos de acción de ambos agentes químicos que producen aberraciones cromosómicas son esencialmente diferentes

El grupo AF-D sin tratamiento previo con MMC, presentó sensibilidad a cafeína, mientras que el resto de los grupos se comportaron como la línea normal, pero cuando las células ya están dañadas con MMC, entonces se invierte su comportamiento ya que mientras AF-A, B y C presentan aproximadamente el doble de aberraciones cromosómicas, AF-D no cambia la frecuencia de aberraciones, por lo anterior, es posible que el defecto en AF-D sea: a) una saturación en sus sistemas cafeína-sensitivos ó b) que afecte el mismo mecanismo que da lugar a las aberraciones cromosómicas cuando estas células son tratadas con MMC

En el presente estudio, el plasma humano normal no tuvo efecto corrector del daño producido por ninguno de los agentes clastogénicos manejados aunque cabe recordar que en un estudio paralelo no incluido en este trabajo, sí se encontró este efecto en el tratamiento de MMC y plasma en el grupo de complementación AF-A

REFERENCIAS

- Alter, B.P. Fanconi's Anaemia and its Variability. *British Journal of Haematology*. 1993, 85:9-14.
- Auerbach, A.D., R.E. Koerse, R. Ghosh, V.S. Venkatraj, M.A. Zhang y N. Chiarazzi. Complementation Studies in Fanconi Anemia. *International Fanconi Anemia Registry*. 1989, 73:212-225.
- Berger, R., A. Bernheim, M. De Conat, D. Vecchione y G. Schaison. Chromosomal studies of leukemic and pre-leukemic Fanconi's anemia patients. *Hum. Genet.* 1980, 56: 59-62.
- Brogger A. Caffeine-induced enhancement of chromosome damage in human lymphocytes treated with Methyl-Methane-sulfonate, Mitomycin C and X-Rays. *Mutat. Res.* 1974, 23:353-366.
- Camevale, A. y S. Frías. Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la Mitomicina C de los linfocitos de anemia de Fanconi. *Rev. Invest. Clin. (Mex)* 1985, 37: 31-34.
- Chaganti, R.S.K. y J. Houldsworth. Fanconi Anemia. A Pleiotropic Mutation with Multiple Cellular and Developmental Abnormalities. *Ann. de Génét.* 1991, 34: 206-211.
- Claassen, E., Kortbeek, H. y F. Arwert. Effects of Mitomycin C on the rate of DNA synthesis in normal and Fanconi anaemia cells. *Mutat. Res.* 1986, 165: 15-19.
- Cohen M.M. y H.P. Levy. Chromosome Instability Syndromes, en *Advances in Human Genetics*. 1989; 18:43-145p.p.
- Cohen, M.M. y M.W. Shaw. Effects of Mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell Biol.* 1964; 23:386-395.
- Daly, W.J. Mechanism of Action of Caffeine, en *Caffeine, Coffee and Health*, editado por Garattini S. Raven Press. 1993, 97-150.
- Digweed M, Zakrzewsky S, Sperling K. Fanconi's anemia: correlation of genetic complementation group with psoralen /UVA response. *Hum. Genet.* 1988, 78: 51-54.

- Dutrillaux, B., C. Dubos, E. Viegas-Pequinot y D. Barrot. Partial endoreduplication. A new cytogenetic anomaly possibly related to a DNA repair defect. *Ann. Génét.* 1979, 22: 25-28
- Frazelle J.H., J.S. Harris y M. Swift. Response of Fanconi Anemia fibroblasts to Adenine y Purine analogues. *Mutat. Res.* 1981, 80: 373-380
- Frías S., A. Carnevale y V. Del Castillo. Utilidad de la prueba de exposición de linfocitos a Mitomicina C en el diagnóstico de anemia de Fanconi. *Rev. Invest. Clín. (Mex)* 1984, 36: 219-224
- Frías S., A. Carnevale, B. Molina y V. Del Castillo. Estudio de heterogeneidad genética en anemia de Fanconi por medio de la adición del plasma. *Rev. Invest. Clín. (Mex)* 1986, 38: 269-271.
- Frías S., S. Mendoza, B. Molina y A. Carnevale. Effect of Mitomycin C and Bromodeoxyuridine on Fanconi anemia lymphocytes. *Ann. Genet.* 1991, 2: 104-107
- Gibson R.A., A. Hajianpour, M. Murer-Orlando, M. Buchwald y Ch G. Mathew. A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anemia group C gene. *Human Molec. Genet.* 1993, 6: 797-799.
- González-Fernández A. y J.F. López Sáez. Effect of caffeine on G2 repair and its reversion by adenosine. *Mutat. Res.* 1982; 106:255-264.
- González- Fernández A.,P. Hernández y J.F. López Sáez. Effect of caffeine and adenosine on G2 repair: mitotic delay and chromosome damage. *Mutat. Res.* 1985, 149: 275-281
- Gordon-Smith, E.C. y T. Rutherford. Fanconi Anemia- Constitutional, familial aplastic anemia. *Baillière's Clinical Haematology* (1989)1
- Gutierrez, L.M. Mitomycin C in childhood cancer a review. en *Mitomycin C current status and new developments.* Ed. Carter S.K. y S.T. Crook. New York: Acad. Press. 1979
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1991, 51: 291-390
- Ishida, R y M. Buchwald. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA cross-linking and alkylating agents. *Cancer Research* 1982, 42: 4000-4006
- Ishii, Y y M. A. Bender. Caffeine inhibition of prereplication repair of Mitomycin C-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Mutat. Res.* 1978, 51: 119-125

- Joenje, H., Arwert, F., Eriksson, A. W., König, H. and Anneke B. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* 1981, 290 142-143
- Joenje, H., Lo Ten Foe, R., Oostra, A., Berkel, C., Roomans, M., Schroeder-Kurth, T., Wegner, R., Gille, J., Buchwald, M. y Arwert, F. Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: Evidence of a fifth genetic subtype. *Blood* 1995, 86 2156-2160
- Moustacchi, E., Papadopoulo, D., Diallo-Zito, C. y M. Buchwald. Two complementation groups of Fanconi's anemia differ in their phenotypic response to a DNA-crosslinking treatment. *Hum. Genet.* 1987; 75:45-47.
- Pincheira, J y M. Bravo. Fanconi's Anemia lymphocytes. Effect of Caffeine, Adenosine and Nicotinamide during G2 prophase. *Mutat. Res.* 1988, 199 159-165
- Porfiro, B., G. Ambraso, G. Gianella, G. Isacchi, B. Dallapiccola. Partial correction of chromosome instability in Fanconi anemia by desferrioxamine. *Hum. Genet.* 1989, 83 49-51
- Pronk, J., Gibson, R., Savona, A., Wijker, M., Morgan, N., Melchionda, S., Ford, D., Lemtany, S., Ortega, J., Jansen, S., Havenga, C., Cohn, R., De Ravel, T., Roberts, F., Westerveld, A., Easton, D., Joenje, H., Mathew, C. y F. Arwert. Localisation of the Fanconi anemia complementation group A gene to chromosome 10q24.3. *Nature Genetics* 1995, 11 338-340
- Remers, A.W. Mitomycin C an analog development en Mitomycins C current status and new developments. Ed. Carter S.K. y S.T. Crook. New York Acad. Press 1979
- Rosselli, F., J. Wietzerbin y E. Moustacchi. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. *Hum. genet* 1992, 89 42-48
- Sabatier, L. y B. Dutrillaux. Effect of caffeine in Fanconi Anemia Restoration of a normal duration of G2. *Hum. Genet.* 1988, 79: 242-244
- Sasaki M.S. and A. Tononuta. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA crosslinking agents. *Cancer Res* 1973, 33 1829-36
- Schroeder, T. M., Anschutz, F., Knopp, A. Spontane chromosomenaberrationen bei familiarer panmyelopathie. *Hum. Genet.* 1964, 1 194-196.

ESTA COPIA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Seyschab, H., Bretzel, G., Friedl, R., Schindler, D., Sun, Y. y H. Hochm. Modulation of the spontaneous G2 phase blockage in Fanconi anemia cells by caffeine: differences from cells arrested by X-irradiation. *Mutat. Res.* 1994, 308: 149-157
- Stoilov, L.M., Mullenders, L.H. y A.T. Natarajan. Caffeine potentiates or protects against radiation-induced DNA and chromosomal damage in human lymphocytes depending on temperature and concentration. *Mutat. Res.* 1994, 311: 169-174
- Strathdee, C.A., A.M.V. Duncany M. Buchwald. Evidence for at least four Fanconi Anemia genes including FACC on chromosome 9. *Nature Genetics.* 1992, 1: 196-198
- Timson, J. Caffeine. *Mutat. Res.* 1977, 47: 1-52
- Whitney, M., Thayer, M., Reifsteck, C., Olson, S., Smith, L., Jakobs, P., Leach, R., Naylor, S., Joenje, H. y M. Grompe. Microcell mediated chromosome transfer maps the Fanconi anemia group D gene to chromosome 3p. *Nature Genetics.* 1995, 11: 341-343
- Yamashita, T., D. L. Barber, Y. Zhu, N. Wu and A.D. D'Andrea. The Fanconi anemia polypeptide FACC is localized to the cytoplasm. *Proc. Natl. Sci. (USA)* 1994, 91: 6712-6716
- Youssoufian H. Localization of Fanconi anemia C protein to the cytoplasm of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1994, 91: 7975-7980
- Zakrzewski S. y Sperling K. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum. Genet.* 1980, 56: 81-84