

11262

5  
2es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ASIGNACION DE GRUPO DE COMPLEMENTACION Y DESCRIPCION DEL FENOTIPO CLINICO-CITOGENETICO EN PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

DRA. MARIA DEL CARMEN ESMER SANCHEZ

TUTOR: DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI.  
COTUTOR: DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ.

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

259430



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **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.

## **AGRADECIMIENTOS.**

- ◆ A la Dra. SARA FRIAS por todo el apoyo, la dedicación y el tiempo invertido en la dirección de esta tesis
- ◆ A la Dra. Alessandra Carnevale, por la confianza y apoyo durante la realización de este trabajo.
- ◆ A Bertha, gracias por todo el esfuerzo, la dedicación y amistad.
- ◆ A Roberto Cruz, gracias por tu colaboración.
- ◆ A todos en el laboratorio de citogenética por la colaboración académica, por el trabajo en equipo pero sobretodo por su amistad.

- ◆ A mis padres David y Rosalinda, por su apoyo y amor que hacen que todo pueda ser realidad.
- ◆ A mis hermanos David, Martín y Rodrigo, gracias por ser el mejor ejemplo de lucha, superación, amor al trabajo y a la familia que he tenido.
- ◆ A Rodolfo, gracias por tu amistad y por estar conmigo, a pesar de todo.

AMIGOS, GRACIAS POR SU AMOR, POR SU APOYO  
Y POR ESTAR SIEMPRE AHI PARA LUCHAR  
CONMIGO

- ◆ Angélica
- ◆ Mariana
- ◆ Bertha
- ◆ Ana
- ◆ Emeli
- ◆ Verónica
- ◆ Sandra
- ◆ Roberto C.
- ◆ Roberto S.

**DIOS, GRACIAS POR BENDECIR CADA UNO DE  
MIS DIAS Y POR SER SIEMPRE LA LUZ AL FINAL  
DEL CAMINO**

# INDICE

	<b>PAGINA</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	3
1. Características clínicas	3
2. Anormalidades citogenéticas	4
3. Fenotipo celular	5
4. Estudios de complementación	6
5. Defecto genético	7
6. Correlación clínica y citogenética por grupos de complementación.	9
<b>JUSTIFICACION</b>	10
<b>HIPOTESIS</b>	11
<b>OBJETIVOS</b>	11
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	12
<b>METODOLOGÍA</b>	12
1.- Población de estudio	12
2.- Líneas linfoblastoides.	13
3.- Complementación.	15

4.- Respuesta celular a la exposición a mutágenos bifuncionales.	15
5.- Descripción del fenotipo clínico.	18
<b>RESULTADOS</b>	19
1.- Características de la población.	19
2.- Líneas linfoblastoides de pacientes y familiares de primer grado.	21
3.- Estudios de complementación.	21
4.- Respuesta celular a la adición de mutágenos.	22
5.- Correlación fenotipo-genotipo.	23
<b>DISCUSION</b>	25
1. Características clínicas.	25
2. Líneas linfoblastoides.	28
3. Complementación en anemia de Fanconi.	28
4. Correlación fenotipo-genotipo	29
<b>APENDICES</b>	32
<b>TABLAS</b>	35
<b>FIGURAS</b>	49
<b>REFERENCIAS</b>	58



## ANTECEDENTES.

La anemia de Fanconi (AF) fue descrita por primera vez en 1927 y es, tal vez la forma más intrigante de las fallas hereditarias de médula ósea. Forma parte de los síndromes de inestabilidad cromosómica los cuales tienen en común un aumento en la frecuencia de rupturas cromosómicas espontáneas e hipersensibilidad celular a mutágenos asociada con malformaciones congénitas (1,2).

AF se hereda en forma autosómica recesiva, es un padecimiento raro con una prevalencia en caucásicos de 1/350,000 a 1/476,000, en algunas poblaciones como Turquía y los grupos negros de África tiene una prevalencia de 1/26,000 probablemente es más frecuente debido a la alta frecuencia de matrimonios consanguíneos (3, 4). Hasta 1992 se habían reportado aproximadamente 1000 pacientes en la literatura mundial. A pesar de que la frecuencia de homocigotos es baja, como en otros padecimientos recesivos, los heterocigotos son relativamente frecuentes, se ha estimado que 1 de cada 200 individuos es portador de una mutación en los genes AF, y es posible que algunos casos de anemia aplásica adquirida sean causados por heterocigocidad para los genes AF (5,6).

### 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

Entre las características clínicas más constantes se encuentran la pancitopenia, el retraso en el crecimiento y la hiperpigmentación cutánea, que están presentes en más del 60% de los pacientes. Al nacimiento el diagnóstico puede establecerse con base en la presencia de malformaciones; lo más frecuente es que exista afección al sistema esquelético principalmente de radio y pulgar y menos del 50% cursa con anomalías renales, genitales, oculares, auditivas y cardíacas. El 5% de los pacientes desarrollará alguna neoplasia, principalmente hematológicas (leucemias) y carcinomas en particular cáncer hepático; en forma general se acepta que un paciente AF tiene 15,000 veces mayor riesgo de desarrollar cáncer en edades pediátricas (1,3,6).

El cuadro clínico es muy variable, tanto que hasta un 37% de los pacientes no presenta malformaciones congénitas asociadas y el diagnóstico no se hace sino hasta que aparece la pancitopenia la cual también se comporta de manera heterogénea y se presenta con diversos grados de gravedad y con edades de inicio variables, sin embargo está presente en el 90% de los casos (1). Aunque la mayoría de los pacientes se diagnostican entre los 3-7 años de edad en base a la presencia de pancitopenia, en un 10% el diagnóstico se establece después de los 16 años; el rango de edad al diagnóstico varía de 0-38 años y la manifestación inicial siempre es la trombocitopenia. El tratamiento

inicial para la pancitopenia consiste en la administración de andrógenos por vía oral y es notorio que la capacidad de respuesta al tratamiento no es constante al observar que el periodo de respuesta a ellos varía desde pocos meses hasta más de 20 años. La principal causa de muerte la constituyen las complicaciones secundarias a la aplasia medular, 41% por hemorragia sistémica y 21% por hemorragia al SNC seguida por un 14% ocasionadas por infección y leucemia(7,8) . Por lo tanto pudiera decirse que el cuadro clínico se comporta dentro de un continuo de manifestaciones en donde algunos pacientes tienen un cuadro relativamente leve con desarrollo esquelético normal, anomalías hematopoyéticas subclínicas y sobrevive hasta la 4a. o 5a. décadas de la vida y en el otro extremo se encuentran pacientes con un fenotipo más grave, anomalías esqueléticas múltiples e inicio temprano de anemia aplásica y/o cáncer. Hasta la fecha se desconocen las bases moleculares que determinan ésta heterogeneidad fenotípica, por lo que predecir el comportamiento clínico de un paciente es extremadamente difícil. En un intento por dimensionar el cuadro clínico Auerbach y cols en 1989 establecieron un sistema en el cual se adiciona un punto por la presencia de cada una de las 6 siguientes alteraciones: retraso en el crecimiento, dismorfias menores, malformación renal y/o urinaria, plaquetopenia, anomalías de radio o pulgar y microftalmia, y resta un punto a los pacientes con retraso mental y otras alteraciones esqueléticas que no involucren al eje radial (9). En estudios posteriores se modificó la escala añadiendo también un punto por las últimas dos características; la puntuación mínima es 0 y la máxima 8 (10). De acuerdo a esta clasificación, los pacientes con puntuación mayor a 4 se considera que tienen un cuadro clínico "grave" y los que tienen 4 o menos "leve" (7). También existe una escala de medición que evalúa la gravedad y la respuesta a andrógenos de la pancitopenia, la cual se muestra en la tabla 1. Los pacientes casi siempre se diagnostican en etapas 3, 4 ó 5 que son estadios con menor gravedad de anemia y pasan casi invariablemente al grado 1, etapa muy grave y dependiente de transfusión sanguínea. El estudio citogenético en hermanos asintomáticos permite que puedan identificarse pacientes en etapa 6, sin anemia.

## 2. ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS.

En 1964 se describió que a nivel citogenético la AF se caracteriza por presentar inestabilidad cromosómica que se manifiesta con rupturas cromosómicas espontáneas, sin embargo su utilidad con fines diagnósticos era poca ya que la cantidad de aberraciones es baja e indistinguible de las que se producen con infecciones virales u otros síndromes genéticos (12). Posteriormente, se encontró hipersensibilidad cromosómica a agentes alquilantes bifuncionales como la mitomicina C (MMC)

(13,14,15), el diepoxibutano (DEB) (16), el 8-metoxipsoralen activado con luz ultravioleta (MOP-UVA) (17) y otros agentes clastógenos que causan daño al ADN. El mecanismo común por el que estos agentes causan aberraciones cromosómicas está dado por su capacidad de inducir la formación de enlaces cruzados covalentes inter e intracatenarios, lo que se traduce citogenéticamente en rupturas cromatídicas y figuras de intercambio. El diagnóstico definitivo se establece cuando en los linfocitos de sangre periférica se demuestra una respuesta a MMC o DEB de 3 a 10 veces mayor que un control normal. Además, con su uso la AF se puede distinguir claramente de cualquiera otra causa de inestabilidad cromosómica. El comportamiento celular de los pacientes con AF también es heterogéneo, ya que presentan frecuencias variables de aberraciones espontáneas y también responden de manera diferente a la exposición a mutágenos. Por ejemplo, se han descrito pacientes que no son tan sensibles a la administración de MMC y aunque todos responden a DEB su sensibilidad es variable (18,19). Se han hecho intentos por relacionar aspectos del cuadro clínico con el grado de sensibilidad a mutágenos, partiendo del supuesto de que a mayor gravedad del cuadro, mayor sensibilidad a mutágenos, sin embargo hasta el momento no se ha podido establecer una clara asociación (8). Esto se complica aún más con la existencia de pacientes en los que al exponer sus linfocitos a mutágenos se evidencia la existencia de dos poblaciones celulares, una responsiva y otra no responsiva (19), que apunta a que el mosaicismo somático puede ser un factor que contribuya a la variabilidad clínica y citogenética.

### **3.- FENOTIPO CELULAR.**

El defecto básico en Anemia de Fanconi se desconoce, sin embargo se tienen evidencias de anomalías en varios mecanismos, que además posiblemente estén relacionados entre sí:

#### **1.- Reparación del ADN.**

Debido a la existencia de inestabilidad cromosómica y predisposición a neoplasias los procesos que reparan el daño al ADN son los principales candidatos para presentar un defecto en AF, específicamente se ha propuesto que la célula AF puede ser deficiente en la remoción de enlaces cruzados covalentes intercatenarios. Las evidencias hasta el momento son controversiales, dado que los resultados no han sido reproducibles entre diferentes laboratorios, lo cual puede ser debido al estudio de células pertenecientes a grupos de complementación diferentes. (20)

#### **2.- Respuesta anormal al estrés oxidativo.**

Está demostrado que la frecuencia de aberraciones espontáneas en linfocitos AF cultivados se incrementa al aumentar la concentración de oxígeno, por lo que se ha postulado que el defecto pudiera

estar ligado a los complejos sistemas de defensa en contra del daño oxidativo, los cuales participan tanto para evitar la formación excesiva de radicales libres derivados del oxígeno como para reparar el daño producido por ellos. Hoehn y colaboradores han propuesto que la mutación AF causa un defecto en la progresión del ciclo celular que produce un arresto en la fase G2 del ciclo celular y una disminución de la proliferación en presencia de oxígeno. Sin embargo esta característica se pierde cuando se analizan células transformadas, lo que hace sospechar que éste es un defecto indirecto. (21-23)

### 3.- Defecto en el ciclo celular:

Se han demostrado anomalías en el control del ciclo celular en células AF, como el retraso espontáneo e inducido por agentes clastógenos y por el oxígeno en la fase G2; este retraso es seguido por la inducción masiva de apoptosis, que resulta en capacidad de proliferación reducida. En células AF no transformadas también se ha demostrado arresto en la fase S del ciclo celular y acortamiento de la fase G1. Estos hallazgos han motivado las investigaciones sobre la transición a través de las diferentes fases del ciclo celular en las células AF.

### 4.- Producción de citocinas.

Se han descrito diversas anomalías en la producción celular de linfocinas en células AF, como la disminución de IL-6 y sobreproducción de Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). Una vez más las evidencias no son concluyentes respecto a si se trata de una anomalía primaria o secundaria del defecto básico en AF (3,20,22,23).

## 4.- ESTUDIOS DE COMPLEMENTACION.

La variabilidad encontrada a nivel clínico y citogenético se ha intentado explicar por la existencia de varios genes responsables del padecimiento (24).

Los primeros autores en demostrar la heterogeneidad genética en AF fueron Zakrewski y Sperling, quienes en 1980 al fusionar células de 2 pacientes que mostraban sensibilidades diferentes a agentes alquilantes encontraron que existía disminución de la sensibilidad a mutágenos en los híbridos. A estos estudios en donde se realiza fusión celular y se corrige el fenotipo se les denomina estudios de COMPLEMENTACION (25), ya que al tratarse de células con defectos genéticos diferentes, complementan una a otra su deficiencia.

En 1988, Digweed y cols (26) utilizando una estrategia diferente, describieron que cuando se exponían células AF a MOP-UVA y se medía la síntesis programada del ADN, se podían distinguir claramente dos tipos de respuesta, lo que apuntó una vez más hacia la existencia de al menos dos grupos con un defecto genético diferente. El denominado grupo A en los estudios previos, no recupera su síntesis 24 hrs después de la exposición, mientras que las células del grupo B recuperan la síntesis normal en cerca de 10 hrs (muy parecido al normal); estos dos experimentos permitieron la descripción de los 2 primeros grupos de complementación A y B (27-29).

Volviendo a la estrategia de la fusión celular, en 1992 Buchwald reportó la existencia de al menos otros dos grupos de complementación (C y D), en los que se demostró corrección del fenotipo al fusionar con A y B (30).

En 1994, se inició en la comunidad europea un proyecto a gran escala encaminado a realizar complementación en forma sistemática a todos los pacientes europeos con AF, con el cual se describió un quinto grupo de complementación (AF-E) (31) y se evidenció la posibilidad de por lo menos otros 3 grupos de complementación. Hasta fines de 1996 se habían incluido 111 familias, 81 se asignaron a un grupo de complementación y en 30 se obtuvo una línea resistente a mutágenos lo que impidió realizar la complementación (Tabla 2). Es notorio que la mayoría de los pacientes se encuentran clasificados dentro de los grupos de complementación A y C (Fig 1), y que hay diferencias regionales en cuanto a el predominio de uno u otro grupo en determinadas poblaciones (10, 32,33). Italia es una de estas poblaciones en donde 10 de 12 pacientes estudiados pertenecieron al grupo de complementación A, la mayoría de los sujetos que hasta ahora han sido asignados al grupo E son de origen alemán, pero los estudios iniciales de hibridación señalan que este grupo pudiera ser heterogéneo (grupos de complementación F,G y H) (10,30-34)

Este y otros estudios han probado que los grupos de complementación B y D son raros, recopilando los datos publicados hasta ahora, hay 2 pacientes asignados en el grupo B y 3 en el D en todo el mundo (27,29, tabla 2).

## 5.- DEFECTO GENETICO.

El gen responsable en el grupo de complementación C fue el primero de los cuatro grupos en ser mapeado. Se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9 y se le denomina FACC (Fanconi Anemia Complementation group C), tiene 14 exones y codifica para una proteína (FA-C) de 558 aminoácidos que se localiza en el citoplasma y cuya función se desconoce (35,36).

Verlander y cols (37), en 1994 estudiaron 175 familias AF y encontraron mutaciones en el gen FACC en 25 de ellas, describieron ocho diferentes mutaciones en este gen, las dos más frecuentes, corroboradas en estudios posteriores (38,39), son la delección de una guanina que altera el marco de lectura (322delG Exón 1) y la mutación IVS4+4 A-->T dentro del intrón 4 que inserta 4 bases en el sitio de corte-empalme en la unión intrón-exón; esta última mutación se ha encontrado en la mayoría de pacientes judíos Ashkenazi y solo en el 8% de pacientes con otro origen. Otras mutaciones encontradas son el cambio de una leucina por una prolina en la posición 554 de la proteína (L554P en exón 14), cambio de una arginina por un codón de terminación (R185X) en el exón 6, cambio de una glutamina por un codón de terminación en el exón 1 (Q13X) y cambio de asparagina por valina en el exón 6 (D195V).

En los pacientes que no pertenecen al grupo C se han buscado intencionadamente mutaciones en FACC y se ha encontrado este gen sin alteraciones por lo que se descarta que la corrección observada sea efecto de complementación intragénica. (35-39)

En 1996 fue clonado el gen responsable del grupo de complementación A; localizado en 16q24.3, codifica para una proteína de 4368 aminoácidos, tiene 2 señales de localización nuclear y secuencias que predicen unión al DNA, sin embargo existen evidencias de que también pudiera tener una localización citoplasmática (Kuyrt F, comunicación personal) y su función es desconocida.. No se ha detectado que exista una mutación que predomine pero sólo hay 4 pacientes estudiados y reportados en la literatura (40-43).

En los grupos B, D y E falta por descubrirse los genes responsables, una de las principales dificultades para hacerlo es el poco número de pacientes en estos grupos. En el grupo de complementación D se ha aislado un gen candidato que mapea en la región 3p22-26 (44). Los grupos B y E aun no han sido mapeados a ningún cromosoma.

La función de los genes AF se desconoce, la localización de FA-C en el citoplasma hace pensar que podría ejercer su acción ya sea regulando de alguna manera el ciclo celular o bien directamente en la detoxificación de drogas que penetran a la célula. Es probable que FA- A, interactúe funcionalmente con FA-C en los mismos procesos ya sea formando un complejo multiprotéico o bien actuando en forma secuencial, en forma parecida o igual a lo que ocurre en la transducción de señales (3,20).

Con estos antecedentes generales se confirma que los estudios de complementación han sido muy útiles para identificar genes candidatos y caracterizarlos. Una vez que se ha descubierto el gen

responsable de un padecimiento se abren las puertas para idear estrategias de terapia génica y también para la realización de diagnóstico prenatal.

## **6.- CORRELACION CLINICA Y CITOGENETICA POR GRUPOS DE COMPLEMENTACION.**

Se han reportado las características clínicas y la respuesta citogenética de múltiples pacientes, sin conocer el grupo de complementación al que pertenecen; los cuadros clínicos que pudieran estar asociados a los grupos de complementación están resumidos en la tabla 3. A pesar de contar con un buen número de pacientes clasificados, el comportamiento celular en los diferentes grupos de complementación ha sido poco estudiado, y aunque se ha observado que existe variabilidad en cuanto a la sensibilidad individual a mutágenos, se desconoce si ésta pudiera ser definitivamente distintiva de cada grupo de complementación (45).

En el caso de FACC, se ha intentado correlacionar el genotipo con el fenotipo, en un estudio de 18 pacientes, 9 con la mutación IVS4+4 A-T y 9 con delección de una guanina en la posición 322. Se encontró que estos últimos tenían un cuadro clasificado como leve, con un puntaje clínico de menos de 4 (según la clasificación clínica previamente descrita) mientras que los pacientes del otro grupo presentaban puntuaciones entre 4 y 5 y tuvieron mayor predisposición al desarrollo de neoplasias hematológicas (46).

## JUSTIFICACIÓN.

Hasta la fecha se desconoce si existe un fenotipo clínico y celular que defina a cada grupo de complementación y si existe relación entre el grupo de complementación, el fenotipo celular y las manifestaciones clínicas. Esto ayudaría a entender las variaciones tanto clínicas como en la respuesta a mutágenos encontradas en los pacientes. Además es necesario clasificar al mayor número posible de pacientes para saber si existen más grupos de complementación, ya que cada grupo puede representar una alteración diferente y el número de grupos podría reflejar el total de genes involucrados en el proceso anormal en esta entidad. Por último el avance en el entendimiento de la AF facilitará el diagnóstico específico del padecimiento, permitirá brindar asesoramiento genético en cuanto a evolución y pronóstico y plantear nuevas terapéuticas encaminadas a suplir el defecto biológico y/o genético subyacente.

Existe una línea de investigación en el laboratorio de citogenética del INP sobre AF (47-49) y este estudio se planteó por la necesidad de entender las diferencias observadas en el comportamiento clínico y citogenético, mejorar la atención al paciente y apoyar los diferentes experimentos en curso.



## **HIPÓTESIS.**

La heterogeneidad genética en Anemia de Fanconi explica la variabilidad clínica y citogenética encontrada en los pacientes, por lo que debe existir relación entre grupo de complementación y fenotipo clínico y celular.

## **OBJETIVOS**

- 1.- Identificar, por medio de estudios de fusión celular el grupo de complementación al que pertenecen los pacientes de la muestra de estudio.
- 2.- Evaluar las características del cuadro clínico y de la anemia y determinar si la variabilidad en estos se encuentra relacionada con el grupo de complementación.
- 3.- Cuantificar la sensibilidad a mutágenos mediante curvas de inhibición del crecimiento y aberraciones cromosómicas inducidas con MMC y DEB en líneas linfoblastoides (LLB) AF y definir si existe asociación entre grupo de complementación y variabilidad en la respuesta a mutágenos.
- 4.- Determinar si el grupo de complementación y la sensibilidad a mutágenos pueden predecir alguna característica del cuadro clínico (gravedad de la pancitopenia, presencia o ausencia de malformaciones congénitas).

## **HIPÓTESIS.**

La heterogeneidad genética en Anemia de Fanconi explica la variabilidad clínica y citogenética encontrada en los pacientes, por lo que debe existir relación entre grupo de complementación y fenotipo clínico y celular.

## **OBJETIVOS**

- 1.- Identificar, por medio de estudios de fusión celular el grupo de complementación al que pertenecen los pacientes de la muestra de estudio.
- 2.- Evaluar las características del cuadro clínico y de la anemia y determinar si la variabilidad en estos se encuentra relacionada con el grupo de complementación.
- 3.- Cuantificar la sensibilidad a mutágenos mediante curvas de inhibición del crecimiento y aberraciones cromosómicas inducidas con MMC y DEB en líneas linfoblastoides (LLB) AF y definir si existe asociación entre grupo de complementación y variabilidad en la respuesta a mutágenos.
- 4.- Determinar si el grupo de complementación y la sensibilidad a mutágenos pueden predecir alguna característica del cuadro clínico (gravedad de la pancitopenia, presencia o ausencia de malformaciones congénitas).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

1.- Se realizó la captación de pacientes y se confirmó el diagnóstico de Anemia de Fanconi, mediante evaluación clínica y citogenética.

2.- Se obtuvo el puntaje clínico de acuerdo a Auerbach y cols (9), y se estadificó la pancitopenia de acuerdo a la escala de Alter y cols (10) modificada por Savoia y cols (11).

3.- Se establecieron líneas linfoblastoides de los propositi y hermanos afectados en caso de que los hubiera.

También se establecieron líneas linfoblastoides de padres y hermanos sanos.

4.- El fenotipo celular se estudió mediante la evaluación de la respuesta a MMC y DEB en los pacientes y en 4 LLB del grupo de complementación A, 2 del grupo B, 5 del grupo C, 3 del grupo D y 1 del grupo E. Donadas por Dr. Hans Joenje, Vrije Universiet, Amsterdam; Holanda. Se utilizaron como parámetros:

- Curvas de inhibición del crecimiento. Las células AF, en cultivo, se retaron con 8 diferentes concentraciones de MMC y DEB; se utilizó un noveno cultivo sin tratamiento, el cual se monitoreó con cuentas celulares hasta que se alcanzaron 3 duplicaciones de la población celular original y se procedió a contar el resto del experimento. Con esta información se determinó la concentración en la cual se presentó una inhibición del crecimiento de la población celular del 50%.

- Aberraciones cromosómicas. Se colocó una población celular de  $1.5 \times 10^5$  en cultivo durante 24 hrs, se adicionó MMC (10ng/ml) o DEB (0.05m g/ml) por otras 24 hrs, se lavaron los mutágenos y se cosechó a las 24 hrs post-tratamiento. Se analizaron aberraciones cromosómicas.

5.- Para clasificar a los pacientes en grupos de complementación se realizó fusión celular inducida por polietilenglicol. Se utilizaron líneas celulares ya caracterizadas en los diferentes grupos. Después de la fusión se realizaron pruebas de reto con MMC, para determinar corrección del fenotipo.

6.- Se determinó la existencia de concordancia y/o variabilidad clínica y citogenética inter-grupo e intragrupo de complementación.

## METODOLOGIA

### 1.- POBLACION DE ESTUDIO.

Se incluyeron 12 casos índice con Anemia de Fanconi, 4 diagnosticados previo al inicio de este trabajo, los cuales fueron captados de los servicios de Hematología y Genética del Instituto Nacional de Pediatría. Los ocho pacientes restantes fueron diagnosticados durante la realización del protocolo,

## DISEÑO EXPERIMENTAL

1.- Se realizó la captación de pacientes y se confirmó el diagnóstico de Anemia de Fanconi, mediante evaluación clínica y citogenética.

2.- Se obtuvo el puntaje clínico de acuerdo a Auerbach y cols (9), y se estadificó la pancitopenia de acuerdo a la escala de Alter y cols (10) modificada por Savoia y cols (11).

3.- Se establecieron líneas linfoblastoides de los propiiti y hermanos afectados en caso de que los hubiera.

También se establecieron líneas linfoblastoides de padres y hermanos sanos.

4.- El fenotipo celular se estudió mediante la evaluación de la respuesta a MMC y DEB en los pacientes y en 4 LLB del grupo de complementación A, 2 del grupo B, 5 del grupo C, 3 del grupo D y 1 del grupo E. Donadas por Dr. Hans Joenje, Vrije Universiet, Amsterdam; Holanda. Se utilizaron como parámetros:

- Curvas de inhibición del crecimiento. Las células AF, en cultivo, se retaron con 8 diferentes concentraciones de MMC y DEB; se utilizó un noveno cultivo sin tratamiento, el cual se monitoreó con cuentas celulares hasta que se alcanzaron 3 duplicaciones de la población celular original y se procedió a contar el resto del experimento. Con esta información se determinó la concentración en la cual se presentó una inhibición del crecimiento de la población celular del 50%.

- Aberraciones cromosómicas. Se colocó una población celular de  $1.5 \times 10^5$  en cultivo durante 24 hrs, se adicionó MMC (10ng/ml) o DEB (0.05m g/ml) por otras 24 hrs, se lavaron los mutágenos y se cosechó a las 24 hrs post-tratamiento. Se analizaron aberraciones cromosómicas.

5.- Para clasificar a los pacientes en grupos de complementación se realizó fusión celular inducida por polietilenglicol. Se utilizaron líneas celulares ya caracterizadas en los diferentes grupos. Después de la fusión se realizaron pruebas de reto con MMC, para determinar corrección del fenotipo.

6.- Se determinó la existencia de concordancia y/o variabilidad clínica y citogenética inter-grupo e intragrupo de complementación.

## METODOLOGIA

### 1.- POBLACION DE ESTUDIO.

Se incluyeron 12 casos índice con Anemia de Fanconi, 4 diagnosticados previo al inicio de este trabajo, los cuales fueron captados de los servicios de Hematología y Genética del Instituto Nacional de Pediatría. Los ocho pacientes restantes fueron diagnosticados durante la realización del protocolo,

tres del INP, tres provenientes del IMSS de León, Gto.), uno contactado a través del EUFAR (Registro Europeo de pacientes con Anemia de Fanconi) y uno enviado del Hospital General de Ticoman. Además, se realizaron estudios citogenéticos con MMC y DEB en otros 10 pacientes, ocho captados a través del servicio de Hematología de INP, dos enviados de Centro Médico Nacional S. XXI, en estos se descartó el diagnóstico de AF.

El diagnóstico definitivo de AF, en todos los casos se fundamentó en las características clínicas y citogenéticas listadas en el apéndice 1. Se realizó la recolección de datos clínicos de acuerdo al contenido del apéndice 2 y se elaboró el árbol genealógico.

Además se incluyeron dentro del estudio 15 líneas linfoblastoides AF: Grupo de Complementación A: HSC 72, VU 471, VU 275 y VU 007. Grupo de complementación B: HSC 230 y VU 178. Grupo de complementación C: HSC 536, VU 031, VU 001 y VU 158 y VU 166. Grupo de complementación D: HSC 62, PD 20 y VU 202. Grupo de Complementación E: VU 130.

## **2.- LINEAS LINFOBLASTOIDES.**

### **2.1 LLB EN PACIENTES CON AF.**

Se tomaron 20 ml de sangre periférica heparinizada, se colocaron con técnica estéril en tubos cónicos de 10 ml y se centrifugó por 30' a 600 rpm; se aspiró el plasma y el botón de linfocitos en la interfase y se diluyeron en el doble del volumen inicial con medio RPMI sin suplementar. Se colocaron 6ml en 4ml de gradiente discontinuo (Ficoll-Hypaque<sup>R</sup>). Se centrifugó 5' a 800 rpm, seguidos por 20' a 1600. Se aspiraron aproximadamente 3 ml en la zona de interfase que contenía la capa de linfocitos y se lavó dos veces con RPMI sin suplementar. El botón celular se diluyó en 1-2ml de solución con Virus Epstein Barr al 75% en RPMI al 15% más Ciclosporina A (0.1mg/ml), se colocó en una botella de vidrio que impide el intercambio gaseoso con el medio externo y se incubó durante 1 semana a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y para una mejor eficiencia de infección en medio ambiente bajo en oxígeno (5% CO<sub>2</sub> y 3% O<sub>2</sub>) que se inyectó directamente dentro de la botella. Se aspiró el sobrenadante y se cambió el medio de manera periódica cada vez que viraba a amarillo. Cuando las células asociaron para conformar cúmulos en suspensión, se colocaron en botella de cultivo para continuar con la propagación de la línea transformada. Cuando se obtuvo una densidad celular apropiada se produjeron 6 viales congelados para el banco de células.

### **2.2 LINEAS LINFOBLASTOIDES DE FAMILIARES.**

La muestra se procesó de manera muy similar a la metodología descrita anteriormente, dado que las células normales no requieren de un control tan estricto de la concentración de gases, se procesaron en botellas de plástico. Se congelaron 4 viales para el banco de células (50).

### ***2.3 MANTENIMIENTO DE LÍNEAS LINFOBLASTOIDES.***

Todas las líneas linfoblastoides se mantuvieron en botellas de cultivo, en condiciones estériles, con medio RPMI 1640, suplementado al 10% con suero fetal de ternera, el cual cuenta con un sistema que permite detectar disminución en el pH por cambios en la coloración del mismo que indicaba el momento en que las líneas requerían cambio de medio.

### ***2.4 VIABILIDAD CELULAR.***

Esta técnica se utilizó para determinar sobrevida y densidad celular. Se resuspendieron los cúmulos, se tomaron 10 ml de células, se mezclaron con 10ml de azul tripano al 0.4%, se tomaron 10 ml, se colocaron en la cámara de Neubauer y se observó en un microscopio de luz con el objetivo de 10x. El azul tripano no puede ser expulsado en las células muertas por lo que se ven azules mientras que las vivas se ven brillantes, se contaron las células vivas de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer y el total se multiplicó por 5000 para saber la densidad celular por mililitro. Para las pruebas de viabilidad probamos otro reactivo el 3-(4;5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) además de azul-tripano, ya que ambos actúan de una manera diferente, el primero marca las células muertas y el segundo (MTT) penetra en la célula viva al lisosoma. Encontramos que ambas mediciones son concordantes, y se decidió continuar usando azul tripano.

### ***2.5 CONGELACIÓN DE CÉLULAS.***

Las células se congelaron a una densidad de 1 a 2 millones de células por mililitro en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera y 10% de dimetilsulfóxido. Los cambios de temperatura se hicieron en forma gradual por 2 horas a -20°C, 24 hrs a -70°C y finalmente se almacenaron a -170°C en vapor de nitrógeno líquido.

- Descongelación de células.

El vial se colocó en baño María a 37°C con agitación continua hasta que se descongelara completamente, el contenido se vació en un frasco con medio suplementado con suero fetal de ternera al 10%.

### 3.- COMPLEMENTACION.

El análisis de complementación se realizó en 4 pacientes.

- Las líneas linfoblastoides de los pacientes y de los 5 grupos de complementación se cultivaron hasta obtener un total de  $20 \times 10^6$  células por mililitro.
- Para cada paciente se prepararon cultivos con  $5 \times 10^6$  células por mililitro y se mezclaron con la misma cantidad de células de las líneas linfoblastoides de los grupos de complementación A, B, C, D y E; se mantuvieron en cocultivación por 2 días y se realizó la fusión celular.
- Se colocaron los cultivos mixtos en tubos de centrifuga cónicos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular, se añadió 1 ml de polietilenglicol al 50% con medio RPMI, durante 1 minuto, se añadieron 4 ml de RPMI sin suplementar y 2 minutos después se añadieron otros 4 ml de medio, después de 10 minutos se centrifugó y se tiró el sobrenadante, el botón celular se colocó nuevamente en cultivo y se monitoreó en el microscopio la presencia de células fusionadas.
- Dos días después de la fusión se procedió a hacer la selección con MMC de los híbridos resistentes: Por cada fusión se elaboraron 3 cultivos de 5 ml con  $3 \times 10^5$  células por mililitro, a uno se le añadió 50 nM de MMC, otro 100 nM de MMC y se dejó un cultivo sin tratamiento.
- 4 días después se lavaron las células con RPMI sin suplementar en 2 ocasiones y se volvió a añadir mutágenos en las mismas concentraciones.
- 4 días después se resuspendieron las células y se realizó cuenta y viabilidad con el método de azul tripano. Se determinó resistencia en aquellas fusiones en la que se encontraron células vivas y fusionadas y se determinó sensibilidad en aquellos cultivos en que no proliferaron células fusionadas y que mostraron mayor mortalidad celular.

### 4.- RESPUESTA CELULAR A LA EXPOSICIÓN A MUTÁGENOS BIFUNCIONALES.

Se estudiaron, en total 24 líneas linfoblastoides:

15 pertenecientes a los 5 grupos de complementación.

Grupo de complementación A:

- HSC 72, VU 471, VU 275 y VU 007

Grupo de complementación B:

- HSC 230 y VU 178.

Grupo de complementación C:

- HSC 536, VU 031, VU 001, VU 158 Y VU 166

Grupo de complementación D:

- HSC 62, PD 20 y VU 202.

Grupo de complementación E:

- VU 130

8 LLB de pacientes del INP.

INP001-L, INP002-L, INP003-L, INP004-L, INP005-L, INP006-L, INP007-L, INP008-L

1 LLB normal.

NL-RES

#### **4.1 CITOGENETICA.**

##### **Siembra.**

Para cada LLB AF se sembraron 6 tubos con 300,000 cel /ml en 5ml medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal de bovino, glutamina 1%, piruvato de sodio 1%. Se incubaron a 37°C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 hrs. A 2 tubos se les adicionó 10ng/ml de MMC, a otros 2 se añadió 0.1mg/ml de DEB y los 2 restantes se dejaron sin tratamiento, durante 24 hrs; posteriormente, se lavaron con RPMI sin suplementar y se cosecharon 24 hrs después.

##### **Cosecha.**

Para obtener células en metafase se agregaron 40 µg/ml de colchicina y se incubaron durante 1 hr. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en KCl 0.075M y se incubó por 10 minutos a 37°C; antes de volver a centrifugar se realizó prefijación con solución Carnoy, se centrifugaron y el paquete celular se fijó con Carnoy frío; finalmente se realizaron otros 2 lavados con fijador. Se elaboraron laminillas de la manera habitual, se tñieron con Wright al 50% y Giemsa al 5% en buffer fosfatos pH 6.8 durante 2 minutos respectivamente y se analizaron las aberraciones cromosómicas de 50 metafases, en cada repetición. Todas las preparaciones fueron codificadas por una persona ajena al estudio para un análisis libre de sesgo. Se evaluó la cantidad de aberraciones cromosómicas agrupándolas en 5 categorías: fracturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos céntricos y acéntricos, anillos y dicéntricos, figuras radiales y otras.



#### **4.2 CURVAS DE SENSIBILIDAD A MMC Y DEB.**

Las células se mantuvieron en botellas de cultivo en condiciones estériles a 37°C en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5 %, con medio RPMI 1640 suplementado al 10 % con suero fetal de bovino, piruvato de sodio al 1 % y L-Glutamina al 1 %.

Se hicieron pruebas de viabilidad celular con azul tripano para determinar su densidad celular y se dejó que proliferaran hasta alcanzar una población de  $5 \times 10^6$  células, las cuales se diluyeron en 100 ml de medio RPMI 1640 suplementado, lo que resultó en una concentración final de 50,000 células/ml. Se colocaron 5 ml de esta suspensión en 18 botellas que se trataron de la siguiente manera:

- 2 sin tratamiento. Estas botellas se etiquetaron como cultivos "0"
- 16 se trataron con 8 concentraciones crecientes de MMC y DEB:

Las concentraciones que se utilizaron para MMC se prepararon de la siguiente forma:

Solución Stock : 600 mM. 2 mg de MMC (PM 334.33) en 10 ml de agua estéril.

Solución A : 150 mM. 2.5 ml de la solución stock + 7.5 ml de agua estéril

Solución B : 15 mM. 0.5 ml de solución A + 4.5 ml de medio RPMI.

Solución C : 5 mM. 3 ml de solución B + 6 ml de medio RPMI.

Solución D : 500 nM. 1 ml de solución C + 9 ml de medio RPMI.

Cultivo 1 : 1 nM MMC. 10 µl solución D

Cultivo 2 : 2 nM. 20 µl solución D.

Cultivo 3 : 3 nM. 30 µl solución D.

Cultivo 4 : 6 nM. 60 µl solución D

Cultivo 5 : 10 nM. 100 µl solución D.

Cultivo 6 : 30 nM. 30 µl solución C.

Cultivo 7 : 60 nM. 60 µl solución C.

Cultivo 8 : 100 nM. 100µl solución C.

Las concentraciones de DEB se prepararon con las siguientes diluciones:

Solución stock : 1 ml de DEB ( SIGMA ) en 20 ml de agua estéril.

Solución A : 100 µl de la solución stock en 10 ml de agua estéril.

Cultivo 1: 5 µl solución A ( 0.0005 mg/ml DEB ).

Cultivo 2: 10 µl solución A (0.001 mg/ml).

Cultivo 3: 15 µl solución A (0.0015 mg/ml).

Cultivo 4: 30 µl solución A (0.003 mg/ml).

Cultivo 5: 60 µl solución A (0.006 mg/ml).

Cultivo 6: 90 µl solución A (0.009 mg/ml).

Cultivo 7: 100 µl solución A (0.01 mg/ml).

Cultivo 8: 200 µl solución A (0.02 mg/ml).

Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %. Los cultivos "0" se monitorearon periódicamente hasta obtener tres duplicaciones de la población inicial (400,000 cel/ml) y se procedió a contar el resto de los cultivos.

El número total de células de cada cultivo fue convertido en términos porcentuales y con esta información se elaboraron curvas de sensibilidad graficando el crecimiento celular contra la concentración de los mutágenos y así, se determinó la concentración a la cual se inhibió el crecimiento celular en un 50 % ( IC50 ).

## **5.- DESCRIPCIÓN DEL FENOTIPO CLINICO.**

- Se obtuvieron las características clínicas de los expedientes y/o revisión clínica de los pacientes.
- Se determinó la edad de inicio de la pancitopenia en el momento en que el servicio de Hematología hizo el diagnóstico o con la primera biometría hemática que mostró disminución en las cuentas de plaquetas, células blancas o células rojas.
- Se clasificó la gravedad de la Anemia de acuerdo a Alter y cols (11) y se asignó la puntuación clínica de acuerdo a Auerbach y cols (9).

## RESULTADOS.

### 1.- CARACTERISTICAS DE LA POBLACIÓN.

#### 1.1 ANTECEDENTES FAMILIARES

Se captaron 12 familias con Anemia de Fanconi (AF) y se consideró como caso índice (tabla 4) al primer integrante de la familia en acudir a consulta; a quienes se codificó con la clave INP0 a la cual se le añadieron números consecutivos ascendentes. Se encontró consanguinidad (figura 2) en 2 de 12 familias AF y aunque, 3 de las familias provenientes del Distrito Federal tenían un apellido en común no fue posible demostrar la existencia de un antepasado común. Se realizaron estudios citogenéticos en 26 de 47 hermanos sospechosos o sanos en riesgo y se identificaron otros 13 con anemia de Fanconi, los 13 restantes fueron citogenéticamente normales, otros 13 rechazaron el estudio y 8 habían fallecido. El total de pacientes AF tomando en cuenta casos índices y hermanos fue de 25 (tabla 4).

En los padres (tabla 5) que son heterocigotos obligados para el gen AF no se encontraron antecedentes de cáncer, alteraciones hematológicas y diabetes (5).

En el grupo de hermanos no diagnosticados con anemia de Fanconi se registraron 8 fallecimientos; en la familia INP006 hubo 2 muertes por neoplasia en edades tempranas, en 2 familias (INP010 e INP012) se registraron niños muertos en el periodo neonatal por malformación intestinal y en otra (INP005) uno con anemia.

#### 1.2 CARACTERISTICAS CLINICAS:

Entre los afectados, la distribución con respecto al sexo fue de 1:1, como es lo esperado para un padecimiento de carácter autosómico recesivo. En todos ellos (n=25) se realizó evaluación clínica de acuerdo a la escala diseñada por Auerbach y cols. (Tabla 6), a los pacientes en los que no fue posible revisar personalmente, por defunción o por no poder trasladarse al Instituto, se incluyeron siempre que se tuviera un informe clínico completo realizado por un genetista. Las puntuaciones registradas variaron entre 0 y 7, ninguno de los pacientes obtuvo la máxima calificación de 8. En 6 de 7 familias con más de un hermano afectado, se encontró que las puntuaciones variaban de 1 a 2 puntos entre ellos (INP001, 2,3,4,7,8), excepto en la familia INP010 en que la diferencia fue mayor. En 5 de 12 familias (INP001, 4, 5, 9, 12) el cuadro clínico fue catalogado como "grave" por haber obtenido una

puntuación mayor a 4, en 2 familias (INP003 e INP010) se encontró que alguno de los pacientes calificaba como "leve" y otro como "grave". Las manifestaciones clínicas más frecuentes encontradas fueron las anomalías de la talla (21/25), las dismorfias (18/25) que incluyen fenotipo facial característico e hiperpigmentación cutánea y la trombocitopenia (21/25) que estuvo presente incluso en pacientes asintomáticos desde el punto de vista hematológico. Otras alteraciones menos frecuentes fueron la microftalmia (10/25), alteraciones del eje radial (6/25), malformaciones renales (5/25), retraso mental (4/25) y otras alteraciones esqueléticas como escoliosis (4/25).

### *1.3 CARACTERÍSTICAS HEMATOLOGICAS*

El diagnóstico en 23 de 25 pacientes se realizó al haber iniciado con la anemia aplásica y el promedio de edad al diagnóstico fue de 8.8 años. Se observó una mortalidad del 32% (8/25), el promedio de edad de la muerte fue de 12.1 ( $\pm$  4.7) años: 5 pacientes fallecieron por complicaciones hematológicas, 2 por leucemia y 1 durante la inmunosupresión previa al trasplante de médula ósea. Las defunciones (Tabla 7) se distribuyeron por igual en el grupo de pacientes con puntuaciones clínicas  $>4$  que en el de  $<4$  lo que se sugiere que no es posible predecir la probabilidad de muerte teniendo en cuenta la clasificación clínica obtenida por el paciente. Evaluar la gravedad de la anemia fue difícil ya que en ocasiones los pacientes ingresaban con anemia grave (estadio 1), pero después de una transfusión e iniciar el tratamiento con andrógenos regresaban hasta estadios 3 ó 4, para con el tiempo volver a estadio 1. Por esta razón sólo se registró la gravedad de la anemia en el estado actual y como puede observarse en la tabla 4 no hubo relación entre el puntaje clínico y el grado de la anemia. Un sólo paciente fue dependiente de transfusión en el momento del estudio (estadio 2), 11 pacientes tuvieron anemia leve o que se controla con la administración de andrógenos, 1 paciente presentó trombocitopenia sin anemia y 4 estaban asintomáticos (tabla 7). Tampoco fue posible determinar el tiempo que le toma a un paciente pasar de un estadio a otro por diversas razones: diagnóstico tardío, poco tiempo en seguimiento, pérdida del seguimiento, etc. Conocer el periodo de transición de una etapa a otra tal vez ayudaría a predecir la probabilidad de muerte.

### *1.4 CITOGENETICA EN LINFOCITOS.*

En 22/25 pacientes se obtuvieron las respuestas citogenéticas en linfocitos al momento del diagnóstico (tabla 8). El 100% de los pacientes mostró aberraciones espontáneas y en uno de los pacientes éste fue el único dato citogenético que confirmó el diagnóstico ya que en las dos ocasiones en que se tomó muestra y se adicionaron los mutágenos en las dosis convencionales para el diagnóstico no hubo

proliferación celular, por lo que se consideró que se trataba de un paciente muy sensible a mutágenos. En el resto de pacientes el diagnóstico citogenético se sustentó con la frecuencia aumentada de aberraciones en forma inducida por MMC (6 pacientes) o DEB (9 pacientes) o ambos (6 pacientes). No se encontró relación entre cantidad de aberraciones cromosómicas y gravedad del cuadro clínico o entre cantidad de aberraciones y estadio clínico de la anemia.

La cantidad de aberraciones en los hermanos sanos estudiados citogenéticamente no difirió de los controles normales.

En la tabla 9 se observa la respuesta de controles y pacientes que no fueron AF. Es evidente la opaca variabilidad en la respuesta obtenida con DEB comparada con la inducida por MMC.

## **2.- LINEAS LINFOBLASTOIDES DE PACIENTES Y FAMILIARES DE PRIMER GRADO.**

En todos los casos índice se intentó establecer una línea linfoblastoide (LLB) (Tabla 4), la transformación fue exitosa en 6 de 12 propósitos y en 2 de 13 hermanos. Con el fin de crear un banco de células que pueda ser utilizado posteriormente para estudios moleculares se establecieron líneas linfoblastoides de 30/50 padres y hermanos sanos; una vez establecida la línea linfoblastoide se produjeron respaldos de células para almacenar en nitrógeno líquido.

Posterior a la infección, las LLB de los pacientes se retaron con MMC para determinar si la línea continuaba siendo sensible a MMC mediante curvas de inhibición de crecimiento, ya que este es un requisito indispensable para poder continuar con los estudios de complementación. Una LLB es sensible a MMC cuando se obtiene un IC50 de 3-10 nM de MMC y resistente cuando el IC50 está en 60-100 nM MMC. Se encontraron 6 LLB que fueron sensibles: INP002-L, INP004-L, INP005-L, INP006-L, INP007-L (figura 3). Las líneas resistentes fueron la INP001-L que en la primera ocasión fue sensible a MMC pero cuando se volvió a retar con MMC y DEB se encontró que la LLB se había vuelto resistente en cultivo. Las líneas INP003-L1R e INP003-L2R (paciente MRH1-INP003) que se establecieron a partir de linfocitos obtenidos en tiempos diferentes, fueron resistentes. La línea INP004-LS fue sensible en uno de los cultivos pero resistente en otro, a la línea resistente se le denominó INP004-L1R (figura 3). Como resultado del proceso de infección viral algunas líneas mostraban rearreglos estructurales o numéricos en sus cromosomas.(tabla 10).

### 3.- ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN

Las familias INP007, INP008 e INP010 fueron asignados al grupo de complementación A, lo que representa un total de 11/12 pacientes asignados al grupo de complementación A. El paciente INP005 fue asignado al grupo C de complementación (tabla 11). En la familia INP003 no se logró obtener suficiente cantidad de células para realizar complementación por características proliferativas particulares de la línea celular.

### 4.- RESPUESTA CELULAR A LA ADICION DE MUTAGENOS EN LAS LINEAS LINFOBLASTOIDES DE LOS GRUPOS DE COMPLEMENTACION A, B, C, D Y E.

Inicialmente se proliferaron las líneas linfoblastoides de los diferentes grupos de complementación y se produjeron respaldos congelados, con el fin de poder realizar todo el panel de experimentos antes descritos. También se establecieron 3 LLB de personas normales para ser usadas como controles en los diferentes experimentos.

Se estudiaron líneas linfoblastoides pertenecientes a los 5 grupos de complementación mediante:

#### *4.1 ABERRACIONES CROMOSÓMICAS ESPONTÁNEAS E INDUCIDAS:*

En este paso fue necesario realizar una curva de toxicidad a mutágenos ya que en las líneas de dos de los grupos, especialmente B, no era posible obtener metafases analizables en las dosis de mutágenos previstos. Los índices mitóticos con curva de toxicidad se realizaron utilizando diferentes dosis de mutágenos y cuantificando la cantidad de metafases/2000 núcleos en preparaciones cromosómicas realizadas de manera convencional.. En la figura 4 se observa como los menores índices mitóticos, utilizando dosis de 10, 20, 30 y 40 ng/ml de MMC y 0, 0.05 y 1 µg/ml DEB, se obtuvieron en las líneas B y D mientras que A y C proliferaban adecuadamente con las dosis más altas de mutágenos, se eligieron 10 ng MMC y 0.05µg/ml de DEB para esta parte del estudio. También se realizó un ensayo piloto para medir cantidad de células y viabilidad en el que se estableció la cantidad de células óptima para el estudio.

En la figura 5 y tabla 12 se muestra la respuesta a MMC y DEB de un control normal (NL-RES), 4 líneas linfoblastoides del grupo de complementación A más 2 pacientes de la familia INP007, y un paciente de la familia INP008 y otro de la INP010, 2 del grupo B, 4 del grupo C y 1 paciente de las familia INP005, 3 del grupo D y 1 del grupo E; las líneas incluidas de los grupos B, D y E son las

pertenecientes a los únicos pacientes descritos hasta el momento dentro de estos grupos. Se compararon los promedios de aberraciones con MMC y DEB intragrupo (tabla 13), no se encontraron diferencias significativas entre las 6 LLB del grupo A (en las líneas de referencia), excepto la línea INP006-L que es diferente al resto de las líneas del grupo A, ni entre las dos líneas del grupo B; dentro del grupo C (5 líneas) la línea 001 mostró diferencias significativas con respecto a las otras líneas de su mismo grupo de complementación y dentro del grupo D la línea VU202 demostró también ser diferente de las otras dos líneas dentro de este grupo. Al comparar los promedio obtenidos intragrupo, los grupos A vs C y B vs D no demostraron ser significativamente diferentes entre sí, se encontraron diferencias al comparar A (sin tomar en cuenta INP006-L) con B y con D (excluyendo VU202) y C con B y con D (excluyendo VU202).

#### ***4.2 CURVAS DE SENSIBILIDAD A MMC Y DEB.***

Se exploró si existían diferencias (Tablas 10 y 13) en cuanto a la inhibición de la proliferación celular en los diferentes grupos de complementación, Los resultados se muestran en las figuras 6 y 7, no se detectaron diferencias significativas entre las líneas linfoblastoides sometidas a cantidades crecientes de MMC o DEB. Las curvas mostraron un comportamiento muy constante y se observó que las células alcanzan el 50% de inhibición del crecimiento (IC50) en concentraciones entre 2 y 10 nM de MMC y entre 1.5 y 7 nM de DEB. No existió relación entre IC50 y aberraciones cromosómicas.

### **5. CORRELACION FENOTIPO-GENOTIPO.**

#### ***5.1 CUADRO CLÍNICO***

11 pacientes (familias INP007, INP008 e INP010) (tabla 12) fueron asignados al grupo de complementación A. El cuadro clínico en éstas tres familias fue catalogado como leve, excepto un paciente, y la anemia fue leve (4 pacientes) o con respuesta a andrógenos (3 pacientes), aunque las únicas dos muertes en pacientes AF por leucemia se dieron en estas familias. El paciente (INP005) asignado al grupo de complementación C obtuvo un puntaje clínico catalogado como cuadro clínico grave, con anemia dependiente de transfusión (tabla 14).

#### ***5.2 FENOTIPO CELULAR***

**5.2.1 Aberraciones cromosómicas:** La cantidad de aberraciones cromosómicas (fig. 5) encontradas en el paciente del grupo C (Paciente INP005, línea INP005-L) fue similar a lo encontrado en la línea

VU001 mientras que las otras 3 líneas ya clasificadas que se estudiaron presentaban frecuencias más bajas. Los pacientes asignados al grupo de complementación A (INP007-L, INP008-L y INP004-L) presentaron una frecuencia de aberraciones cromosómicas similar al resto de las líneas ya clasificadas en este grupo de complementación, con excepción de un paciente (línea INP006-L, paciente INP008.H1) que además mostró también diferencias notorias con respecto a la línea celular de su hermano (paciente INP008, línea INP005-L).



## DISCUSION.

### *1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS:*

La anemia de Fanconi es un padecimiento raro, desconocemos su prevalencia en México, pero si tomamos en cuenta la frecuencia en caucásicos (1), deben existir alrededor de 250 pacientes en el país, por lo que esta muestra representa el 10% de los pacientes esperados en la población mexicana. El Instituto Nacional de Pediatría es el único centro en todo el país que ha desarrollado la metodología para diagnosticar AF de acuerdo a los lineamientos establecidos por el IFAR (registro internacional de anemia de Fanconi) por lo que muchos pacientes no se diagnostican por no sospechar el diagnóstico y por no contar con la prueba citogenética confirmatoria.

#### *1.1 Antecedentes familiares:*

Consanguinidad. AF es un padecimiento autosómico recesivo por lo que la consanguinidad incrementa la posibilidad de padecerla. Se espera un 1% de consanguinidad en la población general (53); nosotros detectamos consanguinidad en 2/12 (16%) familias, lo cual es parecido a lo reportado en un estudio hecho en Holanda en el que se encontró en 5/24 (20%) (54). Lo que contrasta con países de alta prevalencia de la enfermedad como Turquía en donde la consanguinidad en la población general es de 46% y 78% en la población AF(55).

Manifestaciones en heterocigotos. Algunos autores afirman que los heterocigotos no muestran ninguna de las características clínicas del padecimiento (56), sin embargo existen otros reportes que sugieren que existe una mayor incidencia de diabetes, cáncer y alteraciones hematológicas. En los 24 padres de este estudio y en los 48 estudiados por los holandeses no se encontraron estas alteraciones (54). Llama la atención la presencia de 8 defunciones en hermanos, de las cuales 2 fueron por neoplasia y 2 con malformaciones intestinales, no se cuenta con expediente clínico de éstos pacientes, pero por lo informado en la literatura es muy probable que hubieran estado afectados, aunque en ese momento no se sospechó el diagnóstico. Se ha reportado que de los pacientes AF que desarrollan leucemia, en el 24% este es su síntoma inicial (57). También se ha descrito que las malformaciones congénitas gastrointestinales en pacientes AF pueden ser confundidas con otras entidades como asociación VACTER (58) y Síndrome de Baller-Gerold (59). Actualmente la principal indicación para realizar estudio citogenético es la presencia de anemia aplásica asociada o no a malformaciones congénitas, sin embargo nosotros pensamos que dentro de las indicaciones también debe incluirse la combinación de ciertas malformaciones como alteraciones del eje radial y malformaciones intestinales o neoplasias

hematológicas de origen mieloide. Esto es relevante por que el diagnóstico temprano y el asesoramiento en cuanto a riesgos de recurrencia, podría evitar el nacimiento de otros afectados en la familia, ya que la principal causa de recurrencia es el desconocimiento del carácter hereditario del padecimiento.

*1.2 Características del cuadro clínico:* Al analizar las características clínicas de los pacientes estudiados queda muy clara la heterogeneidad clínica del padecimiento que ha sido objeto de múltiples reportes en la literatura mundial (1, 2, 8, 41). El uso de la escala clínica de Auerbach para evaluar las alteraciones somáticas de los pacientes AF define dos grupos de pacientes (7): los que tienen puntuaciones clínicas menores a 4, obtenidas por la presencia de dismorfias menores y talla baja, *sin malformaciones mayores*, y otro grupo, que además de los puntos obtenidos por características catalogadas como malformaciones menores tienen *malformaciones mayores* (alteraciones renales, esqueléticas y de sistema nervioso central). En el 72% de las familias con más de un afectado se encontró concordancia en las puntuaciones clínicas entre hermanos, a diferencia de lo reportado en la literatura acerca de la variabilidad intrafamiliar del cuadro clínico. Este hecho pudiera deberse al pequeño número de pacientes estudiados o por el uso de la escala clínica que analiza puntuación y no características clínicas individuales. De hecho como se observa en la tabla 5 para algunas características como la baja talla hubo concordancia y para otras como las alteraciones del eje radial no hubo concordancia en 3 de las 7 familias con más de un afectado. Nuestro estudio incluyó una familia con 7 afectados, 2 que fallecieron por leucemia, 4 con puntuaciones clínicas entre 0 - 2 y 1 con 5, lo que hace pensar que la concordancia clínica esta principalmente determinada por factores genéticos, pero que también pueden existir otros factores que modifican el fenotipo. Entre estos puede destacar la predisposición, con mecanismos parecidos a lo que ocurre en los padecimientos multifactoriales, en los que, lo que se hereda es la susceptibilidad de mostrar una característica determinada. Este evento explicaría la existencia de algunas manifestaciones raras en padecimientos mendelianos en donde el cuadro clásico se hereda completo y las características raras como predisposición, de manera que si no se traspasa el umbral de susceptibilidad no se manifiesta el rasgo (50).

*1.3 Características hematológicas:* 9/12 afectados tenían anemia al momento del diagnóstico, el resto eran asintomáticos y fueron identificados mediante el estudio citogenético realizado a hermanos de los propositi, uno de ellos mostró leve trombocitopenia en la biometría hemática. Las complicaciones hematológicas fue la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes. Encontramos que no es posible predecir la gravedad de la anemia tomando en cuenta la

puntuación clínica obtenida por el paciente, y tampoco existió concordancia intrafamiliar para la evolución de la anemia, ni con el grupo de complementación por lo que es posible que este rasgo esté determinado no sólo por los productos de los genes AF sino también por la presencia de otros genes modificadores del fenotipo y por eventos epigenéticos. Se piensa que la falla hematológica en AF es secundaria a desregulación de los mecanismos que llevan a la célula tronco a apoptosis, proceso en el que participan los productos de al menos otros 3 polipeptidos: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , y Fas; la apoptosis celular es un evento que está altamente regulado no solo genéticamente sino por situaciones que provocan estrés intracelular y cambios ambientales que pudieran desencadenar la muerte celular programada (45). La respuesta al estrés oxidativo es también un evento que pudiera contribuir al desarrollo de anemia y a las diferencias en cuanto a progresión de la misma, esto se ha demostrado en ensayos clínicos terapéuticos con antioxidantes en los que algunos pacientes responden mejorando sus cuentas hematológicas mientras que otros no lo hacen, lo cual hace sospechar que la respuesta de cada sujeto depende de la capacidad individual de defenderse del daño oxidativo, debida a diferencias en la actividad de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos ( 50 ).

#### *1.4 Citogenética en linfocitos.*

De acuerdo con lo reportado en la literatura (9, 16), el DEB permitió confirmar el diagnóstico con mayor facilidad ya que afecta en menor grado la capacidad proliferativa de la célula AF dado que en todos los cultivos que se trataron con este mutágeno fue posible obtener material analizable; además a diferencia de la MMC, que puede inducir frecuencias de aberraciones elevadas en los controles (tabla 7a), el DEB produce niveles bajos y poco variables de daño cromosómico en los controles lo que permite discernir perfectamente el diagnóstico.

La variabilidad en la respuesta citogenética entre hermanos y la falta de concordancia con el cuadro clínico ha sido previamente reportado en AF (2,9), y algunos autores han demostrado que la respuesta de un mismo paciente puede cambiar en el tiempo. Por otra parte en algunos pacientes la respuesta de los linfocitos a mutágenos indica la presencia de dos poblaciones celulares, una de ellas resistente a mutágenos (19).

Se desconoce cuales son las bases fisiopatológicas de tal variabilidad, pero estas observaciones hacen pensar que la anemia, las malformaciones congénitas y las aberraciones cromosómicas pudieran deberse a acciones pleiotrópicas del mismo gen que se modifican de acuerdo a la carga genética del individuo o bien por factores ambientales desconocidos.

## **2.- LINEAS LINFOBLASTOIDES**

El establecimiento de líneas linfoblastoides en pacientes con enfermedades genéticas es sumamente útil, ya que proporciona una fuente ilimitada de células que puede utilizarse para análisis de ligamiento, clonación de genes, diagnóstico molecular, estudio de las posibles funciones proteicas y terapia génica, aún cuando el paciente ya haya fallecido. En AF han sido ampliamente utilizadas para estudios de complementación. Mundialmente existen dos bancos de LLB AF, que almacenan células de pacientes de Estados Unidos y Canadá, y Europa, respectivamente. La experiencia de estos y otros grupos es que el establecimiento de líneas linfoblastoides AF es particularmente difícil (61), por características como las anomalías en el ciclo celular, sensibilidad al oxígeno ambiental y a la infección con virus. En este estudio, la infección fue exitosa en 100% de los familiares sanos y en 32% de los pacientes anémicos; esta tasa de éxito tan baja es atribuible a la sensibilidad al oxígeno de las células que idealmente debieran ser cultivadas en condiciones de hipoxia y se carecía de las condiciones necesarias para hacerlo.

En la literatura se ha reportado que un 20% de las líneas linfoblastoides AF son resistentes a mutágenos. Nosotros encontramos resistencia en 3/11 LLB, y pensamos que la explicación a este evento es el mosaicismo somático, es decir la existencia, en un mismo individuo, de dos poblaciones celulares una con fenotipo y genotipo AF y la otra que por alguna razón ha perdido el genotipo y por consiguiente el fenotipo, o bien mantiene el genotipo AF pero ha sufrido un cambio en algún otro gen que le cambia el fenotipo. Independientemente de cual sea la causa de la resistencia, este fenómeno impide que se realice la complementación (19,27,52). y es un fenómeno que puede estar contribuyendo a la variabilidad clínica y citogenética del padecimiento. La existencia de células resistentes de mutágenos tiene implicaciones terapéuticas en aquellos pacientes que desarrollan neoplasias y en los que reciben terapia inmunosupresora, ya que se han diseñado esquemas atenuados en estos pacientes que no sería exitosos contra células AF que han revertido su fenotipo.

## **3.- COMPLEMENTACION EN ANEMIA DE FANCONI.**

En el presente trabajo se estudiaron 25 pacientes con AF confirmada de los cuales 13 fueron asignados al grupo de complementación A y 1 al grupo C. El análisis de complementación es un medio poderoso para descubrir la totalidad de genes involucrados en AF, hasta la fecha ocho (34), y permite estimar la prevalencia de los diferentes subtipos en distintas poblaciones aún antes de que los genes correspondientes hayan sido encontrados. En los pacientes de este estudio la complementación se realizó mediante selección con MMC de híbridos resistentes (24), que difiere de las estrategias

tradicionalmente usadas en donde primero se selecciona el híbrido heterocarionte utilizando líneas a las que se les han introducido 2 mutaciones una que le confiere sensibilidad a HAT y otra de resistencia a antibióticos y posteriormente se prueba la sensibilidad o resistencia a los mutágenos. Este último método aunque muy específico requiere de mayor tiempo (6-8 semanas vs. 1-2 semanas) y del uso de agentes que elevan el costo del estudio (24,26). Nuestros resultados analizados en conjunto con los del resto del mundo indican que el grupo de complementación A es el de mayor prevalencia, seguido por el grupo C. No encontramos pacientes de nuevos grupos de complementación o de los grupos B, D y E que sólo se han encontrado en pacientes europeos. Recientemente con el descubrimiento de los genes de los grupos de complementación A y C, existe la alternativa de utilizar estrategias de biología molecular para buscar directamente mutaciones en estos genes, sin restar utilidad a los estudios de complementación para la búsqueda de nuevos genes (25) y para asignar pacientes a los grupos en los que los genes no hayan sido clonados. Una limitante de los estudios de complementación independientemente de la estrategia que se utilice es la existencia de LLB resistentes. En los pacientes en los que no fue posible hacer la asignación por no tener una LLB o por tener una LLB resistente, aún se tienen células de los padres que pueden ser utilizadas para diagnosticar grupo A ó C con búsqueda específica de mutaciones en el gen.

#### ***4.- CORRELACION FENOTIPO GENOTIPO.***

Al igual que un estudio hecho en 18 pacientes italianos asignados al grupo de complementación A, la mayoría de nuestros pacientes de este mismo grupo mostraron un fenotipo clínico leve, por lo que pudiera ser que el grupo de complementación A esté asociado a un cuadro leve en cuanto a manifestaciones clínicas, pero no en relación a menor gravedad de la anemia, la cual también mostró variabilidad en los pacientes italianos (9). En el grupo de complementación C se ha descrito que el cuadro clínico es variable dentro del mismo grupo y que la gravedad esta relacionada, al menos en parte con mutaciones específicas en el gen FAC; el único paciente de este estudio que fue asignado a este grupo mostró un cuadro grave por lo que se podría predecir alguna mutación en los exones 4, 6 ó 14 que están asociadas a fenotipos graves mientras que los cuadros leves están asociados a mutaciones en el exón 1 (40). Otro fenómeno que pudiera explicar la variabilidad fenotípica se relaciona con el hallazgo de líneas linfoblastoides resistentes a MMC, ya que se ha propuesto que la resistencia está probablemente causada por mosaicismos somáticos "in vivo", lo cual ha sido demostrado en un paciente heterocigoto compuesto para mutaciones en FACC. En él, se demostró un evento de conversión génica por recombinación intragénica y la reversión genética

podría explicar la existencia de fenotipos atenuados por la posibilidad de hematopoyesis clonal y también explicaría la variabilidad intrafamiliar (52).

Dado que el defecto básico en anemia de Fanconi todavía es desconocido, paralelo a las estrategias moleculares encaminadas a descubrir y caracterizar la función de los genes ya clonados, otras investigaciones estudian aspectos del fenotipo celular que ayuden a comprender los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. En nuestro laboratorio se han realizado diversos estudios encaminados a describir el fenotipo celular de anemia de Fanconi, en cultivos de linfocitos. Los experimentos, han sido reproducibles en células del mismo paciente o en un grupo de ellos, pero cuando se incluyen varios pacientes se han presentado dificultades en la reproducibilidad de los resultados (42-44) lo cual es común a todos los grupos que estudian AF (53). Una explicación parcial es la existencia de heterogeneidad genética, por lo que en este trabajo se estudió la respuesta celular a mutágenos en 19 líneas linfoblastoides de los 5 grupos de complementación, mediante curvas de inhibición del crecimiento y aberraciones cromosómicas. Los resultados obtenidos con las curvas de inhibición del crecimiento demuestran que, independientemente del grupo de complementación al que pertenezcan, las líneas celulares muestran un comportamiento más o menos similar. En este estudio se exploró la capacidad de la célula AF para detener su ciclo celular cuando se expone a mutágenos sin retirarlos del medio lo que le impide continuar la progresión del ciclo celular a mitosis. En estudios previos realizados en linfocitos de pacientes sin clasificar se ha demostrado que el arresto ocurre en la fase G2 del ciclo celular (46,47) y nuestros resultados apoyan que esta característica es el punto de convergencia fenotípica en anemia de Fanconi y que la variabilidad observada se da por diferencias en la salida del arresto en G2 o en fases posteriores pero previas a la entrada a mitosis. Uno de estos mecanismos pudiera ser la capacidad de inducir apoptosis en la transición G2/M, ya que al menos en el grupo de complementación C existen reportes de exceso en la inducción de muerte celular programada en células dañadas con MMC (48). Los resultados obtenidos mediante el estudio de aberraciones cromosómicas; que analiza las células que fueron capaces de entrar a mitosis y su tolerancia al daño, confirman que existen diferencias intergrupo, y que estas pueden también ser atribuidas a diferencias, en la salida de G2 y entrada a M. Para explicar el significado real de estas observaciones se requiere estudiar el ciclo celular con y sin agentes clastogénicos.

Nuestro estudio mostró que la heterogeneidad génica no explica completamente la variabilidad en el fenotipo clínico y citogenético en anemia de Fanconi. Existen varias explicaciones alternativas para la variabilidad en el fenotipo celular, como la heterogeneidad alélica, eventos epigenéticos, epistáticos y la existencia de genes modificadores del fenotipo ya mencionados anteriormente. Es difícil

dimensionar la importancia de la heterogeneidad alélica en la variabilidad citogenética ya que desconocemos cuales mutaciones porta cada línea celular. Sin embargo un ejemplo de variabilidad citogenética que podría ser explicado por heterogeneidad alélica se observa en el grupo de complementación D, en donde hay dos líneas PD20 y HSC62 que son muy sensibles a mutágenos, mientras que VU202 tiene sensibilidad significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a las otras dos líneas. Tenemos evidencia dentro de las LLB del grupo A de un evento epigenético contribuyendo en diferencias en el fenotipo celular en las LLB INP006-L e INP007-L, pertenecientes a dos hermanos asignados al grupo de complementación A y por lo tanto con la misma mutación en el gen, se observó sensibilidad muy distinta. Una de las explicaciones a este fenómeno es la ganancia cromosómica ya que la línea con mayor sensibilidad tuvo un número modal de 51 y la otra 46 (tabla 5), la simple ganancia cromosómica implica una mayor posibilidad de aberraciones, sin embargo la ganancia de algunos cromosomas relacionados con AF también podría acentuar el fenotipo.

Como ya se ha evidenciado no hay un sólo factor determinante de la variabilidad clínica y citogenética de AF y se han mencionado heterogeneidad génica, alélica, genes modificadores y eventos epigenéticos, como la resistencia mutágenos y la ganancia cromosómica. Otros mecanismos han sido postulados como causantes de variabilidad fenotípica en otras enfermedades y que puede aplicarse a AF. Uno de ellos es la epistasis que postula la existencia de interacciones entre los productos de dos genes donde la actividad de uno predomina sobre la del otro, una mutación puede ocasionar que se inviertan los papeles con diferentes consecuencias fenotípicas; ya se sabe que en AF son varios los genes involucrados, pero dado que su función desconoce no es posible establecer de que manera interactúan (50,52). Otro mecanismo se asocia a factores estocásticos causantes de modificación en las actividades de los productos génicos (50).

Se requieren estudios posteriores que incluyan desde las secuencias génicas y la función proteica hasta sus interacciones funcionales con otros polipéptidos y su modificación en respuesta a cambios ambientales, para terminar de describir las causas de heterogeneidad fenotípica en anemia de Fanconi.

**APÉNDICE 1.****CRITERIOS DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS Y CITOGENÉTICOS EN AF.**

Alteraciones hematológicas.

- Pancitopenia.

Malformaciones congénitas.

Patrón retardado de crecimiento.

Anormalidades en pigmentación de la piel.

- Hiperpigmentación generalizada.

- Manchas café con leche.

Anormalidades de eje radial.

- Ausencia o hipoplasia de radio.

- Ausencia o hipoplasia de pulgar.

Microcefalia.

Malformaciones renales y/o de tracto urinario.

Anormalidades genitales.

- Hipogonadismo.

Malformación auricular/ sordera.

Anormalidades Oculares. Microftalmia.

Problemas de aprendizaje.

Criterios citogenéticos:

- Aberraciones espontáneas: mayores a 10%.

- Aberraciones inducidas por MMC y/o DEB: Mínimo 5 veces la respuesta de un control normal procesado simultáneamente, debe presentar aberraciones cromosómicas complejas como figuras radiales, dicéntricas, y translocaciones.



**APENDICE 2.****HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.****FICHA DE IDENTIFICACIÓN.**

Nombre del paciente:

Número de registro:

Edad:

Sexo:

**DATOS CLÍNICOS.**

Antecedentes Familiares:

Talla:

Exploración física:

- Cráneo
- Cara.
- Ojos.
- Gastrointestinal.
- Cardiovascular.
- Genital.
- Esqueléticas.
- Dérmicas.
- Retraso mental.

Alteraciones hematológicas:

- Edad de inicio:
- Tratamiento.
- Transfusiones.

Citogenética:

■ Aberraciones cromosómicas espontáneas

■ Aberraciones cromosómicas inducidas

1. MMC
2. DEB

**TABLA 1. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA SEVERIDAD DE LA ANEMIA.** (Alter et al; 2 y 11)

GRADO	TRANSFUSIONES	RX. ANDROGENOS	A ANEMIA
1	SI	NUNCA	SEVERA (<6mg/dl)
2	SI	ACTUALMENTE NO	SEVERA
3	NO	SI	SEVERA
4	NO	SI	MODERADA(6-10mg/dl)
5	NO	NO	LEVE
6	NO	NO	NO

**TABLA 2.- FRECUENCIAS DE DISTRIBUCIÓN POR GRUPO DE COMPLEMENTACIÓN EN DIFERENTES PAÍSES PARTICIPANTES EN EL REGISTRO EUROPEO DE AF (EUFAR).**

PAIS	FAMILIAS	A	B	C	D	E	MMC-R
Alemania	31	16	1	1	1	10	2
Italia	12	10					2
Turquía	15	6					2
Holanda	14	2		5		2	5
Francia	10	3		1			3
Reino Unido	4	3				1	3
Suiza	3	1					3
Irlanda	3	2				1	
Egipto	2	2					1
España	2	2					1
Grecia	2					1	
Polonia	2	2					
Hungría	1	1					
Rusia	1	1					
Sudáfrica	3	3					
Argentina	1					1	
Estados Unidos	10	2					8
<b>TOTAL</b>	<b>111</b>	<b>56</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>16*</b>	<b>30</b>

\* El grupo E podría ser heterogéneo ya que no se han realizado fusiones entre los integrantes de este grupo.

(Hans Joenje, Comunicación personal)

**TABLA 3.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y CELULARES DESCRITAS EN PACIENTES DE LOS GRUPOS DE COMPLEMENTACION A, B, C, D Y E.**

	<i>AF-A</i>	<i>AF-B</i>	<i>AF-C</i>	<i>AF-D</i>	<i>AF-E</i>
FRECUENCIA	66%	4%	13%	4%	13%
<b>MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b>					
Peso bajo al nacer	+	-	+	-	+
Retraso en crecimiento	+	+	?	?	+
Alt. Esquelética.	+	-	+	?	+
Microcefalia					
Microftalmia	+	-	+	?	+
Microstomia					
Pigmentación cutánea	+	+	+	+	-
Malformación renal	+	-	+	?	+
Inicio de la anemia	7a	24a	3a	?	2a
<b>FENOTIPO CELULAR</b>					
Respuesta a MMC*	5	1	4	2	3
Respuesta a DEB	+	+	+	+	+
Recuperación de la síntesis de DNA después de MOP-UVA.	-	+	?	?	?
Defecto genético	16q	?	9p	3p	?

\* Número de veces en que se magnifica la respuesta de un normal. Datos aproximados tomados de la respuesta mínima reportada.

**TABLA 4.- EVALUACIONES HECHAS A LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.**

<i>PACIENTES</i>	<i>ESTUDIO CLINICO</i>	<i>ESTUDIO CITOGENETICO</i>	<i>LINEA LINFOBLASTOIDE</i>	<i>COMPLEMENTACION</i>
INP001	X	X	INP001-L	
H1	X			
INP002	X	X		
H1	X	X		
H2	X	X		
INP003	X	X	INP003	
H1	X	X	INP003-L	
INP004	X	X		
H1	X	X		
INP005	X	X	INP005-L	X
INP006	X	X		
INP007	X	X	INP004-L	X
H1	X	X	X	X
INP008	X	X	INP006-L	X
H1	X	X	INP007-L	X*
INP009	X	X		
INP010	X	X	INP002-L	X
H1	X			X*
H2	X			X*
H3	X	X		X*
H4	X	X		X*
H5	X	X		X*
H6	X	X		X*
INP011	X	X		
INP012	X	X		
<b>TOTAL</b>	<b>25/25</b>	<b>22/25</b>	<b>8/25</b>	<b>14/25</b>

\* Asignados por estudios de complementación en 1 hermano.

TABLA 5.- ANTECEDENTES FAMILIARES.

FAMILIA	PADRES SANOS	HERMANOS AF	SANOS (CLINICA)	SANOS (CITOG)	DEFUNCION
INP001	2	1	3		
INP002	2	2			
INP003	2	1		1	
INP004	2	1	1		
INP005	2		4		3
INP006	2			2	2
INP007	2	1		3	
INP008	2	1	1		
INP009	2			1	
INP010	2*	6		5	1
INP011	2*			1	
INP012	2		4		2
TOTAL	24	13/47	13/47	13/47	8/47

\* Consanguinidad

**TABLA 6.- MANIFESTACIONES CLINICAS.** Calificación clínica de acuerdo al puntaje clínico modificado de Auerbach. (0= ausente 1= presente)

<i>PACIENTES</i>	<i>ESQ</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>TOTAL</i>
INP001		1	1	1	1	1	0	0	1	6
	H1	1	1	1	1	1	0	0	0	5
INP002		0	0	0	0	1	0	0	0	1
	H1	0	1	0	0	1	0	0	0	2
	H2	0	0	0	0	1	0	0	0	1
INP003		1	1	0	1	1	1	0	0	5
	H1	1	1	0	0	1	0	0	0	3
INP004		1	1	1	1	1	0	1	0	6
R	H1	1	1	0	1	1	1	1	0	6
INP005		1	1	1	1	1	0	0	0	5
INP006		1	1	0	0	1	1	0	0	4
INP007		1	0	0	0	1	0	0	0	2
	H1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INP008		1	1	0	0	1	0	0	0	3
	H1	1	1	0	0	1	0	0	1	4
INP009		1	1	1	0	1	1	1	1	7
INP010		1	1	0	0	0	0	0	1	3
	H1	1	1	0	1	1	0	0	1	5
	H2	1	1	0	1	1	0	0	0	4
	H3	1	1	0	0	1	0	0	0	3
	H4	1	0	0	0	1	0	0	0	2
	H5	1	0	0	1	0	0	0	0	2
	H6	1	1	0	0	0	0	0	0	2
INP011		1	0	0	0	1	0	0	0	2
INP012		1	1	1	1	1	0	1	1	7
<b>TOTAL</b>		21/25	18/25	5/25	10/25	21/25	4/25	4/25	6/25	

H1/H2 = hermanos afectados del caso índice. A= TALLA BAJA B= FACIES CARACTERÍSTICA  
 C=MALFORMACION RENAL D=MICROFTALMIA E=TROMBOCITOPENIA F=RETRASO  
 PSICOMOTOR G= OTRAS ALTERACIONES ESQUELETICAS H=ANORMALIDAD DEL EJE  
 RADIAL

TABLA 7.- ESTADO ACTUAL DE LA ANEMIA Y RELACION CON PUNTAJE CLINICO.

PACIENTES	PUNTAJE CLINICO	GRADO ANEMIA	CAUSA DE LA MUERTE	EDAD DX	SOBREVIDA
INP009	7	DEFUNCION	Transplante de médula ósea	3 años	5 años
INP012	7	3		30 años	30 años
INP001	6	DEFUNCION	Anemia	6 años	9 años
INP004	6	4		10 años	22 años
R INP004.H1	6	DEFUNCION	Anemia	7 años	14 años
INP001.H1	5	DEFUNCION	Anemia	8 años	21 años
INP003	5	4		9 años	18 años
INP005	5	2		10 años	13 años
INP010.H1	5	3		16 años	16 años
INP006	4	4		10 años	19 años
INP008.H1	4	4		5 años	6 años
INP010.H2	4	3		15 años	15 años
INP003.H1	3	5		12 años	13 años
INP008	3	4		9 años	10 años
INP010	3	6		4 años	4 años
INP010.H3	3	DEFUNCION	Leucemia	13 años	13 años
INP002.H1	2	DEFUNCION	Hemorragia SNC	7 años	12 años
INP007	2	4		5 años	7 años
INP010.H4	2	DEFUNCION	Leucemia	12 años	12 años
INP010.H5	2	5		8 años	8 años
INP010.H6	2	6		2 años	2 años
INP011	2	4		10 años	17 años
INP002.H2	1	3		6 años	9 años
INP002	1	DEFUNCION	Hemorragia	1 años	12 años
INP007.H1	0	6		2 años	4 años
TOTAL				(N=25) x= 8.8(5.8)	

() Desviación estándar



**TABLA 8.- ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN LINFOCITOS DE PACIENTES AF AL MOMENTO DEL DX.**

<i>PACIENTES</i>	<i>ESPONTANEAS</i>	<i>MITOMICINA</i>	<i>DEB</i>
INP001	0.52	*	*
INP002.	0.36	7.05	--
INP002.H1	0.40	10.13	--
INP002.H2	0.24	4.43	--
INP003	0.28	*	1.48
INP003.H1	0.28	*	5.40
INP004	0.36	3.12	--
R INP004.H1	0.24	4.20	--
INP005	0.36	*	2.88
INP006	0.36	5.52	--
INP007	0.20	11.88	0.52
INP007.H1	0.12	9.37	1.64
INP008	0.28	*	1.20
INP008.H1	0.28	*	3.98
INP009	0.34	15.02	5.76
INP010	0.12	*	12
INP010.H1	0.24	3	3
INP010.H2	0.20	*	3.84
INP010.H3	0.36	8.3	3.63
INP010.H4	0.12	*	0.92
INP011.	0.28	*	3.92
INP012	0.36	3.91	0.96
	n= 22	n= 12	n=15
<b>TOTAL</b>	<b>x= 0.28 (0.09)</b>	<b>x= 7.16 (3.8)</b>	<b>x=3.4 (2.88)</b>

H1 Hermanos del propósito

Los resultados están expresados en número de aberraciones por célula

\* No proliferó en cultivo.

-- No se realizó.

() Desviación estándar

**TABLA 9.- ABERRACIONES ESPONTANEAS E INDUCIDAS CON MMC Y DEB, EN CONTROLES Y PACIENTES ANEMICOS NO-AF**

	<i>ABERRACIONES ESPONTANEAS</i>	<i>INDUCIDAS CON MMC</i>	<i>INDUCIDAS CON DEB</i>
CONTROL 1	0.04	1.28	0.04
CONTROL 2	0.04	0.12	0.08
CONTROL 3	0.04	0.04	0.0
CONTROL 4	0.0	0.04	0.0
CONTROL 5	0.0	1.44	0.0
PACIENTE 1	0-12	1.24	0.04
PACIENTE 2	0.36	2.05	0.32
PACIENTE 3	0.0	1.25	0.08
<b>TOTAL</b>	<b>0.75 (0.12)</b>	<b>0.93 (0.76)</b>	<b>0.07 (0.1)</b>

() Desviación estándar

**TABLA 10.- NÚMERO MODAL DE CROMOSOMAS, FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS ESPONTÁNEAS E INDUCIDAS, E IC50 EN CADA LÍNEA LINFOBLASTOIDE.**

LLB	No. MODAL	ABERRACIONES CROMOSOMICAS*			IC 50	
		espontáneo	MMC	DEB	MMC	DEB
NL-RES	46	0.02 (0.02)	0.11 (0.03)	0.16 (0.08)	55.5	22
HSC 72 (A)	48	0.24 (0.01)	4.72 (0.04)	3.65 (0.01)	2.85	2.8
VU 471 (A)	46	0.11 (0.01)	1.54 (0.22)	2.00 (0.43)	7.5	3.55
VU 275 (A)	46	0.07 (0.01)	2.11 (0.19)	1.50 (0.36)	2.88	3.55
VU 007 (A)	46	0.12 (0.06)	1.74 (0.04)	2.32 (0.42)	1.46	1.76
INP005 (A)	46	0.26 (0.06)	1.98 (0.16)	2.24 (0.24)	0.85	1.9
INP006 (A)	51	3.0 (0.10)	8.78 (1.12)	5.56 (0.98)	3.38	1.68
INP007 (A)	46	0.45 (0.13)	2.25 (0.09)	1.69 (0.25)	3	1.58
INP008 (A)	46	0.08 (0.04)	2.62 (0.24)	2.63 (0.11)	2.75	5.17
HSC230 (B)	46	0.22 (0.06)	7.14 (0.26)	4.47 (0.17)	6.25	2.19
VU178 (B)	46	0.70 (0.16)	5.99 (0.13)	4.22 (1.10)	1.85	1.95
HSC536 (C)	47	0.14 (0.02)	0.14 (0.02)	1.77 (0.23)	1.65	0.96
VU031 (C)	46	0.16	0.84 (0.04)	0.90 (0.02)	1.96	4.4
VU166 (C)	46	0.11 (0.05)	0.39 (0.07)	0.39 (0.07)	1.2	5.5
VU001 (C)	46	0.21 (0.05)	3.83 (0.61)	2.17 (0.16)	2.2	4.2
INP005 (C)	46	0.84 (0.04)	2.48 (1.45)	4.02 (0.08)	2.8	5.3
HSC62 (D)	46	0.60 (0.28)	5.73 (0.67)	4.12 (0.18)	6.07	10.4
PD20 (D)	46	0.13 (0.01)	7.79 (0.03)	7.07 (0.61)	4.18	5.3
VU202 (D)	46	0.21 (0.41)	1.27 (0.35)	2.41 (0.91)	2.3	3.12
VU130 (E)	46	0.38 (0.09)	2.54 (0.34)	1.85 (0.27)	7.9	4.25

\* Promedio de la frecuencia de aberraciones por célula  
 () desviación estándar

**TABLA 11.- CUENTAS CELULARES EN CULTIVOS DE CÉLULAS HÍBRIDAS SOMETIDOS A MMC**

<i>PACIENTES</i>	<i>LLB (A)</i>	<i>LLB(B)</i>	<i>LLB(C)</i>	<i>LLB(D)</i>	<i>LLB(E)</i>	<i>ASIGNADO AL GRUPO</i>
INP005-L	75,000/ml	35,000/ml	0/campo	55,000/ml	90,000/ml	C
INP004-L	0/campo	40,000/ml	80,000/ml	110,000/ml	80,000/ml	A
INP007-L	2/campo	50,000/ml	85,000/ml	50,000/ml	95,000/ml	A
INP008-L	1/campo	40,000/ml	90,000/ml	55,000/ml	60,000/ml	A

\* Datos obtenidos por el método de viabilidad con azul tripano

**TABLA 12.- PROMEDIO DE LAS FRECUENCIAS ABERRACIONES ESPONTANEAS E INDUCIDAS CON MMC Y DEB EN LLB DE LOS GRUPOS A,B,C,D y E .**

<i>GRUPO DE COMPLEMENTACION</i>	<i>*DAÑO ESPONTANEO</i>	<i>*DAÑO CON MMC</i>	<i>*DAÑO CON DEB</i>
A (n=4)	0.13 (0.08)	2.52 (1.29)	236.75 (0.88)
B (n=2) <sup>++</sup>	0.46 (0.26)	6.56 (0.61)	4.35 (0.74)
C (n=4)	0.14 (0.03)	1.58 (1.37)	1.37 (0.66)
D (n=3)	0.31 (0.26)	4.93 (2.75)	4.53 (2.02)
E (n=1)	0.33 (0.09)	2.54 (0.34)	1.85 (0.27)
TOTAL**	0.23 (0.20)	3.35 (2.41)	2.79 (1.73)

\*\* Homogeneidad de varianzas(j<sub>i</sub>) ++ p<0.05

\* Aberraciones por célula.

( ) DS

**TABLA 13.- PROMEDIO DE IC50 EN LLB DE LOS GRUPOS DE COMPLEMENTACION A, B, C, D y E.**

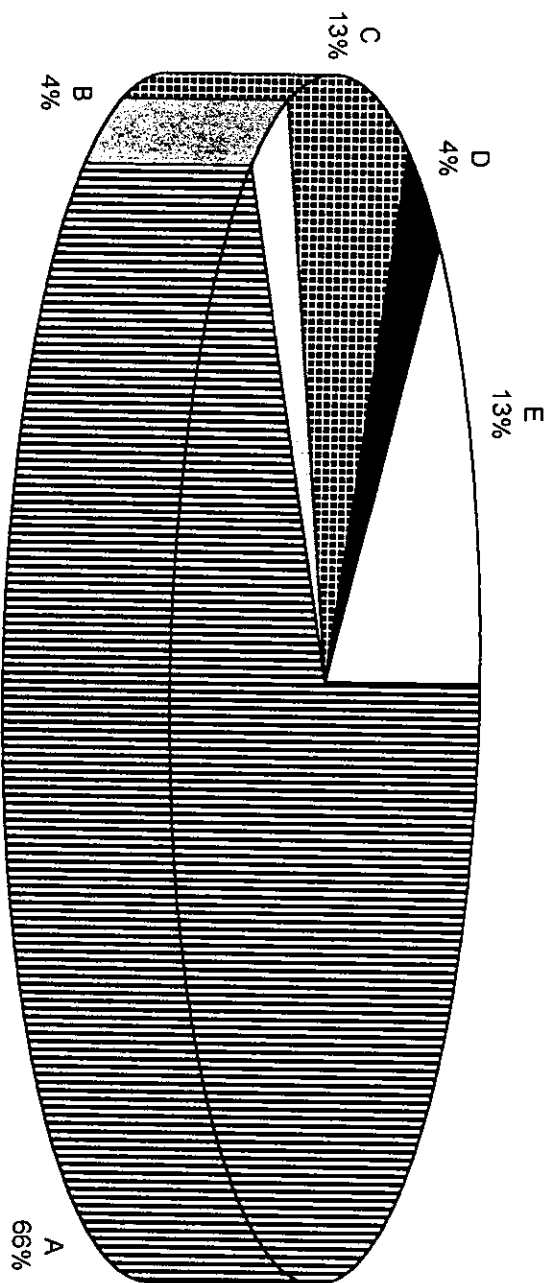
<i>LÍNEAS LINFOBLASTOIDES</i>	<i>MITOMICINA C</i>	<i>DIEPOXIBUTANO</i>
GRUPO A	3.09 nM(1.9)	0.002 (0.0008)
GRUPO B	4.123 (2.40)	0-0132 (0.002)
GRUPO C	1.65 (0.70)	.00034 (0.0026)
GRUPO D	3.41 (2.2)	0.0061 (0.002)
GRUPO E	5.22	0.00252

++ No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.  
( ) DS

**TABLA 14.- RELACION DE GRUPO DE COMPLEMENTACION, PUNTAJE CLINICO Y SEVERIDAD DE LA ANEMIA EN PACIENTES AF.**

<i>PACIENTES</i>	<i>GRUPO DE COMPLEMENTACION</i>	<i>PUNTAJE CLINICO</i>	<i>SEVERIDAD DE ANEMIA</i>
INP005	C	5	2
INP007	A	2	4
H1	A	0	6
INP008	A	3	4
H1	A	4	4
INP010	A	3	6
H1	A	5	3
H2	A	4	3
H3	A	3	DEFUNCION
H4	A	2	DEFUNCION
H5	A	2	5
H6	A	2	6
	1 GRUPO C		
<b>TOTAL</b>	<b>11 GRUPO A</b>		

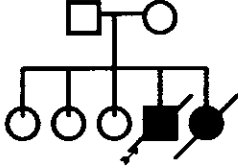
FIGURA 1.- GRUPOS DE COMPLEMENTACION EN ANEMIA DE FANCONI



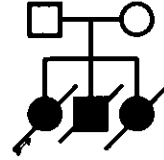


**FIGURA 2. Arboles genealógicos de las 12 familias AF.**

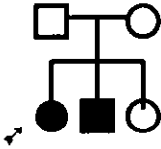
**INP001**



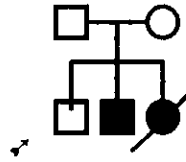
**INP002**



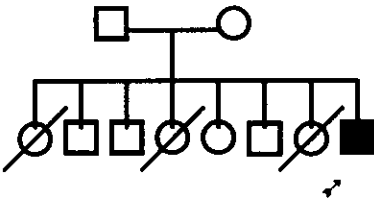
**INP003**



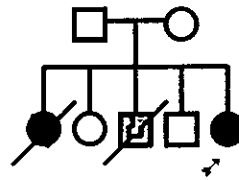
**INP004**



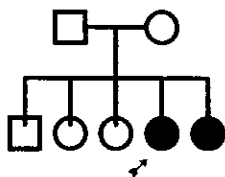
**INP005**



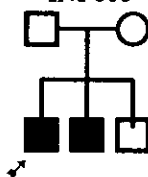
**INP006**



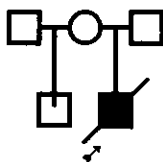
INP007



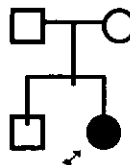
INP008



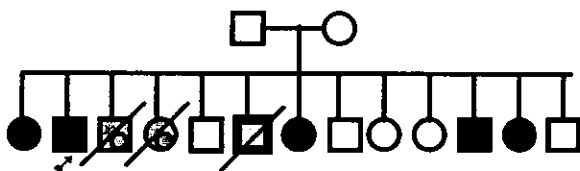
INP009



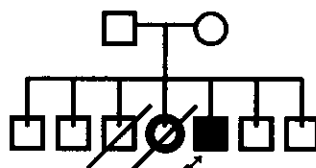
INP11\*



INP10\*



INP12



● ■ Anemia de Fanconi

\* Consanguinidad. (INP10: 3er grado; INP11: 2o. Grado)

⊘ ⊠ Fallecidos con malformación intestinal

⊘ ⊠ AF + Leucemia

⊘ ⊠ Fallecido por leucemia

⊘ ⊠ Fallecido Ca. Laringeo

#

FALTAN PAGINAS

De la: **51**

A la: **56**

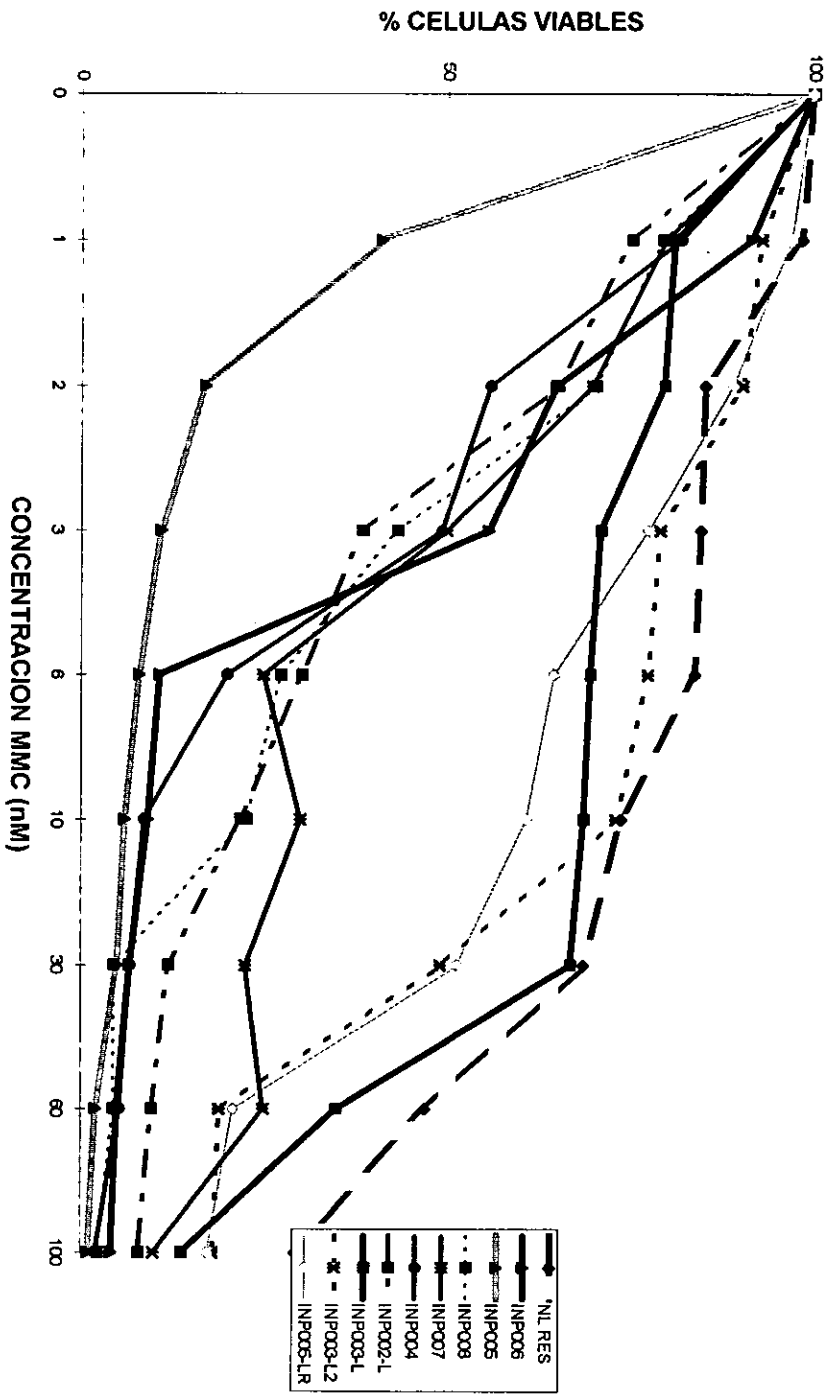
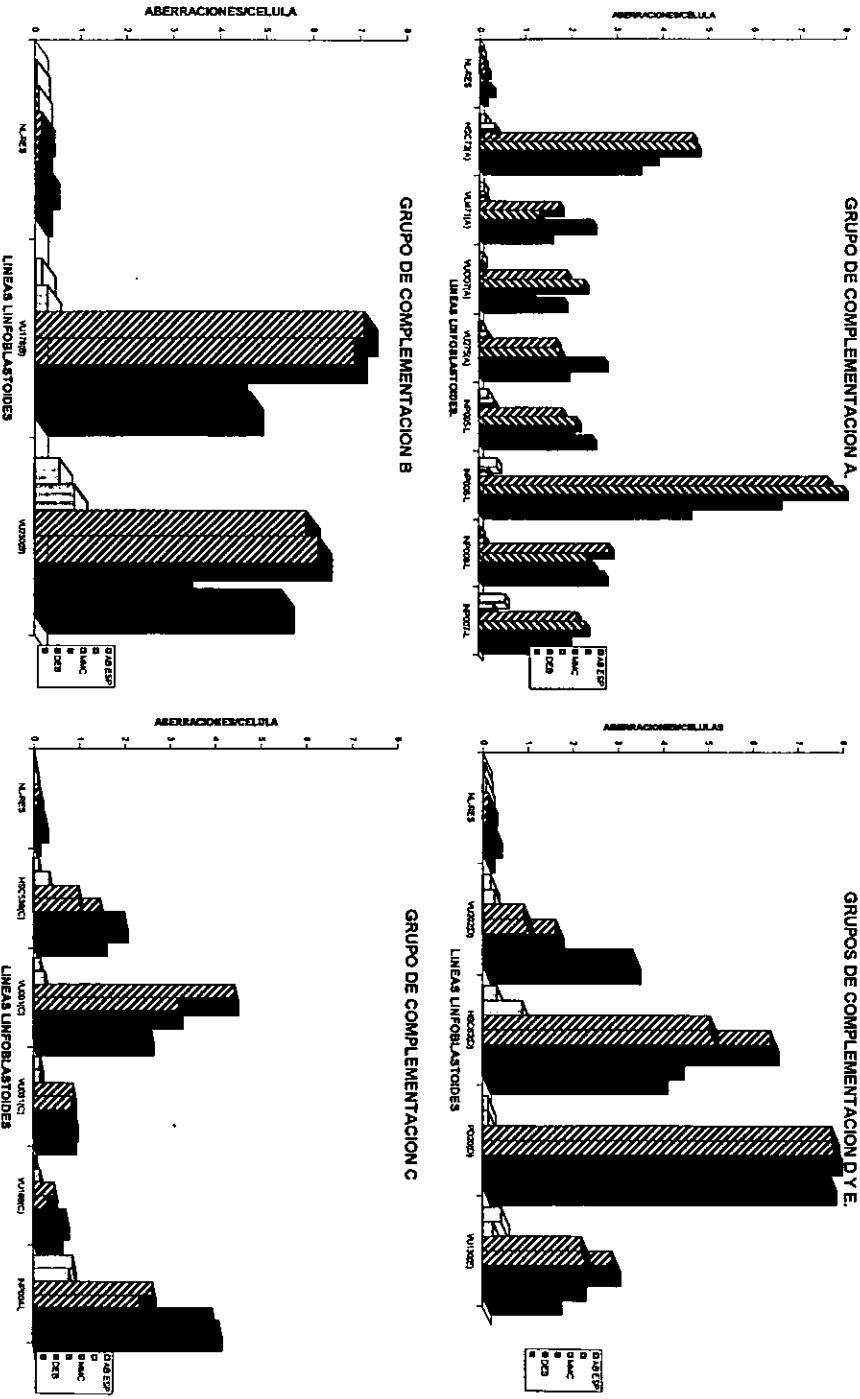


FIGURA 3A. INHIBICION DEL CRECIMIENTO CON MMC EN LLB DE PACIENTES SENSIBLES Y RESISTENTES

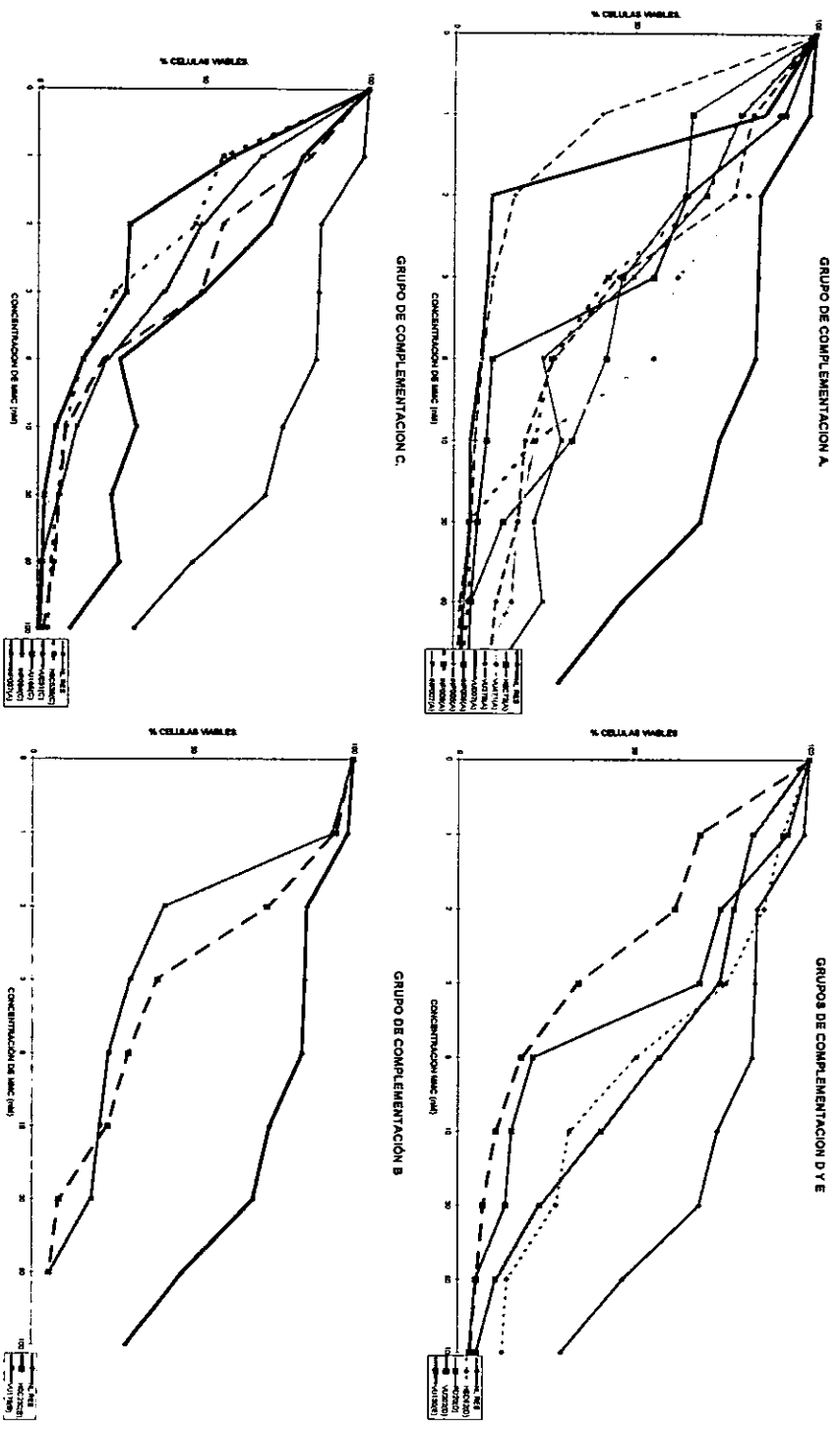


FIGURA 5.- ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESPONTANEAS E INDUCIDAS EN LINEAS LINFOBLASTOIDES DE LOS GRUPOS DE COMPLEMENTACION A, B, C, D Y E.





**FIGURA 7. CURVAS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO CON MMC EN LAS LINEAS LINFOBLASTOIDES DE LOS GRUPOS DE COMPLEMENTACION A, B, C, D Y E.**





## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gordon EC, Rutherford TR (1989): Fanconi Anaemia- Constitutional, familiar aplastic anaemia. *Baillieres Clin Haematol* 2: 139-151.
2. Alter B.P (1993): Fanconi's anaemia and its variability. *British J of Haematology* 85: 9-14.
3. Joenje H, Mathew C y Gluckman E (1995). Fanconi anaemia research: Current status and prospects. *Europ J Cancer* 2 : 268-272.
4. Wegner R-D, Henrichs Y, Joenje H, Schroeder-Kurth T (1996). Fanconi anemia complementation group E: clinical and cytogenetic data of the first patient. *Clinical Genetics* 50: 479-482.
5. Alter BP (1992): Fanconi Anemia. *Current Concepts. Am J Pediatr Hematol Oncol* 14: 170-176.
6. Heim R, Lench N y Swift M (1992). Heterozygous manifestations in four autosomal recessive human cancer-prone syndromes: ataxia telangiectasia, xeroderma pigmentosum, Fanconi anemia, and Bloom syndrome. *Mutat Res* 284: 25-36.
7. Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG, Auerbach AD (1997) Diagnosis of Fanconi Anemia Patients without Congenital Malformations: An International Fanconi Anemia Registry study. *Am J Med Genet* 68: 58-61.
8. Macdougall LG, Rosendorff J, Poole JE, Cohn RJ, McElligott SE (1994). Comparative study of Fanconi anaemia in children of different ethnic origin in south africa. *Am J Med Genet* 52: 279-284.
9. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurt TM. (1989): International Fanconi anemia registry: Relation of clinical symptoms to Diepoxibutane sensitivity. *Blood* 73: 391-396.
10. Savoia A, Zatterale A, Del Principe D, Joenje Hans (1996): Fanconi Anaemia in Italy: high prevalence of complementation group A in two geographic clusters. *Hum Genet* 97: 599-603.
11. Alter BP, Knobloch ME, Weinberg RS (1991): Erythropoiesis in Fanconi's Anemia. *Blood* 78: 602-608.
12. Schroeder TM, Anschutz F, Knopp A (1964). Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy. *Hum.Genet* 1: 194-199.
13. Sasaki MS, Tomomura A (1973). A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA crosslinking agents. *Cancer Res* 33:1829-1836.
14. Auerbach AD, Wolman SR (1976). Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature* 261: 494-496.
15. Novotná B, Goetz P, Surkova NI (1979). Effects of alkilating agents on lymphocytes from controls and from patients with Fanconi's anemia. *Hum.Genet* 49: 41-48.
16. Auerbach AD (1993): Fanconi Anemia diagnosis and the diepoxibutane (DEB) test. *Exp Hematol* 21:731-736.

17. Papadopoulo D, Averbeck D, Moustacchi E (1987). The fate of 8-methoxy-psoralen-photoinduced DNA interstrand cross-links in Fanconi's anemia cells of defined complementation groups. *Mutat. Res* 184: 271-277.
18. Arwert F y Kwee L (1989). Chromosomal breakage in response to cross-linking agents in the diagnosis of Fanconi anemia. En: Schroeder TM, Auerbach A y Obe G: Fanconi anemia, clinical cytogenetic and experimental aspects. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp: 83-91.
19. Kwee ML, Poll EHA, van de Kamp JJP, Koning H, Eriksson AW, Joenje H (1983). Unusual response to bifunctional alkylating agents in a case of Fanconi anaemia. *Hum Genet* 64: 384-387.
20. D' Andrea AD (1996). Fanconi anaemia forges a novel pathway. *Nature Genet* 14: 240-241.
21. Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Briot D, Pricur M (1982): The cell cycle of lymphocytes of Fanconi anaemia. *Hum Genet* 62: 327-332.
22. Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS (1985): Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent endomitosis in Fanconi anaemia cells. *Am J Hum Genet* 37: 1022-1028.
23. Krutz FAE, Dijkmans LM, van den Berg TK, Joenje H (1996): Fanconi anaemia act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 87: 936-948.
24. Joenje H, Mathew C, Gluckman E (1995). Fanconi anemia research: current status and prospects. *Europ J Cancer* 31:268-272.
25. Zakrewski S, Sperling K (1980): Genetic heterogeneity of fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum Genet* 56: 81-84.
26. Digweed M, Zawrzewsky-Lodke S, Sperling K. (1988): Fanconi's anemia: correlation of genetic complementation group with psoralen/UVA response. *Hum Genet* 78: 51-54.
27. Moustacchi E (1989): Phenotypic and genetic heterogeneity in Fanconi anemia, fate of crosslinks and correction of the defect by DNA transfection. En Schroeder-Kurt T,M, Auerbach AD, Obe G: "Fanconi Anemia, clinical, cytogenetic and experimental aspects." Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp 196-106.
28. Auerbach AD, Koerse RE, Ghosh R, Venkatraj VS, Zhang M, Chiorazzi N. Complementation studies in Fanconi anemia. En Schroeder-Kurt T,M, Auerbach AD, Obe G: "Fanconi Anemia, clinical, cytogenetic and experimental aspects." Berlin Heidenberg: Springer Verlag, pp 213-225.
29. Duckwoth-Rysiecki G, Cornish K, Clake C, Buchwald M (1985). Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. *Somat Cell Mol Genet* 11: 35-41.
30. Strathdee CA, Duncan AMV and Buchwald M (1992). Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nature Genet* 1992; 1: 196-198.

31. Joenje H, Lo Ten Foe JR, Oostra AB, van Berckel CGM, Rooimans MA, Schroeder-Kurt T, Wegner RD, Gille JJP, Buchwald M, Arwert F (1995): Classification of Fanconi Anemia Patients by complementation analysis: Evidence for a fifth genetic subtype. *Blood* 86: 2156-2161
32. Joenje H, Lo Ten Foe JR, Oostra AB, van Berckel CGM, di Summa F, Pronk JC. (1995): "Fanconi Anaemia in Europe". En Müller HJ, Scott RJ, Webber W: *Hereditary Cancer*. Basel Karger. pp 141-145.
33. Joenje H (1996): Fanconi anaemia complementation groups in Germany and the Netherlands. *Hum Genet* 97: 280-282.
34. Joenje H, Oostra AB, van Berckel CGM, di Summa F, Pronk JC, Arwert F (1997) Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. *Am J Hum Genet* 61: 940-944.
35. Mewrick R, Clarke AC, Buchwald M (1993): Cloning and analysis of the murine fanconi anemia group C cDNA. *Hum Mol Genet* 2: 665-662.
36. Gibson RA, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Buchwald M, Mathew C (1993): A nonsense mutation and exon skipping in the fanconi anaemia group C gene. *Hum Mol Genet* 2: 797-799.
37. Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, Auerbach AD (1994): Mutation analysis of the fanconi Anemia gene FACC. *Am J Hum Genet* 54: 595-601.
38. Gibson R, Morgan N, Goldstein L, Pearson I, Foot Nj, Jansen S, Havenga C, Pearson T, Ravel TJ, Chon RJ, Marques I, Dokal I, Roberts I, Marsh J, Ball S, Milner RD, Llerena JC, Samochatova E, Mohan SP, Vasudevan P, Birjandi F, Hajianpour A, Murer-orlando M, Mathew C (1996). Novel mutations and polymorphisms in the Fanconi anemia group C gene. *Hum Mutat* 8:140-148.
39. Lo ten Foe J, Barel M, Thub P, Digweed M, Arwert F y Joenje H (1996). Sequence variations in the Fanconi anaemia gene, FACC: pathogenicity of 1806insA and R548X and recognition of D195V as a polymorphic variant. *Hum Genet* 98:522-523.
40. Hang B, Yeung AT, Lambert MW (1993): A damage-recognition protein which binds to DNA containing interstrand cross-links is absent or defective in Fanconi anemia, complementation group A, cells *Nucleic Acids Res* 21:4187.
41. Pronk J, Gibson R, Savoia A, Wijker M, Morgan N, Melchionda S, Ford R, Temtamy S, Ortega JJ, Jansen S, Havenga C, Chon RJ, Ravel TJ, Roberts I, Westerveld A, Easton D, Joenje H, Mathew C (1995): Localisation of the Fanconi anaemia complementation group A gene to chromosome 16q24.3. *Nature Genetics* 11:338-340.
42. Lo Ten Foe J, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DE, Savoia A, Cheng NC, Strunk MHP, Guille JJP, Pals G, Kruyt FAE, Pronk J, Arwert F, Buchwald M, Joenje H (1996): Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nature Genet* 14:320-323.
43. Lo Ten Foe J, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DE, Savoia A, Cheng NC, Strunk MHP, Guille JJP, Pals G, Kruyt FAE, Pronk J, Arwert F,

- Buchwald M, Joenje H, Gibson R, Morgan N, Melchionda S, Ford R, Temtamy S, Ortega JJ, Jansen S, Havenga C, Chon RJ, Ravel TJ, Roberts I, Westerveld A, Easton D, Goldstein L, Pearson I, Foot NJ, Jansen S, Havenga C, Pearson T, Ravel TJ, Chon RJ, Marques I, Dokal I, Roberts I, Marsh J, Ball S, Milner RD, Llerena JC, Samochatova E, Mohan SP, Vasudevan P, Birjandi F, Hajianpour A, Murer-orlando M, Mathew C (1996). Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nature Genet* 14: 324-328.
44. Whitney M, Thayer M, Reifsteck C, Olson S, Smith L, Jakobs PM, Leach R, Naylor S, Joenje H, Grompe M (1995): Microcell mediated chromosome transfer maps the Fanconi anaemia group D gene to chromosome 3p. *Nature Genet* 11:341-343.
45. Ishida R, Buckwald M (1992): Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA-cross-linking and alkylating agents. *Cancer Res* 42: 4002-4006.
46. Yamashita T, Wu N, Kupfer G, Corless C, Joenje H, Grompe M y Andrea A (1996). Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood* 87:4424-4432.
47. Frias S, Carnevale A y Del Castillo V (1986). Utilidad de la prueba de exposición de linfocitos a mitomicina C en el diagnóstico de anemia de Fanconi. *Rev. Invest. Clin.* 36:219.
48. Frias S, Carnevale A, Molina B, del Castillo V (1986) : Estudio de heterogeneidad genética en anemia de Fanconi por medio de la adición de plasma. *Rev Invest Clin* 38:269-271.
49. Frias S, Gómez L, Molina B, Rojas E, Ostroski-Wegman P, Carnevale A (1996) Effect of hydroxiurea and normal plasma on DNA synthesis in lymphocytes from Fanconi anemia patients. *Mutat Res* 357: 115-121.
50. Louie GL, King MC (1991): Letters to the editor: A novel approach to establishing permanent linfoblastoid cell lines: Epstein-Barr virus transformation of cryopreserved lymphocytes. *Am J Hum Genet* 48: 637-638.
51. Fraser FC (1952): Consanguinity and its significance in the family history. *CMAJ* 66:258-260
52. Kwee M.L, Kuyt LP (1989): Fanconi Anemia in the Netherlands. In: Fanconi anemia clinical, cytogenetic and experimental aspects. TM Schroeder-Kurth, AD. Auerbach, G: Obe (Eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
53. Altay C, Alikasifoglu M, Kara A, Tuncbilek E, Ozbek N, Schroeder-Kurth TM (1997). Analysis of 65 turkish patients with congenital aplastic (Fanconi anemia and non-Fanconi Anemia): Hacettepe experience. *Clin Genet* 51: 296-302.
54. Marx MP, Smith S (1989): Significance of cellular sensitivity in a group of parents of Fanconi Anemia patients. In: Fanconi anemia clinical, cytogenetic and experimental aspects. TM Schroeder-Kurth, AD. Auerbach, G: Obe (Eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
55. Alter BP (1996): Fanconi's Anemia and Malignancies. *Am J Hematol* 53: 99-110.

56. Porteus MEM, Cross Y, Burn J(1992): VACTERL with hydrocephalus: One end of the Fanconi Anemia Spectrum of anomalies. *Am J Med Genet* 43: 1032-1034.
57. Rossbach HC, Sutcliffe MJ, Haag MM, Grana NH, Rossi Ar, Barbosa JL (1996): Fanconi anemia in brothers initially diagnosed with VACTERL association with hydrocephalus, and subsequently with Baller-Gerold syndrome. *Am J Med Genet* 61:65-67.
58. Auerbach AD, Venkatraj VS, Chiorazzi N, Carter DM (1985): Isolation of human-human hybridoma complementation of a gene for hypersensitivity to clastogens. *Environ Mutagen* 7 (suppl 3): 47-48.
59. Wolf U (1997). Identical mutations and phenotypic variation. *Hum Genet* 100: 305-321
60. Bagby G.C (1997): The pathogenesis of Bone Marrow Failure in Fanconi Anemia, *Blood*: en prensa.
61. Poot M, Grob O, Epe B, Pflaum M, Hoehn H (1996). Cell cycle defect in connection with oxygen and iron sensitivity in fanconi anemia lymphoblastoid cells. *Exp Cell Res* 222: 202-206.
62. Lo Ten Foe J, Roimans MA, Guille JJP, Pals G, Kruyt FAE, Pronk J, Arwert F, Joenje H (1997). Somatic mosaicism in Fanconi Anemia: Molecular Basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet* 5:137-138.
63. Digweed M, Sperling K (1996) Molecular analysis of Fanconi anemia. *Bioessays* 18: 579-585.