



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

TÍTULO DE TESIS:

CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LOS
PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA DE ANEMIA
DE FANCONI ESTUDIADOS MEDIANTE ANÁLISIS
DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS
ESPONTÁNEAS E INDUCIDAS EN EL
LABORATORIO DE CITOGENÉTICA DURANTE EL
PERIODO 1998-2020

PRESENTA

DRA. ILSE GABRIELA OCHOA MELLADO

TUTOR DE TESIS:

M.C BERTHA MOLINA ÁLVAREZ

CO-TUTOR:

DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ

ASESORES METODOLÓGICOS

DRA. PATRICIA CRAVIOTO QUINTANA
FIS. MAT. FERNANDO GALVÁN CASTILLO

INP

Ciudad de México 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



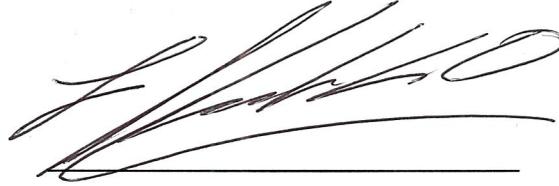
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LOS PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA DE ANEMIA DE FANCONI ESTUDIADOS MEDIANTE ANÁLISIS DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS ESPONTÁNEAS E INDUCIDAS EN EL LABORATORIO DE CITOGENÉTICA DURANTE EL PERIODO 1998-2020”



**DR. LUIS XÓCHIHUA DÍAZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**



**DRA. ROSA VALENTINA VEGA RANGEL
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO**



**DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA
CO-TUTOR DE TESIS**



**M.C. BERTHA MOLINA ÁVAREZ
TUTOR DE TESIS**



**DRA. PATRICIA CRAVIOTO QUINTANA
ASESOR METODOLÓGICO**



**FÍS. MAT. FERNANDO GALVÁN CASTILLO
ASESOR METODOLÓGICO**

Índice

1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 Generalidades	4
1.2 Epidemiología.	5
1.3 Fenotipo clínico	6
1.4 Fenotipo citogenético	9
1.6 Mosaicismo celular en AF	13
1.7 Diagnóstico de AF	14
1.8 Tratamiento	15
1.9 Aberraciones cromosómicas	16
1.10. Correlación genotipo-fenotipo	18
1.11 Antecedentes Directos	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. OBJETIVO GENERAL	22
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS.	23
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
8.1 Descripción general de los pacientes de toda la población de estudio	29
8.2 Pacientes positivos a Anemia de Fanconi	31
8.3 Pacientes negativos a Anemia de Fanconi	41
8.4 Pacientes posibles mosaico AF	46
8.5 Pacientes positivos, negativos y mosaicos AF	51
8.6 Descripción clínica de los pacientes con resultado positivo para Anemia de Fanconi.	53
8.7 Correlación genotipo-fenotipo	60
9. CONCLUSIONES	64
10. BIBLIOGRAFÍA	66

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades

La anemia de Fanconi (AF), es un síndrome de inestabilidad cromosómica asociado con anomalías congénitas, falla medular ósea y predisposición a cáncer¹. Es una enfermedad mendeliana con una forma de herencia autosómica recesiva, ligada al cromosoma X y autosómica dominante, y cursa con variabilidad clínica, citogenética y molecular.

En general, la AF se caracteriza por presentar diversas malformaciones congénitas como retraso en el crecimiento, alteraciones de la pigmentación de la piel (hipo e hiperpigmentación), malformaciones esqueléticas del radio y/o pulgar, microcefalia, alteraciones renales, genitales, cardíacas, oculares y auditivas². A nivel hematológico, los pacientes presentan falla medular ósea que produce anemia aplásica, trombocitopenia o pancitopenia en edades tempranas. Los pacientes también tienen alto riesgo de presentar entidades malignas como síndrome mielodisplásico, leucemias y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello^{1,2}.

A nivel citogenético, presentan una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas e hipersensibilidad a agentes inductores de enlaces cruzados, como la mitomicina C (MMC) o el diepoxibutano (DEB). Esta respuesta celular se utiliza como el estándar de oro en el diagnóstico de la enfermedad.

La AF se presenta cuando ocurre una mutación o variante patogénica en uno de los 22 genes conocidos como genes Fanconi (*FANCA*). Estos genes se han denominado con una letra del alfabeto de acuerdo a su aparición, de tal manera que se han nombrado desde *FANCA* hasta *FANCW* y también se conocen como

subtipos o grupos de complementación Fanconi. De manera normal, estos genes participan en una vía denominada FA/BRCA que se encarga de coordinar la reparación de enlaces covalentes cruzados (ICLs) para mantener la integridad genómica y asegurar la sobrevivencia celular³; cuando uno de estos genes está afectado, la reparación del DNA no se realiza de forma adecuada, se desarrolla la enfermedad y las células de los pacientes presentan inestabilidad cromosómica que se traduce en una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas.

1.2 Epidemiología.

Mundialmente se estima una prevalencia de la AF de 1 a 5 por millón de recién nacidos, con un promedio de 1/136,000 (1 /100,000 –1/250,000 nacimientos)³. Existe una ligera predilección por los hombres más que por las mujeres, sin embargo, el 99% de los casos reportados en la literatura la prevalencia es igual en ambos sexos².

La AF se ha encontrado en todas las razas y grupos étnicos, sin embargo, en algunas poblaciones como la africana y la de los gitanos españoles, la prevalencia reportada es mayor probablemente debido a que la frecuencia de portadores está incrementada por la existencia de mutaciones fundadoras de un gen *FANCC* específico. En general, la frecuencia de portadores en la población AF es de 1 en 300, pero en los judíos ashkenazi de los Estados Unidos se ha observado en 1 por cada 100 individuos³. Las poblaciones con mayor prevalencia de AF con mutaciones fundadoras son los judíos ashkenazi (*FANCC* y *FANCD1*), europeos del norte (*FANCC*), los Afrikáner (*FANCA*), raza negra sub-sahariana (*FANCG*), y los gitanos españoles (*FANCA*).

En México no se tienen datos epidemiológicos, sin embargo, el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría ha sido centro de referencia nacional para el diagnóstico de pacientes con AF y anualmente se diagnostican 10

casos nuevos por cada 80 muestras que provienen de diferentes instituciones de salud de la República Mexicana⁴.

1.3 Fenotipo clínico

El fenotipo clínico asociado con la AF es extremadamente heterogéneo y multiorgánico. Clínicamente, la AF se caracteriza por presentar alteraciones en el crecimiento y desarrollo que conducen a la presencia de malformaciones congénitas, anormalidades hematológicas y una gran predisposición a desarrollar neoplasias⁵. La edad promedio del diagnóstico es a los 7 años y se han descrito casos asintomáticos y sintomáticos desde el nacimiento hasta la edad de más de 50 años.

1.3.1 Malformaciones congénitas

Las malformaciones congénitas presentes en los pacientes con AF pueden variar de paciente a paciente y pueden afectar cualquiera de los sistemas orgánicos mayores. Esta alta variabilidad de manifestaciones clínicas hace que el diagnóstico preciso sea difícil en algunos pacientes. Las malformaciones congénitas más frecuentemente observadas son la hiperpigmentación de la piel, hipopigmentación y manchas café con leche, talla baja, anormalidades del eje radial y del pulgar, alteraciones oculares, cardíacas, renales y auditivas. Aproximadamente dos tercios de los pacientes reportados presentan estas malformaciones congénitas mientras que el resto tienen pocas o ninguna^{6,7}.

Entre las malformaciones congénitas clásicas que se han visto en los pacientes con AF son aquellas que se incluyen en el acrónimo de asociación VACTERL-H (Vertebral; Anal; Cardíaca; Traqueoesofágica; Renal, Limb (extremidad) e Hidrocefalia) y se refiere que hasta el 12% de los pacientes con AF presentan 3 de estas 8 manifestaciones. Otras se agruparon recientemente en el acrónimo PHENOS (Pigmentación de la piel, Small Head(Microcefalia), Small Eyes (Microftalmia), Neuro Structure (Malformaciones cerebrales), Otology (Malformaciones auriculares o pérdida de la audición), Short Stature (Talla Baja))¹

hasta en el 9% de los pacientes con AF presenta >4 manifestaciones de 6 incluidas en PHENOS⁷.

La talla baja es una de las características comunes de los pacientes con AF, el promedio de altura que alcanza una persona con AF es dos desviaciones estándar (DE) o -2 DE más bajos que la población en general. En pacientes femeninos adultos el promedio de altura es de 150 cm, mientras que en los pacientes masculinos adultos su promedio es de 161 cm.⁷

Los pacientes tienen características identificables como cara triangular, epicanto bilateral, micrognatia e hipoplasia medio facial. También pueden presentar cuello corto e implantación de cabello baja⁸. Entre las manifestaciones oculares se describe microftalmia, cataratas, astigmatismo, estrabismo, hipotelorismo, hipertelorismo y ptosis⁸. En cuanto a las anomalías de los pabellones auriculares se encuentran las que afectan a la estructura de la oreja y la funcionalidad como la hipoacusia. Las alteraciones morfológicas más comunes son ausencia del pabellón auricular, pabellones auriculares prominentes, posición anormal (implantación baja o rotación posterior), canales auriculares pequeños o ausentes, ausencia de membrana timpánica, microtia y fusión de los huesecillos.⁶

Las malformaciones cardiopulmonares pueden ser el conducto arterial persistente, defectos septales, coartación de la aorta, *situs inversus* total, cardiomiopatía y atresia pulmonar⁸. Los defectos del sistema gastrointestinal que se describen son fistula traqueoesofágica, ano imperforado, páncreas anular y malrotación intestinal.

Los defectos de las extremidades son los más sugestivos para el diagnóstico, involucran las extremidades superiores o inferiores y pueden ser unilateral o bilateral. Las regiones más afectadas son el radio, los pulgares y las manos (hipoplasia tenar e hipotenar). En las extremidades inferiores se describen la dislocación de cadera, sindactilia y pie equinovaro. Otras anomalías del sistema esquelético son espina bífida, escoliosis, anomalías en las vértebras, deformidad de Sprengel y anomalía de Klippel-Feil⁸.

En los defectos del sistema urinario se incluyen las malformaciones de los riñones (riñón en herradura, riñón ectópico, hipoplásico, displásico o ausencia), hidronefrosis o hidroureter⁸. En los varones se pueden presentar hipospadias, micropene, criptorquidia, oligospermia y azoospermia. Las mujeres pueden presentar malposición del útero, útero bicorne y ovarios pequeños.

También el sistema endocrinológico puede estar afectado, se ha descrito talla baja por deficiencia de hormona de crecimiento, hipotiroidismo o anomalías de glucosa e insulina. Por las deficiencias hormonales, además de la talla baja pueden presentar hipofunción de la glándula pituitaria e hipogonadismo⁸. La infertilidad también es común en los pacientes afectados, aproximadamente el 50% de las mujeres son infértiles⁶.

En la piel podemos observar alteraciones de la pigmentación, como hiperpigmentación generalizada, hipopigmentación y manchas café con leche. Las áreas más frecuentes de hiperpigmentación son el tronco, el cuello, ingle y axilas⁶.

Las malformaciones del sistema nervioso central que se han descrito son las asociadas a la glándula pituitaria, ausencia de cuerpo callos, hipoplasia cerebelar, hidrocefalia y dilatación de ventrículos. También se ha reportado pacientes con retraso del neurodesarrollo y discapacidad intelectual⁸.

1.3.2 Alteraciones hematológicas.

La AF es un síndrome de falla medular porque la característica hematológica primordial es la anemia aplásica que se presenta en el 90% de los pacientes. Las manifestaciones hematológicas ocurren en los pacientes a una edad promedio de 7 años, que en muchos casos es el motivo del diagnóstico de AF. Característicamente presentan falla medular que al principio puede manifestarse como citopenia, anemia, trombocitopenia o neutropenia y posteriormente progresar a pancitopenia; en varios casos también se ha observado macrocitosis y aumento de la hemoglobina fetal⁷. Clínicamente presentan palidez, sangrado e

infecciones de repetición y alrededor del 7% desarrollan síndrome mielodisplásico^{5,7,9}

Los pacientes con AF se encuentra en un alto riesgo de presentar síndrome mielodisplásico, y leucemia mieloide aguda⁷. Esta condición se asocia con anomalías citogenéticas clonales en la médula ósea: duplicación de 1q, ganancia de porciones de 3q y monosomía completa o pérdida parcial del cromosoma 7. ⁷ la leucemia linfocítica aguda y los linfomas son raros en AF, generalmente se encuentran en pacientes con defectos en el gen *FANCD1/BRCA2*⁷

1.3.3 Predisposición a cáncer

La AF es un síndrome que predispone al cáncer, los pacientes desarrollan neoplasias en edades más tempranas que los individuos de población general. Las neoplasias generalmente se presentan durante la adolescencia, siendo la más común la leucemia mieloide aguda que se encuentra en el 94% de los pacientes con AF ^{6,9}. Adicionalmente existe un riesgo incrementado a desarrollar tumores sólidos, principalmente carcinoma de cabeza y cuello y del aparato urogenital femenino, con una edad de presentación de 30 años.

Otros tumores pueden aparecer en el cerebro, en el hígado (secundario a tratamiento con andrógenos) y en el riñón (tumor de Wilms). También tienen un alto riesgo de cáncer asociado con papilomavirus humano^{6,8}.

Lo recomendable en estos pacientes es la resección quirúrgica ya que debido a los defectos en la reparación del DNA los hace extremadamente sensibles a la quimioterapia y radioterapia.

1.4 Fenotipo citogenético

La AF se considera un síndrome de inestabilidad cromosómica ya que de manera espontánea, la células AF presentan una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas e hipersensibilidad a los agentes inductores de enlaces cruzados interhebra (ICLs) como la mitomicina C (MMC) o diepoxibutano (DEB)

significativamente mayores a las observadas en células normales; ésta hipersensibilidad de AF se expresa como una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas y se ha utilizado desde hace mucho tiempo como la prueba citogenética diagnóstica de la enfermedad (Fig.1). Esta respuesta celular se debe a que la AF tiene un defecto de la reparación de los ICLs por recombinación homóloga del DNA que involucra a cualquiera de los 22 genes *FANC* conocidos.

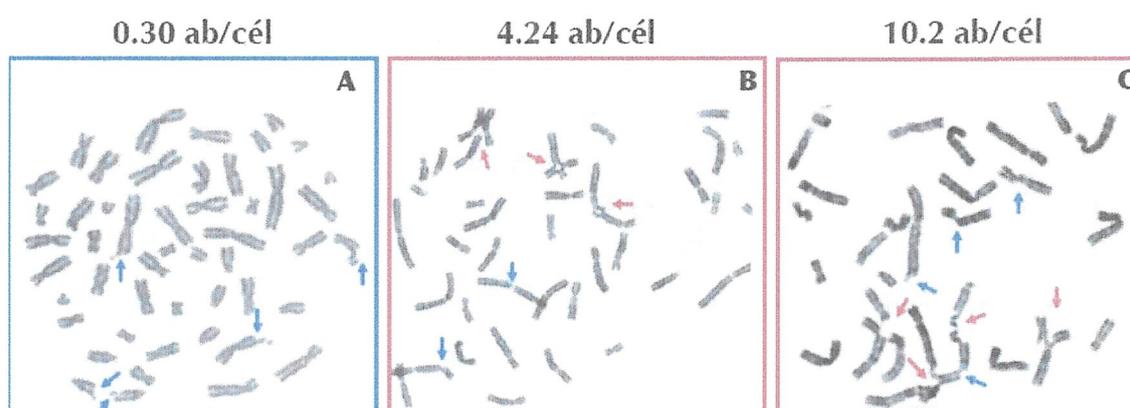


Figura 1. Diagnóstico citogenético positivo de un paciente AF. A) Metafase del paciente sin tratamiento, con una frecuencia de ab/cél mayor que la que se observa en un individuo sano, B) Metafase de un paciente positivo al diagnóstico de AF en donde se observa la hipersensibilidad al DEB y la presencia de figuras radiales que son características en la AF; la respuesta es similar a la del control positivo, C) Metafase de un linfoblasto con AF (control positivo) con una elevada frecuencia de ab/cél y figuras radiales con roturas cromatídicas. Las flechas azules indican roturas cromatídicas y cromosómicas o isocromatídicas y las rojas muestran las figuras radiales. Tomado de Molina et. al 2022.¹⁰

Existe una diferencia muy importante en el tipo de aberraciones que se observan al hacer el diagnóstico citogenético, espontáneamente se pueden observar aberraciones simples como rupturas cromatídicas y cromosómicas mientras que de manera inducida muestran alteraciones cromosómicas más complejas como anillos, dicéntricos y figuras radiales que son muy características en la AF y que están ausentes en las células normales (Fig. 2).

Aunque todas las células AF exhiben la hipersensibilidad a la MMC o DEB, existe una gran variabilidad citogenética en la respuesta, pero siempre hay una elevación 10x de aberraciones comparada con su frecuencia de daño espontánea y con la de las células normales. Debido a esto es muy importante conocer la respuesta citogenética de un gran grupo de pacientes positivos a AF y negativos a la MMC o DEB en una población grande como la que se tiene en el Laboratorio de Citogenética del INP.

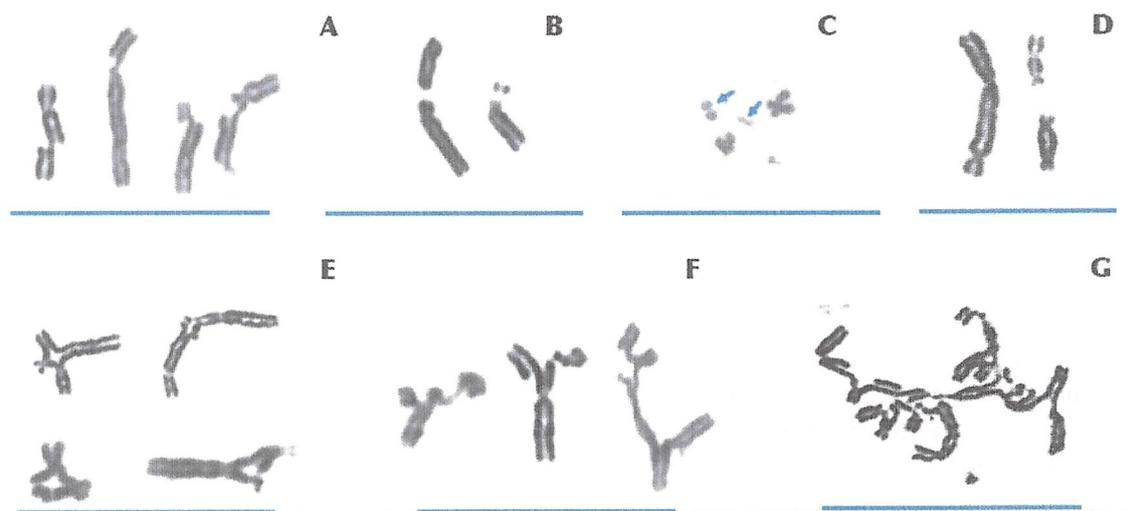


Figura 2. Tipos de aberraciones cromosómicas observadas en células de pacientes AF expuestas a DEB. **A)** Roturas cromatídicas **B)** Roturas cromosómicas o isocromatídicas **C)** Fragmentos acéntricos (flechas azules) **D)** Dicéntricos **E)** Figuras trirradiales y tetrarradiales **F)** Figuras radiales con roturas **G)** Figura polirradial. Tomado de Molina et. al. 2022.¹⁰

1.5 Fenotipo molecular

Los genes *FANC* forman parte de la vía AF/BRCA que junto con otras proteínas coordinan la señalización del daño al DNA y los procesos enzimáticos de reparación de los enlaces cruzados intercatenarios detectados durante la replicación del DNA². En individuos sanos, los productos proteicos de los 22 genes *FANC* están normales y la reparación de los enlaces cruzados en el DNA se lleva

a cabo correctamente de tal manera que se mantiene la estabilidad genómica y la supervivencia celular. Cuando las células presentan una mutación en uno de los 22 genes *FANC* no pueden reparar el DNA y se genera daño en éste, lo que resulta en inestabilidad genómica, en un aumento en la susceptibilidad a agentes inductores de enlaces cruzados y predisposición a malignidad.

La reparación de los ICLs en células normales, se inicia por su detección a través de FANCM que se une al sitio dañado en el DNA, enseguida se forma y se recluta el complejo core (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL Y FANCM) que contiene una ligasa de ubiquitina E3 que monoubiquitina al heterodímero FANCD2-FANCI para que posicione en la cromatina dañada y sirva de plataforma para la llegada de otras proteínas FANC, que lleven a cabo el procesamiento nucleotídico (FANCP y FANCO) que genera un aducto con el ICL y una ruptura de doble hebra en el DNA. La polimerasa de traslación FANCV inicia la replicación de la hebra complementaria a la hebra que contienen el ICL dejando intacta esta doble hebra. Para finalizar, la ruptura de doble hebra restante se repara a través de reparación dirigida por homología, en la que participan las proteínas de recombinación homóloga FANCS (BRCA1), FANCI, FANCF (RAD51), FANCO (RAD51C), FANCN, FANCD1 (BRCA2), FANCO y FANCW, que al recombinar y sintetizar el nuevo segmento de DNA producen la estructura de Holliday que debe ser resuelta por disolución al actuar la helicasa BLM, la topoisomerasa III-alfa y las proteínas de inestabilidad (RecQ) o por resolución nucleotídica realizada por el complejo FANCP-MUS81-SLX1 dando lugar a la restauración total de la doble hebra de DNA. Una mutación en cualquiera de los genes de las proteínas FANC produce la enfermedad de anemia de Fanconi.^{13,14}

La respuesta de hipersensibilidad a agentes inductores de daño en las células AF es una característica constante y reproducible que ha sido utilizada desde hace décadas en el diagnóstico citogenético de la enfermedad. El diagnóstico molecular, ha permitido identificar diversas variantes patogénicas en los 22 diferentes genes asociados a AF. El grupo de complementación AF-A es el más grande e incluye el mayor número de variantes patogénicas privadas en el gen

FANCA (57%), seguido de los grupos AF-C y AF-G aunque el número de variantes únicas en los genes *FANCC* (8.3%) y *FANCG* (7.7%) es más bajo⁶. Los pacientes con variantes patogénicas en *FANCG* cursan con citopenias más graves y un aumento en la incidencia de leucemia. Variantes patogénicas homocigotas nulas en *FANCA* se asocia a una presentación más temprana de anemia y una incidencia mayor de leucemia que los pacientes con variantes patogénicas en *FANCC*¹. Las anomalías congénitas se presentan con mayor frecuencia en pacientes con variantes patogénicas en *FANCA* y *FANCG*. Además de alto riesgo de cáncer en pacientes con variantes patogénicas en los genes *FANCD1/BRCA2* y *FANCN/PALB2*¹.

Debido a esta gran heterogeneidad molecular, además de la variabilidad fenotípica, no ha sido tan fácil establecer una correlación genotipo-fenotipo.

1.6 Mosaicismo celular en AF

Se estima que del 10 al 25% de los pacientes con AF presentan mosaicismo con dos poblaciones celulares¹¹, una sensible a agentes inductores de daño al DNA y consistente con diagnóstico de AF, y otra resistente a dichos agentes con comportamiento normal. El mosaicismo es causado por una reversión genética u otras mutaciones compensatorias en células hematopoyéticas y puede estar asociado con la reversión de la falla medular y la disminución de la sensibilidad de las células sanguíneas a los agentes que dañan el DNA; estas células sanguíneas revertantes de la médula ósea presentan una capacidad de reparación del DNA funcional¹².

La clínica en estos pacientes, debido a esta población de células hematopoyéticas con reversión genética, se ha asociado con un curso hematológico favorable en pacientes con AF¹². En el estudio de fragilidad cromosómica los pacientes presentan resultados no concluyentes, aun cuando se emplean controles positivos y negativos correctamente. No cumplen el criterio citogenético de un incremento de 10x la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas con respecto a su frecuencia basal y a la del control negativo, y el porcentaje de células aberrantes es menor al 50%¹⁰.

La confirmación de una sospecha de mosaicismo se puede hacer en linfocitos de sangre periférica tratados con 50, 150 y 300 nM de MMC durante 72 horas, al comparar su respuesta celular con una de un individuo sano y un paciente positivo a AF. Con la concentración más alta de MMC, en los pacientes con mosaico existen 10% de células sin daño y 90% de células con 1 a 10 ab/cél y en el positivo AF casi el 100% de células con más de 10 aberraciones, y casi 0% de células sin daños¹¹. La corroboración de mosaicismo también se puede hacer al realizar el estudio de fragilidad en otro tejido que no sea hematológico (como fibroblastos de piel). Lo ideal sería confirmar el mosaicismo al determinarse la variante patogénica que causa la AF.

1.7 Diagnóstico de AF

El cuadro clínico en la AF es extremadamente variable, hasta el 37% de los pacientes no presentan malformaciones congénitas asociadas y en esos casos el diagnóstico se retrasa y se sospecha hasta que presentan las alteraciones hematológicas o la pancitopenia¹⁵ cuando los pacientes presentan signos y síntomas de pancitopenia como fatiga, mareos, epistaxis, petequias e infecciones recurrentes. Se debe realizar un recuento completo de sangre para evaluar las características de forma, tamaño y número de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Los valores que encontramos cuando existe pancitopenia son conteo absoluto de neutrófilos menor de 100/mL, hemoglobina menor de 10g/dL con reticulocitos menos de 40000/mL y conteo de plaquetas menos de 50000/mL. Estudios más específicos como la eritropoyetina en suero puede encontrarse en niveles elevados en suero, esto debido al bajo nivel de células sanguíneas. Para confirmar la falla medular se realiza aspiración de médula ósea en donde se revela hipocelularidad (menos del 25%)¹³, aplasia con médula grasa y ausencia de células progenitoras hematopoyéticas de las líneas celulares mieloide, eritroide y de megacariocitos.

Además de los datos hematológicos otros datos que pueden orientar la sospecha diagnóstica son la talla baja, hiperpigmentación de la piel (manchas café con

leche), antecedente de peso bajo al nacimiento, incluso malformaciones esqueléticas de extremidades superiores. También se pueden incluir estudios adicionales como radiografías para identificar defectos del hueso, ultrasonido abdominal se utiliza para monitorizar el hígado y el riñón, tanto su forma como su tamaño¹³.

El diagnóstico citogenético que analiza las ACs es el estándar de oro para el diagnóstico de la AF y se basa en la hipersensibilidad específica a los agentes alquilantes bifuncionales como la MMC o el DEB que generan ICLs en la molécula de DNA ^{16,17,18, 19,20}. Se realizan cultivos de linfocitos de sangre periférica o médula ósea, con sin tratamiento con DEB o MMC y se analiza la fragilidad cromosómica al cuantificar rupturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos céntricos y acéntricos, anillos, dicéntricos y figuras radiales en 25 células³. Este ensayo se realiza de manera paralela con células de individuos sanos y de una línea celular mutante para algunos de los genes *FANC* que se utilizan como el control negativos y positivo de la AF respectivamente. El criterio que se utiliza en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría para proporcionar un diagnóstico positivo a la AF, es que la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas en el paciente debe ser 10 veces mayor a la observada en las células sin tratamiento y en las células normales, y una respuesta similar a la detectada en las línea celular mutante. Aunque la respuesta a los mutágenos es constante y reproducible sería muy importante conocer si existe una correlación entre el tipo y cantidad de aberraciones cromosómicas compara con el genotipo de los pacientes.

1.8 Tratamiento

Existen diferentes manejos a los que los pacientes con AF pueden ser sometidos. Los tratamientos de soporte tienen un efecto inmediato, como las transfusiones de concentrados eritrocitarios y plaquetas; o el factor estimulante de colonias de granulocitos que tiene una buena respuesta a la leucopenia. ¹³

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas puede conseguir la cura de la anemia aplásica y prevención de síndromes mielodisplásicos, sin embargo, no todos los pacientes serán candidatos a este tratamiento, por lo que en aquellos que no puedan realizarse el trasplante se recomienda terapia androgénica, con oximetolona, danazol u oxandrolona, los cuales estimulan la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas¹³.

No olvidar los tratamientos para corrección de los defectos congénitos por medio de la cirugía, corrección de malformaciones en extremidades, cardiopatías, fistula traqueoesofágica y ano imperforado ya que muchos de estos son defectos congénitos mayores, que comprometen la vida o la función en los pacientes.

1.9 Aberraciones cromosómicas

Las ACs se conocen como cualquier cambio en forma, tamaño o número de los cromosomas. Pueden ser numéricas o estructurales. Las numéricas se refieren a aneuploidías y poliploidías que ocurren debido a una segregación anormal durante la anafase en la división celular. Las estructurales se clasifican en estables e inestables por su capacidad de transmitirse de una generación celular a otra. Las ACs estables se forman por una o varias rupturas en el DNA de uno o más cromosomas que posteriormente se reúnen en una posición diferente a la original incluso dentro del mismo cromosoma y son capaces de permanecer en sucesivas divisiones celulares. Dentro de las principales alteraciones estructurales se encuentran las deleciones, duplicaciones, anillos, dicéntricos, translocaciones, inversiones, inserciones e isocromosomas; estos desbalances cromosómicos pueden tener consecuencias importantes en el fenotipo de la descendencia, pueden causar abortos o productos a término con distintas malformaciones genéticas o anormalidades físicas²¹.

Por otra parte, las ACs inestables se producen por lesiones en el DNA que afectan una o dos cromátidas del cromosoma que generalmente no son reparadas por la célula y no se pueden transmitir en las siguientes divisiones celulares. Estas

ACs se originan de manera espontánea, por metabolitos celulares endógenos como los aldehídos o los radicales libres mientras que las inducidas son consecuencia de la exposición del material genético a agentes físicos o químicos externos como la radiación ultravioleta, la radiación ionizante, DEB y MMC que producen diversos tipos de lesiones en los cromosomas.

El tipo de ACs se relaciona con el tipo de agente que las causa, en particular si su mecanismo de acción es dependiente o no de la fase S del ciclo celular, y de la efectividad del mecanismo de reparación que interviene para subsanar el daño y reunir a los cromosomas y fragmentos para que regresen a su estado original, pero también se pueden reunir de forma incorrecta o no reunirse²². Esto hace que se distingan dos clases principales de ACs estructurales:

Las aberraciones cromosómicas (CSA), son alteraciones de tipo cromosómico en las que se afectan las dos cromátidas de un cromosoma. Este patrón es consecuencia de rupturas de doble cadena que no fueron reparadas o que se repararon incompletamente. Generalmente son causadas por clastógenos independientes de fase S que generan su efecto en las fases G0 o G1 como la radiación ionizante. Los tipos de ACs que se identifican a consecuencia de este tipo de insultos son cromosomas dicéntricos, anillos, fragmentos cromosómicos acéntricos y translocaciones balanceadas. Estas últimas son consideradas ACs estables que pueden transmitirse a células hijas, mientras que las otras mencionadas se consideran inestables y son señales efectivas para inducir apoptosis.

Las aberraciones cromatídicas (CTA) son alteraciones de tipo cromatídico que afectan únicamente una cromátida. Estas lesiones ocurren en respuesta a clastógenos de fase S que condicionan modificaciones químicas de bases o rupturas de cadena sencilla, como los agentes químicos. Lo que se observa son rupturas cromatídicas e intercambios de cromátidas hermanas. Aunque la radiación ionizante puede inducir este tipo de daño, dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se aplique, generalmente provienen de agentes que son dependientes de fase S (como la MMC o el DEB) y que por lo tanto pueden afectar

una sola cromátida del cromosoma replicado. Las lesiones que generan estos agentes pueden dar lugar a figuras radiales, que también pueden en la siguiente segregación mitótica generar dicéntricos, translocaciones, deleciones y duplicaciones²².

Es relevante y decisivo el destino final de las células, las ACs estables, como las translocaciones, pueden causar consecuencias deletéreas en un organismo ya que son menos efectivas en causar apoptosis; mientras que las inestables, como los cromosomas dicéntricos, anillos y fragmentos cromosómicos pueden eliminarse por apoptosis de forma dependiente de la vía de p53.

La elevación de la frecuencia de aberraciones en AF se debe a que no se puede reparar el daño porque está afectada la vía FA/BRCA y quedan ICLs y rupturas de doble hebra en distintos cromosomas que deben ser reparadas para que la célula mantenga integridad genómica, continúe con su ciclo celular y sobreviva. Debido a que no se pueden reparar, estas lesiones de doble hebra de distintas regiones y cromosomas se unen por reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ) que forman cromosomas aberrantes y figuras radiales que al tener una conformación aberrante no proseguirán en el siguiente ciclo celular y muy probablemente morirán.

Estos eventos ocurren en los cultivos de los pacientes con anemia de Fanconi cuando se hace el diagnóstico, pero desconocemos si el tipo y frecuencia de cromosomas aberrantes es igual en todos los pacientes.

1.10. Correlación genotipo-fenotipo

En un principio, al descubrirse la heterogeneidad genética de la AF, se especulaba que cada grupo de complementación se presentaría con características distintivas. Pero esto se volvió la excepción y no la regla. Se han realizado varios estudios retrospectivos con el intento de correlacionar el genotipo con el fenotipo⁵.

Hasta el momento se reporta que para los pacientes con variantes patogénicas nulas en *FANCA* desarrollan anemia a edad tempranas y una alta incidencia de leucemia, pero otros análisis lo descartan; aunque existen variantes específicas

como p.His913Pro and p.Arg951Gln/Trp pueden predecir inicio tardío de la enfermedad y progresión lenta de manifestaciones hematológicas⁷.

Para las variantes en *FANCC* se reportó por el Registro Internacional de Anemia de Fanconi que los pacientes tienen una falla medular de inicio temprano y un pronóstico sombrío comparados con los individuos con variantes en *FANCA* y *FANCG*. En el Grupo de Investigación Europeo de AF fue todo lo contrario ya que los individuos con variantes en *FANCC* tuvieron un curso hematológico menos grave. Este mismo grupo de investigación reportó que para las variantes en *FANCG* se veía una mayor citopenia y una incidencia mayor a leucemia⁷.

También se reportó que pacientes con variantes patogénicas bialélicas en el gen *FANCD1/BRCA2* pueden desarrollar leucemia, leucemia mieloide aguda o leucemia linfoblástica aguda más temprano de lo que se espera. Además de desarrollar tumores sólidos como meduloblastoma, glioblastoma o astrocitoma multiforme y tumor de Wilms, que no se ven comúnmente en AF⁷.

Como se ha dicho, la gran heterogeneidad genética y clínica de los pacientes dificulta la correlación genotipo y fenotipo. Sin embargo, existe un mismo fenotipo celular, como la alta sensibilidad a los agentes inductores de enlaces cruzados, por lo que las aberraciones cromosómicas y sus frecuencias al hacer el estudio de fragilidad son similares en los pacientes con AF, esto sin correlacionarse con la clínica.

1.11 Antecedentes Directos

En la literatura se han hecho múltiples intentos para establecer una correlación genotipo-fenotipo para AF, sin embargo, son pocos los estudios los que se ha intentado hacer esta correlación con aberraciones cromosómicas. En el Laboratorio de citogenética del INP, centro de referencia en la república mexicana para la AF, se tienen resultados de estudios de fragilidad cromosómica de más de 30 años; gracias a la riqueza de estos datos podemos intentar llevar a cabo estudios que nos permitan observar el comportamiento de los resultados del daño cromosómico a lo largo del tiempo, establecer correlación genotipo-fenotipo y

hacer descripciones tanto de frecuencias de aberraciones cromosómicas como de tipos de ACs en una gran cohorte de pacientes.

En relación a esto, recientemente, el Dr. David Medina (2022) utilizando la información histórica de las aberraciones cromosómicas de los diagnósticos citogenéticos de AF del Laboratorio de Citogenética, hizo una descripción detallada de las aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas en sujetos sanos. En dicho trabajo se describió un rango amplio de aberraciones cromosómicas de 0 a 0.32 ab/cel para el reporte basal y de 0 a 0.44 ab/cel para la inducción por DEB en individuos sanos. También reportó que la variabilidad de frecuencia en el estado basal y en la condición inducida por DEB no se explica por la edad de los sujetos analizados, tampoco por las alteraciones en el agente inductor ni por la forma de revisión de los lectores de las muestras.²³

Esta información no está descrita en los pacientes con AF, por lo que es muy importante realizar una adecuada descripción de las aberraciones cromosómicas, determinar los intervalos de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidos con DEB y conocer si existe una correlación entre las aberraciones y el fenotipo de los pacientes.

Estos trabajos permiten intentar realizar correlaciones genotipo-fenotipo para el mejor entendimiento de la AF y su variabilidad clínica.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante muchos años, se ha tratado de establecer una correlación genotipo-fenotipo en la AF mediante el análisis de las mutaciones en los genes *FANC*, sin embargo, ha sido una tarea difícil debido a que la enfermedad es genética y clínicamente heterogénea y a que la información reportada es limitada en cuanto al número de casos. No obstante, es sumamente importante seguir investigando sobre posibles correlaciones porque serían fundamentales para tratar de comprender la evolución clínica de los pacientes e identificar posibles riesgos.

Un aspecto relevante a explorar es la posible correlación genotipo-fenotipo mediante las frecuencias de aberraciones espontáneas e inducidas en los pacientes positivos a AF. En nuestra experiencia, en el Laboratorio de Citogenética del INP, hemos encontrado una gran variabilidad en la respuesta citogenética a los mutágenos MMC o DEB, pero no se ha utilizado esta información para buscar si existe una correlación. Además, desconocemos si el tipo y frecuencia de cromosomas aberrantes es igual en todos los pacientes.

El Laboratorio de Citogenética del INP cuenta con 20 años de registros de resultados de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas con DEB y MMC en pacientes con sospecha de AF y controles negativos. A lo largo de estas dos décadas, ha habido varios donadores sanos y múltiples pacientes con sospecha de AF, por lo que se tiene documentada tanto su frecuencia de ACs espontáneas, como la respuesta cromosómica a DEB/MMC. Esta información es ideal para describir la respuesta citogenética a agentes que causan enlaces covalentes cruzados en pacientes positivos para AF, pacientes en quienes se sospechó el diagnóstico de AF pero no fueron positivos e individuos sanos. Las aberraciones cromosómicas patognomónicas de la AF son las aberraciones de tipo cromatídico y en especial la presencia de figuras radiales, sin embargo, se desconoce si existe una correlación entre el tipo de aberraciones y la condición clínica de los pacientes. Este análisis permitirá diseccionar el tipo de aberraciones cromosómicas y establecer una correlación genotipo-fenotipo en cada grupo de estudio. También contribuirá a generar conocimiento básico y clínico de la AF.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una correlación genotipo- fenotipo al analizar el tipo y número de aberraciones cromosómicas en los pacientes con sospecha de anemia de Fanconi?

4. JUSTIFICACIÓN

Los datos de las aberraciones cromosómicas de los individuos en quienes se ha hecho estudio de fragilidad cromosómica en el Laboratorio de Citogenética están disponibles en registros históricos del laboratorio desde 1998 y se cuenta con las hojas de lectura de los casos para extraer los datos, clasificarlos y analizarlos. Esto permitirá analizar sistemáticamente la frecuencia, tipo de aberraciones y la variabilidad de respuesta interindividual e intraindividual de los estudios realizados en este laboratorio.

El diagnóstico de anemia de Fanconi se realiza por el estudio de fragilidad cromosómica en el que se compara la frecuencia total de aberraciones cromosómicas en un individuo con sospecha clínica de AF, un control negativo (sujeto sano) y un control positivo (Línea linfoblastoide proveniente de un paciente positivo a AF). Cuando la frecuencia de AC inducida por DEB/MMC es 10x mayor a la frecuencia observada en el control negativo y tiene una respuesta similar al control positivo, se diagnostica AF en el paciente. Esta prueba de fragilidad cromosómica es estándar de oro de la enfermedad. Sin embargo, se desconoce la relación entre el tipo de aberraciones y el fenotipo clínico de los pacientes.

El estudio de las aberraciones cromosómicas en individuos con sospecha clínica de AF nos ayudará a determinar si existe alguna correlación entre el tipo de alteraciones cromosómicas y el diagnóstico de anemia de Fanconi.

5. OBJETIVO GENERAL

Conocer la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas reportadas en un grupo pacientes con anemia de Fanconi diagnosticados en el Laboratorio de Citogenética del INP.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Describir la respuesta citogenética basal e inducida por agentes inductores de enlaces covalentes cruzados en pacientes con anemia de Fanconi.
2. Describir la respuesta citogenética basal e inducida por agentes inductores de enlaces covalentes cruzados en pacientes en quienes se tuvo sospecha de diagnóstico de anemia de Fanconi pero fueron negativos.
3. Describir el fenotipo clínico de los pacientes positivos a anemia de Fanconi.
4. Correlacionar la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas con el fenotipo clínico de los pacientes con anemia de Fanconi.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Clasificación de la investigación: descriptivo, retrospectivo y observacional.

7.2 Universo del estudio.

La población de estudio estuvo formada por los datos y registros históricos de los resultados del estudio de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas de pacientes con diagnóstico de sospecha de anemia de Fanconi que fueron negativos, de pacientes positivos a anemia de Fanconi y de los individuos sanos que se utilizaron como controles negativos, realizados de enero del 1998 a julio del 2021 en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría.

Se incluyeron todos los estudios que tenían hojas de registro de aberraciones cromosómicas completas y en los que los resultados de las frecuencias de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas proporcionaron un resultado de anemia de Fanconi positivo o negativo; se eliminaron los datos incongruentes o no concluyentes.

7.3 Variables

Se utilizaron las siguientes **variables cualitativas**: género, edad, dato clínico de sospecha, tipo de muestra, tipo de agente inductor de daño, talla, perímetro cefálico, malformaciones congénitas, tipos de malformaciones congénitas.

Variables cuantitativas: Número de células estudiadas, número de cromosomas, número de rupturas cromosómicas, rupturas cromatídicas, fragmentos céntricos y acéntricos, anillos, cromosomas dicéntricos, figuras trirradiales y tetrarradiales, frecuencia de ACs espontáneas e inducidas con DEB, porcentaje de células aberrantes.

7.4 Prueba de fragilidad cromosómica para el diagnóstico de anemia de Fanconi.

De manera retrospectiva y ante la sospecha clínica de AF y se utilizó la hipersensibilidad de las células AF a agentes inductores de enlaces cruzados como diepoxibutano (DEB) o mitomicina-C (MMC) para diagnosticar la enfermedad.⁷

La prueba de fragilidad cromosómica se realizó en muestras de sangre periférica, médula ósea o fibroblastos de piel. Las muestras de sangre periférica y médula ósea se cultivaron en medio RPMI (Gibco, BRL, Grand Island, NY) suplementado con fitohemaglutinina y a la mitad de los cultivos se les adicionó 0.1µg/ mL de diepoxibutano (DEB) o 40 ng/mL de mitomicina-C (MMC) para inducir el daño cromosómico; todos los cultivos se incubaron a 37°C durante 72 horas. Para cosechar las células en metafase se agregó colchicina durante dos horas, se trataron con solución hipotónica y se fijaron con solución Carnoy (Metanol:Ácido acético, 3:1, Merck, Germany). Cuando se utilizaron fibroblastos para hacer el diagnóstico citogenético, también se elaboraron dos cultivos celulares, uno sin tratamiento y otro tratado con 0.01 µg/ mL de DEB, se incubaron durante 72 horas y se cosecharon de manera similar a los cultivos de sangre y médula ósea. Simultáneamente, se sembraron cultivos con y sin tratamiento de un donador sano que se utilizó como el control negativo de la AF y de una línea celular con

mutación en el gen FANCA que se usó como el control positivo de la AF (sólo a partir del 2012). De todos los cultivos, control negativo, control positivo y del paciente con sospecha de AF se elaboraron laminillas con el contenido celular de cada tipo de cultivo, de la manera convencional y se tiñeron con Giemsa y Wright. Por cada tipo de cultivo se analizaron 25 metafases y se cuantificaron las rupturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos céntricos y acéntricos, dicéntricos, figuras radiales y otras alteraciones¹⁰ (Fig. 2), las cuales se registraron en la “Hoja de lectura de aberraciones cromosómicas” y se obtuvo la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas por DEB, MMC o ambos. Los pacientes son positivos a AF al presentar una frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) con DEB o MMC 10 veces mayor a la observada en el cultivo sin tratamiento y en el control negativo y una respuesta similar a la del control positivo; adicionalmente, los pacientes positivos presentan una elevada frecuencia rupturas cromatídicas y figuras radiales en los cultivos tratados con DEB o MMC que están ausentes tanto en los pacientes negativos como en los controles negativos. En el INP, de 1998 al 2011 los diagnósticos de fragilidad cromosómica se realizaron en paralelo con control negativo y a partir del 2012 se utilizaron tanto controles negativos como positivos.

7.5 Análisis de datos

Para describir la respuesta citogenética de los pacientes se diseñó una base de datos en Excel con las frecuencias y tipo de aberraciones cromosómicas (rupturas cromatídicas, rupturas cromosómicas, fragmentos céntricos y acéntricos, anillos, dicéntricos y figuras radiales) espontáneas e inducidas, el porcentaje de células aberrantes y datos clínicos de sospecha de anemia de Fanconi referidos por el médico solicitante del estudio.

Debido a que este estudio es retrospectivo, para establecer la correlación del fenotipo clínico de los pacientes positivos con las ACs, se utilizó una base de

“Datos clínicos de pacientes con anemia de Fanconi” elaborada por la M. en C. Gilda Garza que se encuentra en el Laboratorio de Citogenética.

Con el análisis de las frecuencias de aberraciones cromosómicas y los criterios ya mencionados para determinar el diagnóstico de AF, los estudios de toda la base de datos se agruparon en 3 categorías: a) Pacientes negativos, b) Pacientes positivos y Pacientes con posible mosaico celular. Se obtuvo el porcentaje de células aberrantes (células con una o más aberraciones) en cada condición y en cada grupo. Tanto las frecuencias de ACs como los porcentajes de células aberrantes se compararon entre los tres grupos y con los datos de células normales reportados por Medina²³.

Para correlacionar el fenotipo clínico con las ACs de los pacientes positivos, se analizaron y compararon los datos hematológicos y clínicos presentes en la base de datos.

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de frecuencias de ACs pacientes negativos y positivos a AF se organizaron con Microsoft Excel (Windows, Versión 16.11.1) y se analizaron con los paquetes SPSS Statistics V.20.

Ya que las variables no presentaron distribución Gaussiana, se compararon las variables con la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney para comparación de medias entre los grupos. Se consideraron diferencias significativas cuando las pruebas demuestran un $p < 0.05$ con un Intervalo de Confianza del 95%.

El análisis estadístico se realizó en base a los objetivos del proyecto. Para comparar las frecuencias ACs basales e inducidas en pacientes AF positivos y AF negativos. El tamaño de la muestra fue de 742 individuos solo tratados con DEB, de los cuales 92 tuvieron resultado positivo, 642 con resultado negativo y 8 posibles mosaico AF.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta revisión retrospectiva, al analizar la base de datos y las libretas de registro del Laboratorio de Citogenética se identificaron 1015 pacientes que fueron diagnosticados por medio de la prueba citogenética de fragilidad cromosómica, en el período de enero de 1998 a julio de 2021. Estos estudios se hicieron utilizando uno o dos agentes clastogénicos: DEB, MMC y DEB o solo MMC; ambos compuestos son buenos inductores de enlaces cruzados en el DNA y en el diagnóstico de AF presentan una gran sensibilidad, estabilidad y especificidad.

De 1998 al 2015, encontramos que los diagnósticos se realizaron utilizando MMC y/o DEB y a partir del 2016 hasta la fecha se utilizó exclusivamente DEB como agente inductor de daño al DNA debido a que la MMC genera una mayor cantidad de daño y es más citotóxica, por lo que los cultivos tienen una menor proliferación.

En el periodo de 1998 al 2011, los pacientes se diagnosticaron como positivos cuando la frecuencia de ACs inducida por el DEB o la MMC era significativamente mayor a la observada en las células de individuos sanos que funcionaban como el control negativo de la enfermedad. Esta diferencia en la respuesta se debe a que las células con AF tienen deficiencia en el sistema de reparación del DNA por presentar una variante patogénica en algunos de los genes *FANC* que conduce a una incapacidad de reparar las lesiones inducidas por el DEB o la MMC, en contraste, las células normales son capaces de reparar eficientemente todas las lesiones, por lo que la frecuencia de ACs inducida es baja.

Los resultados de los 1015 estudios citogenéticos fueron los siguientes: a) 873 pacientes negativos: 642 con DEB, 221 con MMC y DEB, y 10 con MMC b) 131 pacientes positivos: 92 con DEB, 28 MMC y DEB y 11 con MMC c) 11 posibles mosaico: 8 con DEB y 3 con MMC y DEB. Sin embargo, no fue posible incluir el análisis de aberraciones cromosómicas de todos los casos, porque en el archivo del Laboratorio no se encontraron las hojas de lectura de ACs de la mayoría de los tratados con DEB y MMC o solo MMC.

A partir del 2012, con la finalidad de obtener información sobre la eficiencia de los agentes inductores de enlaces cruzados (MMC o DEB) y evitar resultados falsos negativos, se incluyeron cultivos de una línea celular linfoblastoide de un paciente positivo a AF con variante patogénica en el gen *FANCA* que funciona como un control positivo de la enfermedad. La correcta detección citogenética de la anemia de Fanconi es sumamente importante, por lo que desde el 2012, en la mayoría de los estudios de los pacientes con sospecha de AF se realizan de manera paralela con cultivos de un control sano negativo y un positivo de la AF. Un paciente con diagnóstico de AF debe tener una frecuencia de ACs inducida 10 veces mayor que su frecuencia de ACs espontánea y que la del control negativo y una respuesta a los mutágenos (MMC o DEB) similar a la del control positivo. Esta prueba de fragilidad cromosómica en AF es el estándar de oro porque a diferencia del fenotipo clínico, el fenotipo celular es extremadamente constante sin importar el gen *FANC* mutado.

Por otra parte, en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se obtuvieron las frecuencias promedio de ACs de todos los individuos sanos o controles negativos que se utilizaron para establecer el diagnóstico de todos los pacientes de la cohorte utilizada en este trabajo. Las frecuencias promedio estrictas de ACs espontáneas reportadas fue de 0.02 ab/cél con un intervalo de 0 a 0.08 ab/cél e inducidas de 0.04 con un rango de 0 a 0.16 ab/cél²³. En el presente trabajo, se utilizaron estos valores para establecer las comparaciones con las frecuencias de ACs de los pacientes positivos, negativos y posible mosaico AF.

Con la finalidad de tener una población más homogénea que permitiera hacer una adecuada descripción de la respuesta citogenética basal e inducida en los pacientes positivos o negativos para AF, en este trabajo solo se incluyeron los resultados de los estudios realizados con DEB. Así mismo, al analizar las frecuencias de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas, se detectaron algunos pacientes con datos discordantes o no concluyentes que se

eliminaron de este estudio. Finalmente, la cohorte de pacientes estuvo conformada por 742.

De los 742 pacientes reportados 642 fueron diagnosticados como negativos (86.5%), 92 como positivos (12.4%) y 8 identificados como posible mosaico celular AF (1.1%) (Tabla 1) debido a que mostraron una frecuencia de ACs intermedia que solo se incrementaba de 2.2 a 6 veces la frecuencia de daño inducido con DEB (Tabla 9).

El estudio de fragilidad cromosómica puede realizarse en diferentes tejidos, en la cohorte de este trabajo se encontró que el tejido más utilizado fue la sangre periférica (76%), seguido de médula ósea (15.2%), piel (0.7%), cordón umbilical (0.1%) y en el 7.9% no fue especificado el tipo de muestra hematológica.

8.1 Descripción general de los pacientes de toda la población de estudio

De toda la población de estudio (n=742), el 44.3% fueron pacientes femeninos, 58.9% masculinos y en el 1.1% no se indicó el sexo; la edad al diagnóstico fue variable, desde 5 días hasta 27 años (Tabla 1). En relación a los datos clínicos de sospecha de AF indicados por el médico tratante se encontró una enorme falta de información, ya que la mayoría solo indicaban la existencia de alteración hematológica como anemia aplásica o trombocitopenia, presencia de alguna malformación o simplemente "sospecha de anemia de Fanconi" sin especificar la alteración clínica.

Es probable que la falta de información se deba a que los médicos tratantes que solicitaron el estudio de fragilidad cromosómica generalmente fueron hematólogos que no están entrenados en el reconocimiento de malformaciones congénitas, por lo que la mayoría de los pacientes los enviaron con el dato clínico de "sospecha de anemia de Fanconi" porque presentaban alguna alteración hematológica que no fue plasmada en la solicitud del estudio. Además, la mayoría de las muestras de los pacientes provenían de instituciones externas al INP por lo que no se llegó a conocer a los pacientes.

Por otro lado, es importante enfatizar que la AF es una enfermedad con gran variabilidad clínica, en general se caracteriza por presentar falla medular, malformaciones congénitas tales como alteración del eje radial, renales, cardíacas, oculares, genitales y predisposición a cáncer, pero no existe un cuadro clínico clásico que permita identificar a los pacientes ^{6,9,15}. Al nacimiento, en la infancia o en la etapa adulta, el diagnóstico se dificulta cuando los pacientes no presentan deficiencia hematológica ni alguna malformación congénita relacionada a la AF, por lo que en la mayoría de las ocasiones el diagnóstico se realiza hasta que se presenta falla medular⁷. Esto se reflejó en esta cohorte de estudio, ya que la edad al diagnóstico fue extremadamente variable, desde recién nacidos hasta la etapa adulta.

Por todo lo anterior, el dato clínico de sospecha no se especificó en el 58.9% de los pacientes, en el 17.7% fue la presencia de alguna malformación, en el 14.3% una alteración hematológica, en el 6.6% tener un hermano con AF, en el 2% presentar una malformación congénita y una anomalía hematológica y en el 0.5% la presencia de cáncer (Fig. 3). De acuerdo con Auerbach⁶, las malformaciones congénitas se presentan hasta en 1/3 de los pacientes con AF, pero en esta población de estudio su presencia fue menor debido a que nuestra población tiene un gran sesgo.

Tabla 1. Datos generales de 742 los pacientes positivos, negativos y posible mosaico diagnosticados con DEB

	AF positivo	AF negativo	Posible AF Mosaico
Total	92 (12.4%)	642 (86.5%)	8 (1.1%)
Sexo	F - 47.8% M - 48.9% NE - 3.3%	F - 43.8% M - 55.5% NE - 0.7%	F - 50% M -50%
Rango de Edad	3 m - 27 a	5d - 27 a	11 a

F=Femenino, M=Masculino, d=días m=meses, a=años, NE=no especificado

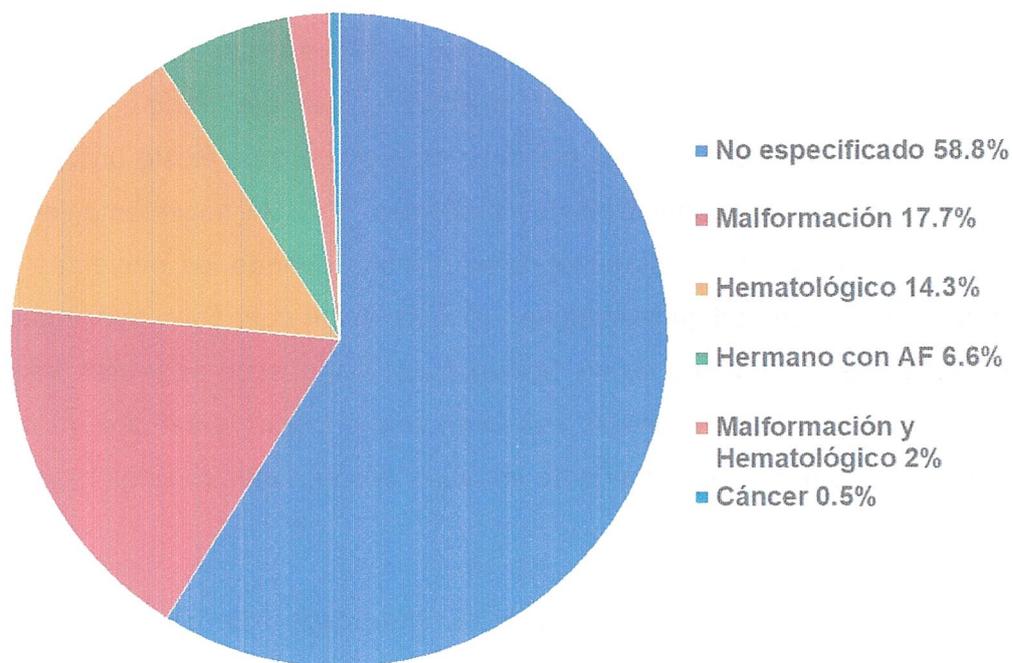


Figura 3. Datos clínicos de sospecha de anemia de Fanconi, de la población general.

8.2 Pacientes positivos a Anemia de Fanconi

De los 742 estudios de fragilidad cromosómica recolectados, se identificaron 92 pacientes positivos a AF que representan el 12.4%, todos mostraron la hipersensibilidad al DEB característica de las células con anemia de Fanconi y las frecuencias de ACs fueron significativamente mayores a las observadas en las células de los individuos sanos o controles negativos²³ y similares a las de los positivos que se cultivan de manera paralela en los casos en los que se utilizó.

El 47.8% de los pacientes fueron de sexo femenino, el 48.9% masculino y en el 3.3% no se especificó el género. El rango de edad al diagnóstico fue muy variable, de 3 meses hasta 27 años (Tabla 1). A nivel internacional el diagnóstico se realiza en promedio a la edad de 7-9 años, estos resultados indican que es probable que algunos pacientes de esta cohorte no presentaron falla medular en edad infantil o

adolescente o alguna malformación congénita que sugiriera AF, por lo que el estudio se realizó hasta que tuvieron alteraciones hematológicas.

En general, los pacientes de esta cohorte presentaron diversas malformaciones congénitas, talla baja y alteraciones hematológicas. El dato clínico de sospecha más frecuente fue la alteración hematológica en el 20% de los casos, presencia de alguna malformación congénita como alteración del eje radial, renal, vertebral, cardíaca en el 9.23%, la existencia de malformación y manifestación hematológica en el 8.46% y tener un hermano con AF en el 1.54% (Fig.4); en el 60.77% no se indicaron datos clínicos de sospecha, solo se mencionaba que se trataba de un paciente "probable AF" o "sospecha de AF" sin la descripción de alguna alteración clínica o congénita. En este grupo de pacientes, las malformaciones congénitas se presentaron solo en el 9.23 % de los pacientes, lo cual difiere con lo reportado por Auerbach y otros autores que han establecido que las malformaciones congénitas se presentan hasta en 1/3 de los pacientes con AF²⁴. Sin embargo, algunos pacientes presentaron una o dos alteraciones del fenotipo VACTERL-H. Un aspecto importante fue que la mayoría de los pacientes de esta cohorte eran externos al INP y enviados por hematólogos, por lo que no tenían una búsqueda intencionada de malformaciones congénitas que generalmente son identificadas por los genetistas y están asociadas a la AF.

La clínica de los pacientes positivos AF se discute a detalle en el apartado de "Descripción Clínica".

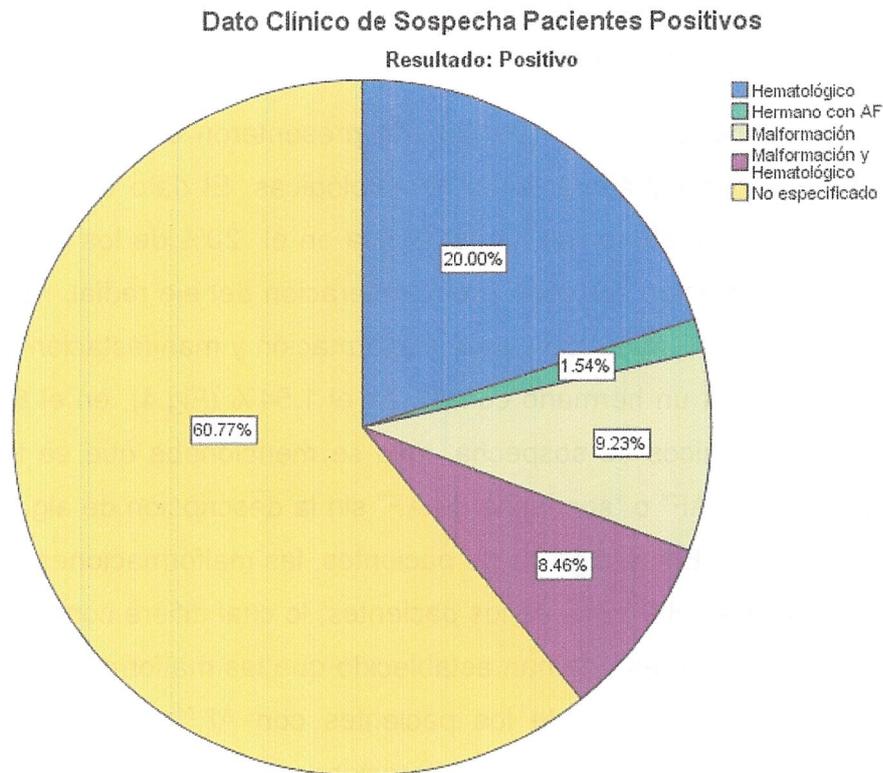


Figura 4. Datos clínicos de sospecha en pacientes con AF.

Frecuencia de aberraciones cromosómicas

Las frecuencias promedio de ACs espontáneas o basales en los 92 pacientes positivos a AF detectados con DEB fue de 0.18 ± 0.17 ab/cél con un intervalo de 0 a 0.96 ab/cel e inducida de 2.6 ± 2.1 ab/cél con un rango 0.64 a 13.16 ab/cél (Tabla 2). Esta respuesta celular de hipersensibilidad ha sido sumamente útil en el diagnóstico de la enfermedad y ha sido establecida desde hace muchos años por varios autores^{15,16,17,18,19,20}.

De manera importante, tanto en promedio como de manera individual, todos los pacientes mostraron hipersensibilidad al DEB que permitió proporcionar el resultado compatible con AF. La frecuencias de aberraciones espontáneas e inducidas más frecuentes en los pacientes positivos fueron 0.08 ab/cél y 1.44 ab/cél, respectivamente (Anexo 1).

Debido a la variabilidad citogenética encontrada en esta cohorte, las frecuencias de ACs espontáneas e inducidas no tuvieron una distribución normal, pero sí presentaron una diferencia estadísticamente, con una $p = 2.2^{-16}$, prueba Wilcoxon-Mann-Whitney (Tabla 2). Esta elevada frecuencia de daño cromosómico espontáneo e inducido también es significativamente distinta a la observada en las células normales y refleja la ineficiencia de las células AF para reparar el daño al DNA inducido por el DEB ($p < 0.05$).

Tabla 2. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en pacientes positivos a AF e individuos normales

	Frecuencia AC espontáneas (ab/cél)	Frecuencia AC inducidas con DEB (ab/cél)
Pacientes positivos		
Promedio/ DE	0.18 ± 0.17	2.6* ^± 2.1
Rango	0 - 0.96	0.64 - 13.16
Individuos sanos		
Promedio/ DE	0.02°	0.04°
Rango	0 - 0.08°	0 - 0.16°

°Datos tomados de Medina, 2022

DE= Desviación estándar

*AC espontáneas vs inducidas, $p = 2.2^{-16}$

^ AC inducidas positivos vs sanos $p < 0.05$

La gran variabilidad citogenética fue evidente de manera espontánea e inducida, el daño basal más frecuente fue de 0.08 ab/cél pero había pacientes con 0.0 ab/ cél y cuatro pacientes tuvieron frecuencias tan elevadas como 0.64, 0.68, 0.84 y 0.96 ab/cél; así mismo, de manera inducida había algunos pacientes con frecuencia menores a 1 y frecuencias mayores a 10, por ejemplo, el paciente 108-16 presentó 0.0 ACs espontáneas y 0.72 inducidas mientras que el paciente 612-10 tuvo 0.96 aberraciones espontáneas y 13.16 inducidas (Anexo 1). Por un lado, las frecuencias espontáneas elevadas podrían ser características celulares propias de

cada paciente o también podrían deberse a que los pacientes hubieran estado en contacto con algún agente exógeno que dañe al DNA como los solventes o el humo del cigarro a los que ellos son muy sensibles. Por otro lado, también es evidente la gran variabilidad en el grado de hipersensibilidad de los pacientes positivos al DEB, si bien los 92 pacientes incrementaron su frecuencia de AC de manera significativa con respecto a su basal, todos lo hicieron en una proporción diferente, el incremento de ACs fue desde 4X hasta 97.5X (Anexo 1).

En general, las células normales cuando contienen daño en el DNA, arrestan su ciclo celular y reparan las lesiones, en contraste, las células AF con un sistema de reparación defectuoso detienen el ciclo celular pero no reparan eficientemente, utilizando sistemas de reparación alternos como la reparación por recombinación no homóloga que tratan de unir los segmentos cromosómicos rotos, generando las aberraciones cromosómicas. Aunado a esto, es posible que la variabilidad en la frecuencia de ACs se deba de manera secundaria a la influencia de otros factores endógenos como los radicales libres del oxígeno a los que las células AF son sensibles. Al respecto, Joenje et al ²⁵, demostraron que las células AF presentan una sensibilidad anormal a la tensión de oxígeno, espontáneamente la frecuencia de ACs aumentó drásticamente con la tensión de oxígeno *in vitro* y cuando las células se dañaron con MMC y se crecieron en presencia de presiones de oxígeno elevadas hubo un incremento significativo de ACs²⁶. Los radicales libres del metabolismo normal del oxígeno como el superóxido (O⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) e hidroxilos (OH⁻) pueden contribuir a la producción de ACs por actuar sobre la cromatina, causando lipoperoxidación cuyos productos pueden interactuar con cromatina o bien interfiriendo con las enzimas de reparación. Esta sensibilidad celular al oxígeno es un defecto secundario más que podría contribuir a generar más daño cromosómico y si la condición o susceptibilidad de cada paciente es diferente, podría generar la variabilidad en la frecuencia de ACs inducida por DEB en nuestra cohorte de estudio. Adicionalmente existen otros factores exógenos provenientes de la exposición ambiental, ocupacional o los generados por hábitos personales que pueden variar en los pacientes con AF.

A pesar de que en algunos pacientes no se cumplió el criterio de un incremento 10X de ACs inducidas implementado en nuestro laboratorio, en todos los casos siempre había células con figuras radiales y múltiples rupturas cromatídicas que se originan en fase S y que son las aberraciones características de la AF. De los 92 casos positivos 24 pacientes presentaron un aumento de ACs inducidas menor a 10X la frecuencia de ACs basal, por ejemplo, los casos 667-18 y 242-15 mostraron un incremento de 5.1X y 7.5X respectivamente, sin embargo todos tenían un elevado número de ACs de tipo cromatídico. Además, recientemente se corroboró su positividad a AF al buscar el fenotipo molecular mediante genotipificación, el caso 667-18 presentó una variante patogénica en *FANCE* y el 242-15 en *FANCA* (Comunicación personal, Publicación en preparación). Otros 2 casos de los 24 con incrementos menores a 10X, también fueron genotipificados, el 83-14 y 355-15 presentaron una variante patogénica en *FANCA* (Comunicación personal, Publicación en preparación) (Tabla 3). Al comparar las frecuencias de ACs de estos cuatro casos con el gen mutado, no encontramos diferencias en las respuesta celular de los pacientes, las frecuencias inducidas fueron menores a 2 y fluctuaron entre 1.2 y 1.92 y no existió correlación con el gen con variante patogénica, la respuesta al DEB del caso 83-14 con variante patogénica en *FANCA* es similar a la del caso 667-18 con variante patogénica en *FANCE*. Tampoco hubo correlación con el porcentaje de células aberrantes ni con el tipo de ACs.

Tabla 3. Pacientes con incremento de AC menores al 10X la frecuencia espontánea						
	Frecuencia de AC		Incremento AC	% de células aberrantes		Gen con VP
	Espontáneas	DEB		Espontáneas	DEB	
83-14	0.2	1.56*	7.8	12	52	<i>FANCA</i>
242-15	0.16	1.2*	7.5	12	56	<i>FANCA</i>
335-15	0.2	1.96*	9.6	16	76	<i>FANCA</i>
667-18	0.28	1.44*	5.1	16	80	<i>FANCE</i>

VP=Variante patogénica

*AC espontáneas vs inducidas, $p < 0.0$

Los resultados de este trabajo indicaron que el incremento de 10X implementado en nuestro laboratorio no se cumplió en todos los casos positivos (Anexo1), debido a que algunos casos eran muy viejos y en ese tiempo solo se evaluaba un incremento significativo de la frecuencia de ACs y la presencia de figuras radiales.

La respuesta de hipersensibilidad de las células AF contrasta mucho con la de las células de los individuos sanos, cuando las células no tienen tratamiento, en promedio presentaron 0.22 ab/cél mientras que cuando se dañaron con DEB mostraron una frecuencia promedio de 2.5 ab/cél, que representa un incremento de 10X su frecuencia basal y contrasta con el 0.02 ab/cél espontáneas y 0.04 ab/cél inducidas que presentan los individuos sanos²³ (Tabla 2). Es importante señalar que las células de los individuos sanos, en general tienen poco daño cromosómico y ausencia de figuras radiales que son la aberración patognomónica de la AF.

Esta respuesta celular y la variabilidad citogenética de esta cohorte, está de acuerdo con los reportado por otros autores en pacientes mexicanos, Esmer y colaboradores¹⁵ en un pequeño grupo de pacientes AF encontraron una frecuencia basal promedio de 0.30 ab/cél con un intervalo de 0.04 ab/cel a 1.6 ab/cel y frecuencia inducida promedio de 3.39 ab/cél y un rango de 1.32 ab/cel a 5.86 ab/cel¹⁵. También existe similitud con los reportes en pacientes españoles y estadounidenses^{6,27}.

Este análisis ha sido sumamente importante porque nos permitió conocer la gran variabilidad citogenética que existe en la respuesta de las células de los pacientes con AF al DEB; las frecuencias de ACs varían mucho de un paciente a otro, mientras que uno de ellos puede tener una frecuencia de ACs inducida de 0.64 otro puede tener una frecuencia de 13.16 (Anexo 1).

Células aberrantes

Al analizar las hojas de lectura de las ACs, fue notorio que de manera inducida había un mayor número de células que tenían más de una aberración y se consideraron como células aberrantes. Como se puede observar en la tabla 4 el

porcentaje promedio de células aberrantes inducidas con DEB (65.7%) es significativamente mayor al observado de forma espontánea (14.1%) ($p < 0.05$). De manera similar a lo observado con las frecuencias de aberraciones cromosómicas, existe variabilidad en el porcentaje de células aberrantes, tanto de manera espontánea como inducida, pueden existir células sin aberraciones, pero cuando los cultivos se dañan con DEB pueden llegar a tener hasta el 100% de células aberrantes, lo cual difiere del 60% alcanzado en los cultivos sin tratamiento. Además, las células aberrantes en los cultivos sin tratamiento generalmente presentaron de 1 a 2 aberraciones mientras que en los cultivos tratados con DEB de 1 hasta 10 o más aberraciones por célula; esta respuesta también refleja la hipersensibilidad al DEB y la falta de reparación eficiente de las lesiones en el DNA. Este tipo de células que contienen muchas aberraciones, es muy probable que sean incapaces de entrar a otro ciclo celular y proliferar por lo que quizá mueran por apoptosis.

El porcentaje de células aberrantes espontáneo e inducido descrito en los pacientes positivos a AF de este trabajo son similares a los reportados por Castela y colaboradores²⁷ quienes encontraron un porcentaje promedio 15.24% con un intervalo de 0 a 64% e inducido de 68.1% con un rango de 10 a 100%.

Tabla 4. Células aberrantes en pacientes AF positivos		
	Células aberrantes espontáneas (%)	Células aberrantes inducidas con DEB (%)
Promedio/DE	14.1 ± 11.4	65.7* ± 19.5
Rango	0 - 60	4 - 100
Moda	8	76

DE= Desviación estándar

*AC espontáneas vs inducidas, $p = 2.2 \cdot 10^{-16}$

Tipos de aberraciones cromosómicas

En los 92 pacientes positivos a AF, se cuantificaron los siguientes tipos de aberraciones: rupturas cromatídicas y cromosómicas o isocromatídicas, fragmentos céntricos y acéntricos, anillos, dicéntricos y figuras radiales.

En general, con DEB los pacientes presentaron todos los tipos de ACs y fueron mayores a las que se encontraron en los cultivos sin tratamiento (Gráfica 1, tabla 5). Como se puede observar en la gráfica 1, las aberraciones inducidas con DEB más frecuentes fueron las rupturas cromatídicas y las figuras radiales que contrastan con las encontradas espontáneamente.

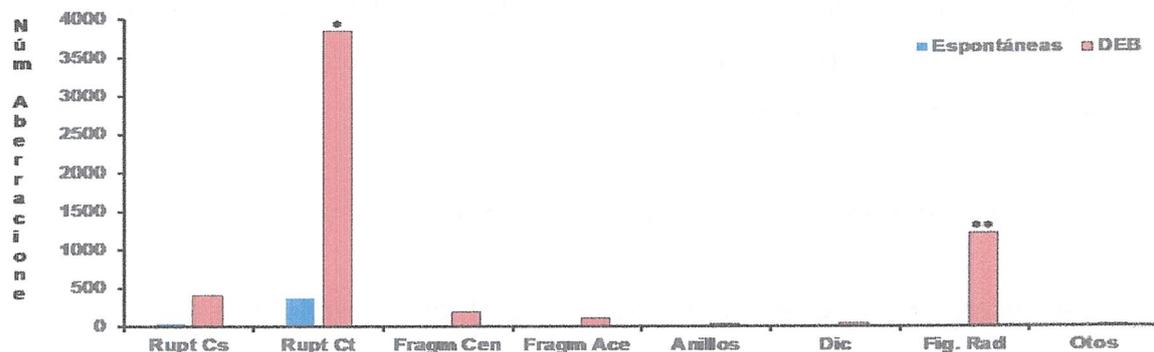
Espontáneamente la aberración cromosómica más frecuente fue de tipo cromatídico y corresponde a las rupturas cromatídicas que se caracterizan por afectar solo una cromátida del cromosoma y se evidencia como una discontinuidad de la cromátida (Tabla 5, Gráfica 1); sin embargo, la frecuencia fue baja, en los pacientes se encontraron en promedio 4.15 rupturas con un intervalo de 0 a 44 por individuo. Los otros tipos de aberraciones se presentaron en una frecuencia muy baja y algunos como los dicéntricos estuvieron ausentes.

De manera inducida, también se encontraron aberraciones de tipo cromatídico, siendo las más frecuentes tanto las rupturas cromatídicas como rearrreglos complejos conocidos como figuras de intercambio o figuras radiales. El promedio de rupturas cromatídicas basales por individuo fue de 4.15 y se elevó significativamente a 41.9 con DEB ($p < 0.001$). Las figuras radiales también se incrementaron significativamente, de 0.2 a 13.4 figuras por individuo, principalmente se encontraron trirradios y tetraradios, y en algunos casos polirradios. Este tipo de aberraciones son muy características en AF y en algunas ocasiones, cuando el incremento de ACs no es mayor a 10X, su presencia contribuye a dar un diagnóstico positivo (Tabla 5, Fig. 2)

Estas figuras radiales pueden ser de tipo trirradial o tetraradial y se forman entre cromosomas no homólogos, por ejemplo, un tetrarradio cerrado se forman cuando existen cuatro extremos de DNA disponibles o rotos de las cromátidas no hermanas que se unen a través de un sistema de reparación del DNA propenso a errores (Fig. 2E): pero si solo se unen dos extremos de las cromátidas no hermanas, se origina una figura tetraradial abierta con una ruptura cromatídica (Fig. 2-F). Una figura trirradial se forma cuando existen tres rupturas mientras que las figuras polirradiales requieren de varias rupturas para su formación ^{28,10}.

Tabla 5. Tipos de aberraciones cromosómicas en 92 pacientes positivos a AF		
	Promedio del número de ACs Espontáneas	Promedio del número de ACs inducidas con DEB
Rupturas cromosómicas	0.47 (0-5)	4.5*(0-28)
Rupturas cromatídicas	4.15 (0-44)	41.9* (0-278)
Fragmentos céntricos	0.2 (0-5)	2(0-12)
Fragmentos acéntricos	0.2 (0-3)	1.2 (0-16)
Anillos	0.02 (0-1)	0.32 (0-5)
Dicéntricos	0	0.5 (0-5)
Figuras radiales	0.2 (0-2)	13.4* (0-45)

*ACs espontáneas vs inducidas, $p < 0.05$, ()=intervalo de aberraciones



Gráfica 1. Tipos de aberraciones cromosómicas totales espontáneas e inducidas en 92 pacientes positivos a AF. Las células de los pacientes positivos presentaron todos los tipos de ACs cuando se trataron con DEB a diferencia de los observados en las células sin tratamiento. Las rupturas cromatídicas y las figuras radiales fueron el tipo de aberración más frecuente. Diferencia significativa espontáneas vs inducidas con DEB: * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

Las aberraciones menos frecuentemente encontradas fueron las de tipo cromosómico como las rupturas cromosómicas, los fragmentos, anillos y dicéntricos (Gráfica 1). Estos hallazgos coinciden con lo reportado por otros autores, en los que se afirma que las aberraciones más comunes en la AF son las de tipo cromatídico y que la presencia de figuras radiales es una característica citogenética distintiva de la AF^{10,24}.

Las ACs de tipo cromatídico ocurren de manera post replicativa, después de la fase S del ciclo celular y también pueden ser consecuencia del estrés replicativo. El DEB es un agente S-dependiente que produce daño en el DNA y estrés replicativo y en las células de AF induce la formación de daño cromatídico. En contraste a las células AF, las células normales pueden hacer frente a todo este tipo de lesiones debido a que todos sus sistemas de reparación son completamente funcionales.

Todas estas alteraciones cromosómicas se generan debido a que la vía FA/BRCA que se encarga de reparar las lesiones de doble hebra esta defectuosa y las proteínas de las vías de reparación por recombinación homóloga están inactivas, por lo que es posible que las células utilicen otro sistema de reparación como la vía de reparación no homóloga que se lleva a cabo en cualquier etapa del ciclo celular o por la reparación de unión de extremos por microhomología MMEJ durante la fase S y G2 que unen segmentos ineficientemente y producen un aumento de la frecuencia de las figuras radiales²⁹.

8.3 Pacientes negativos a Anemia de Fanconi

Se identificaron 642 pacientes negativos para AF que corresponde al 86.5% de la población total estudiada, 43.8% fueron femeninos, 55.5% masculinos y en el 0.7% no se especificó el género. La edad varió desde 5 meses hasta 35 años.

El dato clínico de sospecha no se especificó en 58.4% de los pacientes, en el 19.5% de los casos se trataron de datos clínicos de malformación y en 12.9% de los casos datos hematológicos. Otros datos clínicos de sospecha fueron cáncer (0.6%), hermano con AF (7.5%) y malformación más dato hematológico (1.1%) (Fig. 5)

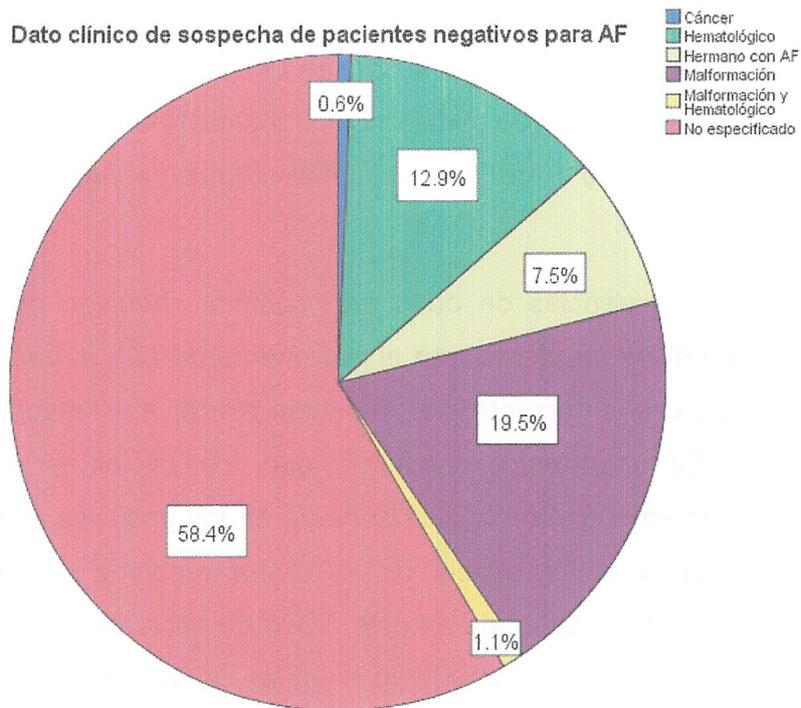


Figura 5. Dato clínico de sospecha de pacientes negativos AF

Frecuencia de aberraciones cromosómicas

A diferencia de los pacientes positivos AF, los detectados como negativos mostraron una ausencia de hipersensibilidad al agente inductor de daño (DEB) que se evidenció por una baja frecuencia de ACs. Como se observa en la tabla 6 las frecuencias promedio de ACs espontáneas fue 0.03 ± 0.05 ab/cél e inducidas con DEB de 0.06 ± 0.07 y son similares a las observadas en los controles sanos reportados por Medina (2022) (Tabla 6). Estas bajas frecuencias de ACs son significativamente menores a las observadas en los pacientes positivos ($p < 0.01$) (Tabla 2 y 6). Esta población fue un poco más homogénea en la respuesta al mutágeno que la población positiva a AF ya que los intervalos de daño fluctuaron de manera espontánea de 0 - 0.48 ab/cél e inducida con DEB de 0 - 0.8 ab/cél y una moda de 0 y 0.04 respectivamente. Cabe señalar que los intervalos de ACs se ampliaron debido hubo dos casos con valores extremos de 0.48 y 0.8 ab/cél.

La baja frecuencia de ACs demuestra claramente que las células de estos pacientes negativos a AF no son hipersensibles al DEB probablemente debido a que no presentan variante patogénica en algunos de los genes *FANC* y por consiguiente tienen una vía FA/BRCA funcional, capaz de reparar las lesiones inducidas por el DEB.

Adicionalmente, las frecuencias de daño cromosómico inducido observadas en estos pacientes negativos no alcanzaron el incremento de 10X la frecuencia basal por lo que todos los casos tuvieron una respuesta similar a la observadas en los individuos sanos. Es importante mencionar que los pacientes negativos no mostraron ningún incremento similar al observado en los positivos (4 a 97.5X), de hecho ninguno duplicó la frecuencia de ACs. La mediana de aberraciones cromosómicas espontáneas obtenida en este grupo de pacientes fue de 0.0 ab/cel y esto coincide con lo observado por Medina²³ en las células de individuos sanos.

Tabla 6. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en 642 pacientes negativos a AF e individuos normales		
	Frecuencia AC espontáneas (ab/cél)	Frecuencia AC inducidas (ab/cél)
Pacientes negativos		
Promedio/DE	0.03 ± 0.05	0.06 ± 0.07
Rango	0 - 0.48	0 - 0.8
Moda	0.0	0.04
Individuos sanos		
Promedio/ DE	0.02 ^o	0.04 ^o
Rango	0 - 0.08 ^o	0 - 0.16 ^o

^oDatos tomados de Medina, 2022²³

A pesar de que las frecuencias promedio de ACs son bajas, el DEB si causó daño a las células de los pacientes negativos en un nivel menor y no significativo, ya que la frecuencia de ACs se incrementó de 0.03 a 0.06 (Tabla 6); esto indica que las células con diagnóstico negativo no poseen hipersensibilidad a los agentes inductores de enlaces cruzados y su reparación del DNA es eficiente.

De igual manera que en los pacientes positivos, las frecuencias de aberraciones cromosómicas en los pacientes negativos no presentaron una distribución normal. Por lo tanto, en lugar de la Prueba T se realizó prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney obteniendo como resultado un valor de $p = 0.02$, que indica que existe diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de AC espontáneas e inducidas.

Células aberrantes

Los pacientes negativos a AF, también presentaron células aberrantes tanto de manera espontánea como inducida, pero en un nivel menor. El porcentaje promedio de células aberrantes espontáneas encontrado en los pacientes negativos fue de 3.1 ± 4.7 y se incrementó de manera no significativa con el tratamiento con el DEB a 5.8 ± 5.5 (Tabla 7), esto sugiere que las células no son inocuas al mutágeno, sin embargo la respuesta de inducción es menor a la observada en los pacientes positivos y muy parecida a la de las células normales (Tabla 2). Este comportamiento está de acuerdo con lo reportado por Castela y colaboradores, quienes encontraron un promedio de 3.21% de células aberrantes espontáneas y 5.83 inducidas²⁷.

Tabla 7. Células aberrantes en pacientes negativos para AF.

	Células aberrantes espontáneas (%)	Células aberrantes inducidas con DEB (%)
Promedio/DE	3.1 ± 4.7	5.8 ± 5.5
Rango	0 - 36	0 - 32
Moda	0	4

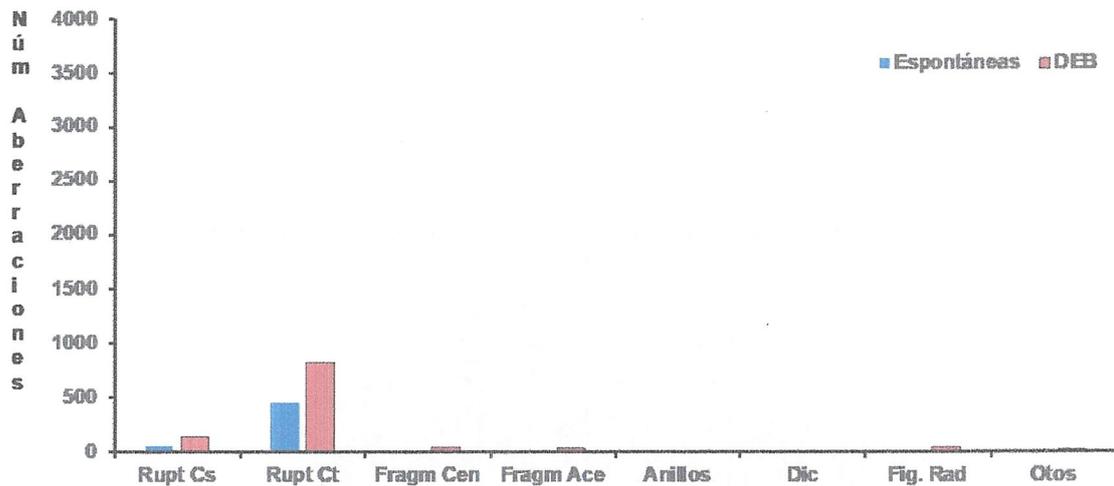
Tipos de aberraciones cromosómicas

En este grupo de pacientes, los tipos de ACs más frecuentes fueron las rupturas cromatídicas y cromosómicas tanto en los cultivos sin tratamiento como en los tratados con DEB. En general, tanto de manera espontánea como inducida, no se encontraron figuras radiales, con la excepción de 2/642 pacientes que mostraron 1 figura radial en las 25 células analizadas (Gráfica 2). Al respecto, Medina²³ en su cohorte de individuos sanos, de manera espontánea reportó la presencia de rupturas cromatídicas y cromosómicas, y de manera inducida con DEB, aberraciones más complejas como dicéntricos, anillos o figuras radiales aunque en un frecuencia muy baja.

La ausencia de figuras radiales en los pacientes negativos ha sido documentada por otros autores ¹⁰, y es corroborada en este trabajo.

Por otra parte, la presencia de un bajo número de aberraciones complejas como los dicéntricos o figuras radiales podría indicar que las células de individuos sanos y los pacientes negativos a AF no fueron capaces de reparar esas lesiones en una de las 25 células analizadas y que si se incrementa la concentración de DEB, podría incrementarse la presencia de estas alteraciones. Por esta razón para hacer el diagnóstico de AF se utiliza una concentración adecuada de DEB y es la misma tanto para los pacientes como para los controles negativos y positivos.

Al comparar la frecuencia de figuras radiales de los pacientes positivos y negativos, la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).



Gráfica 2. Tipos de aberraciones cromosómicas totales espontáneas e inducidas en 642 pacientes negativos a AF. Los tipos de ACs cuando se trataron con DEB fueron similares a los observados en las células sin tratamiento. Las rupturas cromatídicas fueron las más frecuentes. Es evidente la ausencia de figuras radiales.

8.4 Pacientes posibles mosaico AF

Un pequeño grupo de 8 (1.1%) pacientes mostró un comportamiento celular distinto al observado en los pacientes positivos y negativos, las frecuencias de ACs inducidas con DEB tuvieron valores mayores a los observados en los individuos sanos y menores a los de los pacientes positivos. Esto sugirió que los pacientes tenían una población de células sensibles al DEB y otra resistente, por lo que se consideraron como posibles mosaico AF. No obstante, en el tiempo en el que se realizaron los estudios citogenéticos, estos pacientes se consideraron como positivos a la AF. Actualmente, en nuestro laboratorio, cuando se presentan este tipo de hallazgos, se confirma la sensibilidad al DEB en otro tejido como los fibroblastos de piel o de ser posible se debe determinar la variante patogénica por medio de estrategias moleculares.

Esta población estuvo formada por 50% (n=4) de individuos femeninos y 50% (n=4) masculinos. El rango de edad de entre 1 año hasta 11 años. El dato clínico de sospecha no se especificó en 75% de los pacientes, en el 25% de los casos se trató de datos hematológicos (Fig.6).

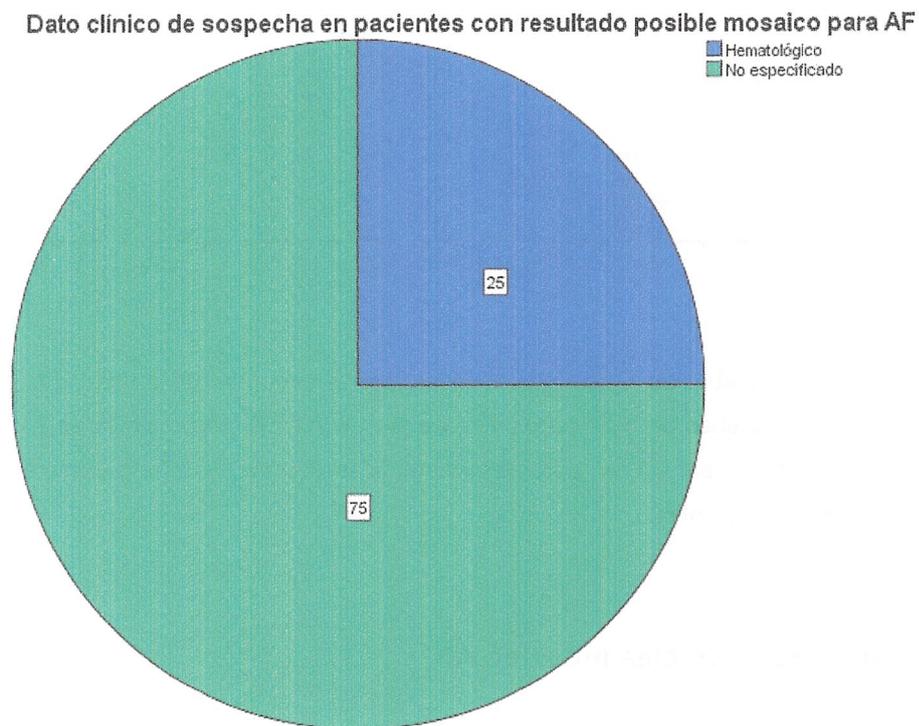


Figura 6. Dato clínico de sospecha en los pacientes con resultado de mosaico para AF.

Frecuencia de aberraciones cromosómicas

La frecuencia promedio de ACs espontáneas fue de 0.13 ± 0.08 ab/cél e inducida de 0.54 ± 0.09 ab/cél, con intervalos de 0.0 a 0.24 ab/cél y 0.36 a 0.64 ab/cél respectivamente. Estas frecuencias de daño indican que basalmente presentan un mayor número de aberraciones con respecto a los individuos sanos y similares a las de los pacientes positivos, mientras que las ACs inducidas son

significativamente mayores que las de los individuos sanos y menores que las de los pacientes positivos (Tabla 8). Los valores modales espontáneos e inducidos fueron 0.08 ab/cél y 0.52 ab/cél, respectivamente.

El incremento de ACs inducidas con respecto a las espontáneas fue menor a 10X, varió de 2.2 a 6X, por lo que la respuesta es diferente a la observada en los pacientes positivos (Tabla 9). Estos pacientes se consideraron posible mosaico AF porque además de presentar valores de ACs mayores que los de los individuos sanos, presentaron figuras radiales (Gráfica 3), que es la alteración citogenética característica de la AF; así mismo, presentaron un mayor porcentaje de células con aberraciones que los controles negativos.

Al comparar la distribución de los diferentes tipos de ACs de los posible mosaico AF con los individuos positivos de esta cohorte, es muy clara la similitud en cuanto al tipo de ACs más frecuentes (rupturas cromatídicas y figuras radiales) espontáneas e inducidas con DEB, aunque los números totales en los positivos son muy superiores (Gráfica 1 y 3 (escala distinta). Esta respuesta sugiere que los pacientes mosaico deben presentar algunas células con variante patogénica y otras revertantes.

El mosaicismo celular, se caracteriza por presentar una población celular sensible al DEB y otra resistente en un mismo individuo. Las células de la población resistente revierten la variante patogénica de alguno de los genes *FANC* por conversión génica, entrecruzamiento intragénico o por mutación en un segundo sitio en las células progenitoras hematopoyéticas y son capaces de reparar el daño espontáneo e inducido, como las células normales¹². Por lo anterior, en los mosaicos AF la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas con DEB o MMC son inferiores a las encontradas en los pacientes AF no-mosaicos, razón por la cual es sumamente relevante identificar los mosaicos cuando el cuadro clínico es muy sugestivo de AF¹⁰.

La presencia de mosaicismo celular somático en AF se ha descrito desde 1992, se presenta en 10-25% de los pacientes con AF y se ha asociado con estabilidad hematológica. Se han reportado casos con mosaicismo AF que presentan una

densidad celular sanguínea estable o normalizada y algunos pacientes han sobrevivido hasta la edad adulta sin falla medular ni malignidad hematológica^{12,30}. Sin embargo, es importante recordar que los tejidos no-hematopoyéticos generalmente siguen teniendo las mutaciones originales en los genes *FANC*, por lo que la corroboración de que es un paciente con mosaicismo de AF se hace en otro tejido, como fibroblastos de piel. Al respecto, el 50% de nuestros pacientes posible mosaico no presentaron deficiencia hematológica.

Tabla 8. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en pacientes posibles en mosaico AF, positivos AF y sanos

	Frecuencia AC espontáneas (ab/cél)	Frecuencia AC inducidas (ab/cél)
Pacientes mosaico		
Promedio/DE	0.13 ± 0.08	0.54* ± 0.09
Rango	0.0 - 0.24	0.36 - 0.64
Pacientes positivos		
Promedio/ DE	0.22 ± 0.25	2.5* ± 2.04
Rango	0 - 0.96	0.64 -13.16
Individuos sanos		
Promedio/ DE	0.02	0.04
Rango	0 -0.08	0 - 0.16

DE= Desviación estándar

*AC espontáneas vs inducidas, $p= 2.2^{-16}$

Tabla 9. Frecuencia de aberraciones cromosómicas e incremento en 8 pacientes con posible mosaico de AF			
Código de paciente	Frecuencia de ACs espontáneas	Frecuencia de ACs inducidas	Incremento de ACs
10-10	0.12	0.60	5
370-18	0.16	0.64	4
671-13	0.12	0.56	4.6
191-14	0.08	0.36	4.5
340-03	0.0	0.64	-
433-04	0.08	0.48	6
99-13	0.24	0.52	2.2
186-18	0.24	0.52	2.2

Porcentaje de células aberrantes

El promedio del porcentaje de células aberrantes espontáneo fue de 11.07 ± 6.2 e inducida de 37.8 ± 7.19 con intervalos de 0 a 20 y 16 a 40 respectivamente (Tabla 10). Estos porcentajes indican que más del 60% de las células tratadas con DEB no tienen aberraciones cromosómicas y es compatible con la existencia de mosaicismo celular.

Por otra parte, estos porcentajes de células aberrantes espontáneos e inducidos difieren mucho de los encontrados en la población positiva y negativa de esta cohorte de estudio; al igual que con las aberraciones cromosómicas, los mosaicos tienen porcentajes intermedios entre los positivos y negativos (Tablas 4,7,10). Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura que refieren que los pacientes mosaico tienen un porcentaje de células aberrantes de menos del 50%.

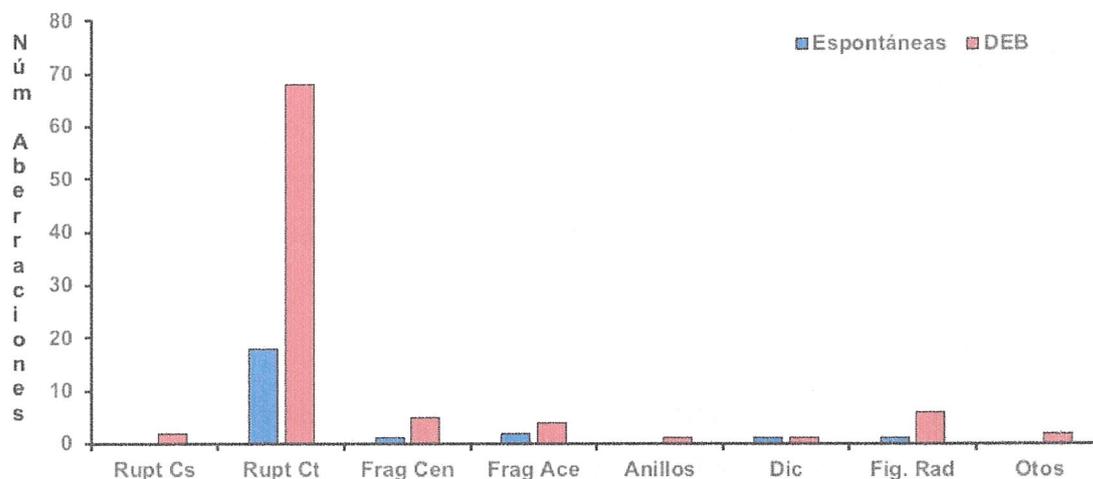
Tipos de aberraciones cromosómicas

Como se puede observar en la gráfica 3, los pacientes posibles mosaico tanto de forma espontánea como inducida presentaron todos los diferentes tipos de ACs, pero en un número diferente; los números totales de ACs en los 8 pacientes mosaico se incrementaron significativamente cuando las células se dañaron con

DEB, siendo mayoritarias las rupturas cromatídicas y las figuras radiales características del fenotipo celular AF.

Tabla 10. Células aberrantes en pacientes posible AF en mosaico		
	Células aberrantes espontáneas (%)	Células aberrantes inducidas con DEB (%)
Promedio/DE	11.07 ± 6.2	37.8 ± 7.19
Rango	0 - 20	16 - 40
Moda	8	28

Tipos de aberraciones en pacientes posible mosaico AF



Gráfica 3. Tipos de aberraciones cromosómicas totales espontáneas e inducidas en 8 pacientes posible mosaico AF. Espontáneamente los pacientes presentaron un reducido número de ACs de todos los tipos. EL DEB incrementó el número de rupturas cromatídicas y de figuras radiales.

8.5 Pacientes positivos, negativos y mosaicos AF

Los resultados del presente trabajo permitieron conocer los intervalos de ACs espontáneas e inducidas, el porcentaje de células aberrantes y el tipo de ACs en

pacientes positivos, negativos y posibles mosaico AF. La respuesta de estas tres poblaciones al DEB fue clara y muy distinta (Tabla 11), de tal manera que se obtuvieron los intervalos de daño para cada población y se logró documentar que no siempre existe un incremento de 10X la frecuencia de ACs inducidas y que puede variar desde 4 hasta 97.5X (Anexo 1).

Se demostró la existencia de un alto grado de heterogeneidad celular en los pacientes positivos en relación a la presencia de ACs espontáneas e inducidas por DEB, pero es muy claro que a diferencia del fenotipo clínico y molecular, el fenotipo celular es notoriamente uniforme y constante. Las células AF son uniformemente sensibles a los agentes inductores de enlaces cruzados en la cadena de DNA como el DEB o la MMC. Esta sensibilidad depende de la dosis y se manifiesta como una menor supervivencia, elevadas tasas de aberraciones cromosómicas y detención del ciclo celular.

Los tres grupos de estudio mostraron diferencias significativas en comparación con las frecuencias de daño espontáneas e inducidas en la población sana ($p < 0.05$). Al realizar comparaciones estadísticas entre los grupos de estudio, se encontró que las frecuencias de ACs espontáneas e inducidas de los pacientes positivos fueron significativamente mayores que las observadas en la población negativa y en la me mosaico a AF $p < 0.05$. Característicamente, a diferencia de los pacientes negativos, la población positiva y la de mosaico AF mostraron una elevada frecuencia de rupturas cromatídicas y figuras radiales.

Los resultados de este trabajo indican que para considerar que un paciente es positivo a AF, se debe considerar: **a)** una elevada frecuencia de ACs inducidas significativamente diferente a su basal y a las del control negativo, lo cual demuestra la hipersensibilidad al DEB, **b)** una elevada frecuencia de daño de tipo cromatídico, principalmente rupturas cromatídicas y figuras radiales, **c)** el incremento de ACs, varió desde 4 hasta 97.5X, **d)** un incremento significativo de células aberrantes en los cultivos tratados con DEB.

Tabla 11. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en pacientes positivos, negativos, posibles en mosaico AF e individuos sanos

	Frecuencia AC espontáneas (ab/cél)	Frecuencia AC inducidas (ab/cél)
Pacientes positivos		
Promedio/ DE	0.22 ± 0.25	2.5* ± 2.04
Rango	0 – 0.96	0.64 -13.16
Pacientes mosaico		
Promedio/DE	0.13 ± 0.08	0.54* ± 0.09
Rango	0.0 - 0.24	0.36 - 0.64
Pacientes negativos		
Promedio/DE	0.03 ± 0.05	0.06* ± 0.07
Rango	0 - 0.48	0 - 0.8
Individuos sanos		
Promedio/ DE	0.02	0.04
Rango	0 -0.08	0 – 0.16

DE= Desviación estándar

*AC inducidas positivos vs negativos vs mosaico, $p= 2.2 \cdot 10^{-16}$

** AC inducidas negativos vs mosaico, $p < 0.05$

8.6 Descripción clínica de los pacientes con resultado positivo para Anemia de Fanconi.

En cuanto a las manifestaciones clínicas documentadas en este estudio existe una gran falta de información. También se eliminaron algunos pacientes debido a que aunque tenían cuadro clínico, no se encontraron las hojas de lectura de las aberraciones cromosómicas en el archivo. Finalmente se obtuvieron datos de 16 pacientes de los cuales solo se reportaron datos de talla baja, pigmentación de la piel, malformaciones del riñón, alteraciones del eje radial y datos hematológicos. Por esta razón no hay una adecuada descripción de los pacientes ni se pudo

establecer una correlación genotipo-fenotipo, no obstante, a continuación, se describen las características clínicas de este pequeño grupo.

De los 16 pacientes, el 56.25% (n=9) fueron femeninos y 43.75% (n=7) masculinos (Fig.7). Con un rango de edad desde los 2 años hasta los 18 años. Se reportó consanguinidad el 18.8% de los casos (Fig.8) y endogamia en el 56.3% de los casos (Fig.9).

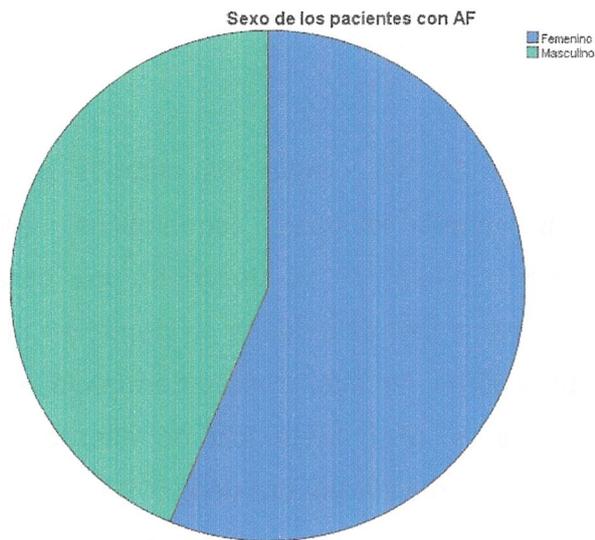


Figura 7. Proporción del sexo de los pacientes con AF y en los que se describieron sus características clínicas.

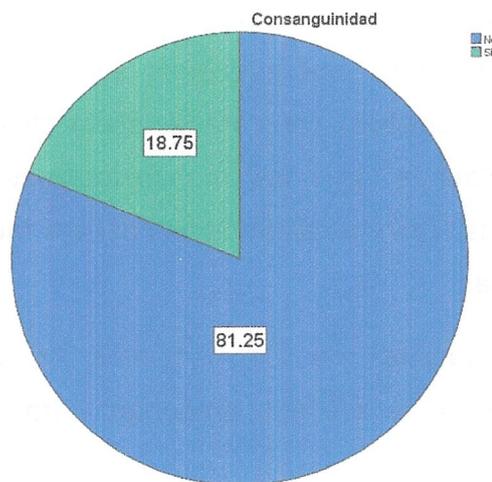


Figura 8. Porcentaje de consanguinidad.

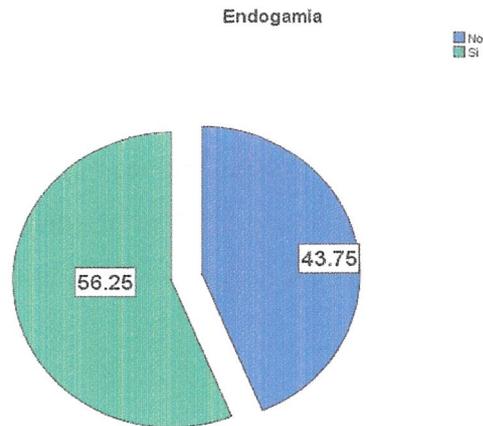


Figura 9. Porcentaje de endogamia

Se refiere que el fenotipo clásico de AF incluye los criterios principales de pancitopenia, hiperpigmentación, malformaciones esqueléticas, talla baja y anomalías urogenitales.⁶ En la tabla 12 se describen las características clínicas y el porcentaje de los 16 pacientes estudiados en donde se observan las anomalías clínicas más frecuentes como: las alteraciones dermatológicas (93.8%), las manifestaciones hematológicas (87.5%), presencia de alteraciones del eje radial (68.7%), talla baja (56.2%) y anomalías faciales (50%); esto quiere decir que la mayoría de nuestros pacientes cumplen con alguno de estos criterios principales.

Las malformaciones congénitas clásicas en AF se encuentran dentro los acrónimos VACTERL-H (Vertebral, Anal, Cardíaco, Fístula Traqueoesofágica, Atresia esofágica, Renal, Extremidades superiores e Hidrocefalia) y PHENOS (Pigmentación de la piel, microcefalia, ojos pequeños, sistema Nervioso, Otología y Talla baja). Los pacientes AF positivos con características clínicas reportadas en este trabajo presentaron algunas de las manifestaciones fenotípicas más frecuentes en estos acrónimos como las alteraciones del eje radial, la talla baja y las alteraciones dermatológicas.

Si bien las características faciales de los pacientes AF no son descritas ampliamente en la literatura, se refiere que presentan cara triangular, mentón

pequeño y ojos pequeños³¹. Incluso otros autores refieren que las facies típicas en los individuos con AF alcanzan hasta el 66%¹⁵, sin embargo, no se describen estas características faciales. En nuestro grupo de pacientes se refiere que el 50% presentaron un fenotipo facial particular o dismorfias faciales.

En cuanto al sistema nervioso central (SNC), solamente se mencionó como alteración la microcefalia en el 18.3% de los pacientes gracias a la medición del perímetro cefálico. Este porcentaje es menor al reportado en la literatura, al respecto, en una cohorte de 561 pacientes, se reportó la presencia de microcefalia en el 27% de individuos con AF¹. Es probable que un mayor número de pacientes cursaran con microcefalia, sin embargo, la mayor parte de nuestra población de estudio no tenían medición del perímetro cefálico, cabe destacar que todos los pacientes en las que si se obtuvo la medición tuvieron microcefalia. Otras alteraciones del SNC no se reportaron en esta cohorte de pacientes; importante señalar que el 25% de los casos no hubo evidencia de estudios por tomografía axial computarizada (TAC) ni resonancia magnética(RMN) cerebral o electroencefalograma (EEG).

La talla baja se presentó en el 56.25% de los casos. Esto coincide con lo que se ha reportado en literatura ya que es una de las características individuales más frecuentes, hasta en el 43% de los casos¹. Se ha asociada a la talla baja con deficiencias hormonales, las cuales en este grupo de estudio no se evaluaron.

Las alteraciones oftalmológicas se presentaron en un 25% de los pacientes, dentro de las que destacaron las fisuras palpebrales cortas y oblicuas hacia arriba, epicanto, estrabismo y ametropía. A diferencia de lo reportado en la literatura, este pequeño grupo no presentó microftalmia, que de acuerdo con otros autores es la anomalía ocular más frecuente⁶

Las alteraciones de los pabellones auriculares se encontraron en el 12.5% de los pacientes, dentro de las que destacaron las fisuras palpebrales cortas, oblicuas hacia arriba, epicanto, estrabismo y ametropía. En contraste, en la literatura se reporta la presencia de hipoacusia o pérdida auditiva como una de las manifestaciones principales, pero no se reportó en nuestra población.

Las manifestaciones cardíacas se presentaron en el 12.5% de los pacientes. En la tesis de la Dra. Gilda Garza³² se presentan las malformaciones cardíacas hasta en un 20.6% de los pacientes con AF, sin embargo, en la literatura se presenta como manifestaciones más frecuentes, reportadas hasta en el 55% de los casos de AF³¹. Las malformaciones cardíacas que presentaron los pacientes estudiados fueron PCA y cardiopatía compleja con CIA, CIV y PCA, estas ya se han reportado en la literatura como parte de las malformaciones en pacientes con AF⁸.

Las malformaciones gastrointestinales se presentaron en el 12.5% de los casos. En la literatura las malformaciones gastrointestinales se han reportado con una frecuencia de <20%¹, y coincide con la frecuencia en nuestro grupo de estudio.

Pueden ser parte del acrónimo VACTERL-H, como la malformación anorrectal y la fistula traqueoesofágica, sin embargo, en nuestro grupo de pacientes solo se refiere a un paciente con malformación anorrectal.

En cuanto a las malformaciones renales se reportaron en el 18.75% de los casos, dentro de la que se encontraron hipoplasia renal, ectopia renal, agenesia renal y quiste renal, malformaciones que coinciden con lo reportado en la literatura. ^{6,8}

En cuanto a las malformaciones renales se reportaron en el 18.75% de los casos, dentro de la que se encontraron hipoplasia renal, ectopia renal, agenesia renal y quiste renal, malformaciones que coinciden con lo reportado en la literatura. ^{6,8}

Las malformaciones renales son de los datos clásicos de AF, en la literatura se reporta un porcentaje del 27% en los que se encuentran presentes estas malformaciones.

En la literatura se describe que los pacientes varones presentan malformaciones genitales hasta en el 16%¹. En este pequeño grupo de estudio, un solo paciente (6.25%) presentó testículos pequeños.

Tabla 12. Descripción clínica de 16 pacientes con AF		
Fenotipo Facial	50%	Fenotipo facial particular o dismorfias faciales
Alteraciones en el SNC	18.3%	Microcefalia
Talla baja	56.2%	Por debajo de centilas poblacionales para la edad.
Alteraciones oftalmológicas	25%	Fisuras palpebrales cortas, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, epicanto, estrabismo y ametropía.
Alteraciones de pabellones auriculares	12.5%	Hélix plegado, lóbulo hipoplásico, implantación limítrofe y rotación posterior
Manifestaciones cardiacas	12.5%	PCA, cardiopatía compleja con CIA, CIV y PCA.
Malformaciones gastrointestinales	12.5%	Hepatomegalia, malformación anorrectal
Malformaciones renales	18.75%	Hipoplasia renal, ectopia renal, agenesia renal y quiste renal
Malformaciones genitales	6.25%	Testículos pequeños
Alteraciones radiales	68.7%	Hipoplasia tenar, pulgar desarticulado, pulgar digitalizado, hipoplasia de pulgar, polidactilia postaxial, agenesia radial y agenesia de pulgar
Otras alteraciones esqueléticas	25%	Cierre tardío de fontanelas, displasia de cadera, escoliosis presencia de 13 arcos costales y hemivértebras.
Alteraciones dermatológicas	93.8%	Manchas café con leche y alteraciones en la pigmentación de la piel.
Manifestaciones hematológicas	87.5%	Anemia aplásica, trombocitopenia.

En las mujeres las malformaciones en genitales se reportan con menos frecuencia, esto debido a las exploraciones invasivas que deben realizarse para determinarlas¹; las malformaciones que se mencionan en las pacientes femeninas son útero bicorne, hipoplasia vaginal o de útero, atresia de la vagina, ausencia de ovarios u ovarios hipoplásicos. Además, hasta el 50% presentan infertilidad⁶

Las alteraciones radiales se presentaron en un 68.7% de nuestros pacientes, este porcentaje es más elevado que lo reportado en la literatura, con una frecuencia de 40%¹. Según lo reportado en la tesis de la Dra. Gilda Garza³², ya que los pacientes de este estudio forman parte de su grupo de pacientes, en ellos se tomó en cuenta la hipoplasia tenar e hipotenar, sin embargo, otros estudios no describen estas alteraciones como parte del espectro de alteraciones radiales. En literatura más reciente ya se han mencionado la hipoplasia tenar e hipotenar dentro de las alteraciones radiales siendo estas las más frecuentes⁸; lo cual coincide con este estudio ya que estas malformaciones se encontraron con una frecuencia 44.1%. Otras alteraciones esqueléticas como, cierre tardío de fontanales, displasia de cadera, escoliosis presencia de 13 arcos costales y hemivértebras se presentaron en el 25% de los casos; todas estas ya se han reportado en la literatura excepto por el cierre tardío de fontanelas.

Otras de las manifestaciones clásicas y más frecuentes de los pacientes con AF son las alteraciones dermatológicas, en las que se incluye la hiper o hipopigmentación de la piel, además de manchas café con leche. También son parte del acrónimo PHENOS. Estas manifestaciones se han reportado desde 37% hasta 80% en diferentes cohortes de pacientes^{1,31}. En nuestro estudio se reportaron con una frecuencia del 93.8%, en donde las manchas café con leche predominaron con un porcentaje del 69.3%. Por esta razón una adecuada exploración física completa, de esta manera no se deja pasar por alto alguna manifestación de la piel.

Las manifestaciones hematológicas se presentaron en el 87.5% de los pacientes, esto coincide con la descripción de este mismo estudio en el que los datos

hematológicos son el dato clínico de sospecha más frecuente en los pacientes positivos, además en la literatura se reportan con un porcentaje de 96%³³. La falla medular es el dato clínico de sospecha más frecuente. Otros datos hematológicos presentes en los pacientes fueron trombocitopenia y anemia, además de antecedentes familiares con pancitopenia.

Los pacientes con AF tienen un riesgo leucemia mieloide aguda(LMA) de (varios cientos de veces con respecto a población sana³⁴, se reporta con una frecuencia de 84%³⁵. En nuestro estudio solo uno de los pacientes presentó leucemia mielode mielomonocítica M4 variedad eosinofílica; no se describe en la literatura si este tipo de leucemia es específica de AF, pero si se reporta que en general la LMA es más común que leucemia linfoblástica aguda y que los linfomas³⁶

8.7 Correlación genotipo-fenotipo

El establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo mediante las frecuencias de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas con DEB en los pacientes positivos a AF no fue posible realizarla, debido a que como se mencionó anteriormente, los archivos del laboratorio no tenían suficiente información de las características clínicas que tenían los pacientes al momento del diagnóstico.

Con la finalidad de obtener un poco información sobre el genotipo-fenotipo, se analizó la posible correlación de las aberraciones cromosómicas con el gen *FANC* afectado. Para esto, en nuestro laboratorio, actualmente se están recontactando y genotipificando a los pacientes que se diagnosticaron como positivos y los posibles mosaico en los últimos 10 años. Hasta el momento se han genotipificado 20 pacientes de los 92 estudiados en este trabajo, 20 fueron diagnosticados como positivos con el ensayo citogenético de fragilidad cromosómica y solo uno como mosaico AF (Comunicación personal, Publicación en redacción).

De los pacientes positivos a AF, el 70% de los pacientes presentaron una variante patogénica en el gen *FANCA*, el 10% en *FANCB*, el 10% en *FANCC*, el 5% en *FANCE* y el 5% en *FANCG* (Tabla 11); el paciente posible mosaico tiene una

variante patogénica en el gen *FANCA*. En general, no existe una correlación entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas y el gen afectado (Tabla 13), con excepción de *FANCB*, el resto de los pacientes presentaron un nivel de daño cromosómico que va del 0.68 al 2.04 sin importar el gen afectado. Un evento que llama la atención es que los dos pacientes con variante patogénica en *FANCB* tuvieron una mayor cantidad de daño cromosómico y un mayor porcentaje de células aberrantes de manera espontánea e inducida con DEB que el resto de los pacientes pertenecientes a los otros grupos de complementación; además son los pacientes que presentaron un mayor número de figuras radiales. Sin embargo, son solo dos pacientes y no existen reportes en la literatura al respecto, por lo que desconocemos si esto tenga correlación con el gen afectado.

De los 21 pacientes genotificados, sólo 6 tuvieron descripción escueta del fenotipo clínico y el gen *FANCA* mutado. De las características clínicas reportadas, destacan que los 6 pacientes presentaron alteraciones hematológicas y dermatológicas; el 50% presentaron alteraciones del eje radial. Sin embargo debido a que los pacientes no tenían un cuadro clínico completo, no se pudieron establecer correlaciones con el daño cromosómico.

En relación a la correlación genotipo- fenotipo de las malformaciones congénitas con los genes *FANC*, en la literatura se ha reportado que los pacientes con variantes patogénica en *FANCB* y *FANCI* presentan con mayor frecuencia el fenotipo VACTERL-H y en los pacientes con *FANCD2* se presentan con mayor frecuencia el fenotipo PHENOS¹. El fenotipo del gen *FANCC* es uno de los genes donde se reporta que los pacientes no presentan fenotipo asociado a PHENOS, sin embargo, en una familia menonita mexicana se reportó una variante fundadora en *FANCC* y se describe que el paciente presenta clínicamente fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba y epicanto izquierdo, además de hiperpigmentación de la piel y 2 manchas café con leche en el torso, sin alteraciones radiales; por lo que variantes en *FANCC* si pueden presentar manifestaciones de PHENOS³⁷. Otro estudio realizado en pacientes provenientes de una comunidad indígena con variante patogénica en *FANCG*, presentan manifestaciones clínicas que

comparten entre ellos las cuales son la talla baja, microcefalia, alteraciones del eje radial, pigmentación en la piel o manchas café con leche y característica facial: fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba³⁸. Esto nos sigue demostrando esta heterogeneidad en las manifestaciones clínicas.

En este trabajo fue muy clara la necesidad de realizar una correcta y completa descripción clínica de los pacientes con sospecha de AF que en futuros trabajos permita establecer la correlación genotipo-fenotipo. Además, para detectar correctamente las malformaciones congénitas es sumamente importante que los pacientes sean revisados por genetistas y para la identificación de las anormalidades hematológicas por hematólogos.

Actualmente, en nuestro laboratorio se ha establecido un Registro Nacional de pacientes con AF (RAFMex) que incluye un cuestionario ampliado para la identificación de todas las características clínicas de los pacientes; además, en los casos positivos, se recontactan a los pacientes para ser revisados clínicamente de forma multidisciplinaria. En un futuro próximo, esto junto con la genotipificación y las aberraciones cromosómicas permitirá establecer la correlación genotipo-fenotipo tanto a nivel celular como molecular.

Tabla 13. ACs y porcentaje de células aberrantes en 20 pacientes genotipificados

Código	Frecuencia de ACs			Porcentaje de células aberrantes		Gen con variante patogénica
	Espontáneas	Inducidas	Incremento de ACs	Espontáneas	Inducidas	
83-14	0.20	1.56	7.8	12	52	FANCA
82-14	0.04	1.32	33	4	56	FANCA
242-15	0.16	1.20	7.5	12	56	FANCA
276-14	0.08	1.76	22	8	80	FANCA
277-14	0.12	1.56	13	12	64	FANCA
49-10	0.16	2.04	12.75	0	76	FANCA
355-15	0.2	1.92	9.6	16	76	FANCA
108-16	0.00	0.72	-	0	40	FANCA
269-16	0.08	1.48	18.5	8	60	FANCA
262-16	0.08	2.32	29	8	76	FANCA
283-19	0.00	0.80	-	8	64	FANCA
377-19	0.04	0.68	17	4	44	FANCA
444-19	0.08	0.92	11.5	8	44	FANCA
370-20	0.04	1.52	38	4	64	FANCA
139-14	0.32	3.40	10.6	28	88	FANCB
140-14	0.4	4.84	12.1	40	96	FANCB
410-16	0	2.04	-	0	80	FANCC
403-16	0.08	1.48	18.5	8	64	FANCC
667-18	0.28	1.44	5.1	16	80	FANCE
650-13	0.28	1.92	6.8	20	48	FANCG

9. CONCLUSIONES

- La prueba de fragilidad cromosómica con inducción de daño cromosómico por agentes inductores de enlaces cruzados, como el DEB, es el estándar de oro para el diagnóstico de anemia de Fanconi.
- Se determinaron los rangos de daño cromosómico basal e inducido de los pacientes positivo, negativos y posibles mosaico AF. Los 3 son significativamente diferentes entre ellos. Los pacientes negativos tienen una respuesta al DEB similar a la observada en los individuos sanos.
- Los pacientes positivos AF presentaron un promedio de ACs espontáneas e inducidas 0.22 ± 0.25 y 2.5 ± 2.04 con rangos de 0 - 0.96 y 0.64 - 13.16 respectivamente.
- Los pacientes negativos AF presentaron un promedio de ACs espontáneas e inducidas 0.03 ± 0.05 y 0.06 ± 0.07 con rangos de 0 - 0.48 y 0 - 0.8 respectivamente.
- Los pacientes posible mosaico AF presentaron un promedio de ACs espontáneas e inducidas 0.13 ± 0.08 y 0.54 ± 0.09 con rangos de 0.0 - 0.24 y 0.36 - 0.64 respectivamente.
- Los tipos de aberraciones cromosómicas inducidas más frecuentes en los pacientes positivo y probable mosaico AF fueron las rupturas cromatídicas y las figuras radiales.
- Existe una gran variabilidad en la frecuencia de ACs espontáneas e inducidas en los pacientes positivos y los posibles mosaico AF, existieron algunos pacientes que mostraron frecuencia elevadas que ampliaron de manera importante los intervalos de daño.
- Los resultados de este trabajo indican que para considerar que un paciente es positivo a AF, se debe considerar: a) una elevada frecuencia de ACs inducidas significativamente diferente a su basal y a las del control negativo, lo cual demuestra la hipersensibilidad al DEB, b) una elevada frecuencia de daño de tipo cromatídico, principalmente rupturas cromatídicas y figuras radiales, c) el incremento de ACs, varió desde 4

hasta 97.5X, d) un incremento significativo de células aberrantes en los cultivos tratados con DEB.

- No se pudo establecer una correlación genotipo- fenotipo debido a la escasez de información clínica de los pacientes. Es muy importante hacer una buena y completa descripción.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Fiesco-Roa, M. O., Giri, N., McReynolds, L. J., Best, A. F., & Alter, B. P. (2019). Genotype-phenotype associations in Fanconi anemia: A literature review. *Blood Reviews*, 37, 100589. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100589>
2. Bhandari J, Thada PK, Puckett Y. Fanconi Anemia. (2022). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; PMID: 32644559
3. Tischkowitz, M. D. (2003). Fanconi anemia. *Journal of Medical Genetics*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.1.1>
4. García de Teresa, B., Rodríguez, A., & Frías, S. (2016). Estudio multidisciplinario del paciente con anemia de Fanconi. *Acta Pediátrica De México*, 37(1), 54. <https://doi.org/10.18233/apm37no1pp54-59>
5. Neveling, K., Endt, D., Hoehn, H. & Schindler, D. (2009). Genotype–phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 668(1-2), 73-91. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.05.006>
6. Auerbach, A. D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 668(1–2), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.01.013>
7. Fanconi Anemia Research Fund. (2020). *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines [Fifth Edition]*. https://www.fanconi.org/images/uploads/other/Fanconi_Anemia_Clinical_Care_Guidelines_5thEdition_web.pdf
8. Moreno, O. M., Paredes, A. C., Suarez-Obando, F., & Rojas, A. (2021). An update on Fanconi anemia: Clinical, cytogenetic and molecular approaches (Review). *Biomedical Reports*, 15(3), 74. <https://doi.org/10.3892/br.2021.1450>
9. Teresa, B. G., Del Castillo, V., Molina, B. & Frías, S. (2012). Diagnóstico clínico y de laboratorio de la anemia de Fanconi. *Acta Pediátrica de México*, 33(1), 38-43. <https://doi.org/10.18233/apm33no1pp38-43>
10. Molina B, Ramos S, Frías S. (2022). Anemia de Fanconi, Parte 1. Diagnóstico citogenético. *Acta Pediatr Méx*, 43 (2): 102-28.

11. Oostra, A. B., Nieuwint, A. W. M., Joenje, H., & de Winter, J. P. (2012). Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. *Anemia*, 2012, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2012/238731>
12. Nicoletti, E., Rao, G., Bueren, J. A., Ríó, P., Navarro, S., Surrallés, J., Choi, G., & Schwartz, J. D. (2020). Mosaicism in Fanconi anemia: concise review and evaluation of published cases with focus on clinical course of blood count normalization. *Annals of Hematology*, 99(5), 913-924. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03954-2>
13. Mehta PA, Ebens C. Fanconi Anemia. (2002). In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK1401/>
14. Taylor, A. (2001). Chromosome instability syndromes. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 14(3), 631-644. <https://doi.org/10.1053/beha.2001.0158>
15. Esmer, C., Sánchez, S., Ramos, S., Molina, B., Frias, S. & Carnevale, A. (2003). DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 124A(1), 35-39. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20327>.
16. Schroeder TM, Anschutz F, Knopp A. (1964). Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik*, 1:194-196.
17. Sasaki MS, Tonomura A (1973). A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA crosslinking agents. *Cancer Res.*; 33:1829-1836.
18. Frías S, Carnevale A, Molina B, del Castillo V. (1986). Estudio de heterogeneidad genética en anemia de Fanconi por medio de la adición de plasma [Genetic heterogeneity study in Fanconi's anemia by the addition of plasma]. *Rev Invest Clin*, 38(3):269-71. Spanish. PMID: 3097778.
19. Auerbach AD, Zhang M, Ghosh R, Pergament E, Verlinsky Y, Nicholas H, Boue J. (1986). Clastogen-induced chromosomal breakage as a marker for first trimester prenatal diagnosis of Fanconi anemia. *Hum Genet*, 73, p. 86.

20. Auerbach AD (1993). Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol*, 21(6):731-3.
21. Frías, S., Rodríguez, A., Molina, B., García de Teresa, B., Lieberman, E. (2018). Síndromes de Inestabilidad Genómica En Del Castillo Ruiz, Uranga Hernández & Zafra De la Rosa. *Genética clínica (2.a ed.)*. Editorial El Manual Moderno. pp.579-602.
22. Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P., Decordier, I., & Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11), 1515–1531. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.004>
23. Medina, D & García de Teresa, B (2022) Descripción histórica de la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas por agentes inductores de enlaces covalentes cruzados en individuos sanos. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
24. Auerbach, A. D. (2015). Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis. *Current Protocols in Human Genetics*, 85(1). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0807s85>
25. Joenje, H., Arwert, F., Eriksson, A. W., de Koning, H., & Oostra, A. B. (1981). Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature*, 290(5802), 142-143. <https://doi.org/10.1038/290142a0>
26. Joenje, H., & Oostra, B. (1983). Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi anaemia. *Human Genetics*, 65(2), 99-101. <https://doi.org/10.1007/bf00286642>
27. Castella, M., Pujol, R., Callen, E., Ramirez, M. J., Casado, J. A., Talavera, M., Ferro, T., Munoz, A., Sevilla, J., Madero, L., Cela, E., Belendez, C., de Heredia, C. D., Olive, T., de Toledo, J. S., Badell, I., Estella, J., Dasi, A., Rodriguez-Villa, A., . . . Surralles, J. (2011). Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *Journal of Medical Genetics*, 48(4), 242-250. <https://doi.org/10.1136/jmq.2010.084210>
28. Newell A.E.H., Akkari Y.M.N., Torimaru Y., Rosenthal A., Reifsteck C.A., Cox B., Grompe M., Olson S.B. (2004). Interstrand crosslink-induced radials form

- between non-homologous chromosomes, but are absent in sex chromosomes. *DNA Repair*, 3:535–542. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.01.011.
29. Hanlon Newell A.E., Hemphill A., Akkari Y.M.N., Hejna J., Moses R.E., Olson S.B. (2008). Loss of homologous recombination or non-homologous end-joining leads to radial formation following DNA interstrand crosslink damage. *Cytogenet. Genome Res*, 121:174–180. doi: 10.1159/000138882.
 30. Fargo JH, Rochowski A, Giri N, Savage SA, Olson SB, Alter BP. (2014) Comparison of chromosome breakage in non-mosaic and mosaic patients with Fanconi anemia, relatives, and patients with other inherited bone marrow failure syndromes. *Cytogenet Genome Res.*;144(1):15–27
 31. Alter, B. P., & Giri, N. (2016). Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi Anemia according to PHENOS. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(6), 1520-1524. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37637>.
 32. Garza, G & García de Teresa, B (2020) Descripción Del Fenotipo De Pacientes Mexicanos Con Anemia De Fanconi. Universidad Nacional Autónoma de México
 33. Fiesco-Roa MO, Gómez-Moreno PG, Espinosa-Curiel RM, Rodríguez A, Frías S. (2022). Dismorfología como Herramienta Clínica para el Diagnóstico Temprano de Anemia de Fanconi. *Acta Pediatr Méx*, 43 (2): 129-40.
 34. Nalepa, G., & Clapp, D. W. (2018). Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship. *Nature Reviews Cancer*, 18(3), 168-185. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.116>
 35. Alter, B. P. (2014). Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 27(3-4), 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2014.10.002>
 36. Savage SA, Walsh MF. (2018). Myelodysplastic Syndrome, Acute Myeloid Leukemia, and Cancer Surveillance in Fanconi Anemia. *Hematol Oncol Clin. North Am.* ;32(4):657-668. doi: 10.1016/j.hoc.2018.04.002.
 37. García-de Teresa, B., Frías, S., Molina, B., Villarreal, M. T., Rodríguez, A., Carnevale, A., López-Hernández, G., Vollbrechtshausen, L., Olaya-Vargas, A., & Torres, L. (2019). FANCC Dutch founder mutation in a Mennonite family from Tamaulipas, México. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(6). <https://doi.org/10.1002/mgg3.710>

38. Reyes, P.; García-de Teresa, B.; Juárez, U.; Pérez-Villatoro, F.; Fiesco-Roa, M.O.; Rodríguez, A.; Molina, B.; Villarreal-Molina, M.T.; Meléndez-Zajgla, J.; Carnevale, A.; et al. (2022). Fanconi Anemia Patients from an Indigenous Community in Mexico Carry a New Founder Pathogenic Variant in FANCG. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 2334. <https://doi.org/10.3390/ijms23042334>

Anexo 1. Frecuencia de aberraciones cromosómicas, células aberrantes e incremento de aberraciones inducidas en 92 pacientes positivos a AF.					
Po Código	Frecuencia de ACs			Porcentaje de Células aberrantes	
	Espontáneas	Inducidas	Incremento de ACs	Espontáneas	Inducidas
714-13	0.08	1.24	15.5	8.00%	32.00%
550-13	0.12	2.44	20.3	8.00%	56.00%
224-16	0.84	3.80	4.5	60.00%	72.00%
83-14	0.20	1.56	7.8	12.00%	52.00%
82-14	0.04	1.32	33	4.00%	56.00%
650-13	0.28	1.92	6.8	20.00%	48.00%
685-14	0.16	1.64	10.2	12.00%	88.00%
07--15	0.12	1.60	13.3	12.00%	44.00%
242-15	0.16	1.20	7.5	12.00%	56.00%
276-14	0.08	1.76	22	8.00%	80.00%
277-14	0.12	1.56	13	12.00%	64.00%
49-10	0.16	2.04	12.75	0.00%	76.00%
355-15	0.2	1.92	9.6	16.00%	76.00%
703-15	0.28	2.16	7.7	24.00%	80.00%
108-16	0.00	0.72	-	0.00%	40.00%
269-16	0.08	1.48	18.5	8.00%	60.00%
262-16	0.08	2.32	29	8.00%	76.00%
323-17	0.16	1.36	8.5	16.00%	56.00%
266-18	0.00	2.36	-	0.00%	76.00%
100-19	0.08	2.57	32.1	8.00%	76.00%
283-19	0.00	0.80	-	8.00%	64.00%
362-19	0.04	1.04	26	4.00%	52.00%
35-15	0.20	1.44	7.2	16.00%	72.00%
684-14	0.08	2.68	33.5	8.00%	84.00%
412-14	0.20	3.88	19.4	20.00%	88.00%
199-11	0.04	2.20	55	4.00%	40.00%
123-13	0.40	2.60	6.5	20.00%	64.00%
155-13	0.08	7.80	97.5	8.00%	100.00%
137-14	0.16	4.64	29	16.00%	100.00%
454-09	0.36	4.56	12.6	24.00%	76.00%

51-10	0.20	3.60	18	16.00%	84.00%
74-12	0.64	6.72	10.5	40.00%	96.00%
515-14	0.20	4.40	22	20.00%	88.00%
473-11	0.08	3.44	43	48.00%	88.00%
612-10	0.96	13.16	13.7	44.00%	100.00%
492-13	0.12	1.72	14.3	12.00%	72.00%
158-14	0.24	3.72	15.5	20.00%	88.00%
139-14	0.32	3.40	10.6	28.00%	88.00%
140-14	0.4	4.84	12.1	40.00%	96.00%
467-99	0.32	2.84	8.8	24.00%	52.00%
139-00	0.22	2.44	11.9	12.00%	64.00%
98-02	0.24	1.39	5.7	20.00%	48.00%
220-02	0.32	3.44	10.7	24.00%	80.00%
235-02	0.24	1.84	7.6	20.00%	36.00%
327-02	0.12	1.16	9.6	12.00%	44.00%
398-02	0.04	3.12	78	4.00%	60.00%
114-03	0.16	2.20	13.7	12.00%	80.00%
121-03	0.28	1.12	4	24.00%	56.00%
38-04	0.68	12.38	18.2	40.00%	52.00%
232-05	0	2.08	-	0.00%	68.00%
182-06	0.32	2.96	9.2	4.00%	80.00%
343-06	0.08	1.44	18	8.00%	56.00%
220-15	0.12	0.64	5.3	12.00%	32.00%
339-07	0.24	5.08	21.1	20.00%	100.00%
435-07	0.12	1.44	12	12.00%	48.00%
466-07	0.12	1.60	13.3	12.00%	72.00%
527-07	0.04	1.56	39	4.00%	44.00%
652-14	0.04	1.36	34	4.00%	60.00%
458-14	0.04	2.88	72	8.00%	88.00%
410-16	0	2.04	-	0.00%	80.00%
365-16	0.2	1.64	8.2	20.00%	64.00%
491-16	0.24	2.84	11.8	16.00%	92.00%
58-17	0.12	4.91	40.9	12.00%	76.00%
193-17	0.08	0.84	10.5	8.00%	36.00%
189-18	0.2	1.04	5.2	16.00%	52.00%
667-18	0.28	1.44	5.1	16.00%	80.00%
123-19	0.04	0.80	20	4.00%	44.00%
377-19	0.04	0.68	17	4.00%	44.00%
403-19	0.24	3.12	13	16.00%	80.00%

404-19	0.12	2.20	18.3	12.00%	72.00%
444-19	0.08	0.92	11.5	8.00%	44.00%
99-20	0.12	0.84	7	8.00%	48.00%
280-20	0.08	4.28	53.5	8.00%	76.00%
370-20	0.04	1.52	38	4.00%	64.00%
158-21	0	0.82	-	0.00%	52.00%
339-03	0.44	7.72	17.5	24.00%	92.00%
506-06	0.6	2.72	4.5	36.00%	64.00%
403-16	0.08	1.48	18.5	8.00%	64.00%
215-17	0.16	2.60	16.2	12.00%	76.00%
458-18	0.2	0.68	3.4	2.00%	44.00%
573-19	0.16	5.96	37.2	16.00%	100.00%
143-21	0.08	0.82	10.2	8.00%	52.00%
153-18	0.00	1.28	-	0.00%	52.00%
516-18	0.12	2.64	22	12.00%	76.00%
112-99	0.33	3.17	9.6	20.00%	56.00%
467-99	0.32	2.84	8.8	24.00%	56.00%
546-07	0.16	4.32	27	16.00%	100.00%
55-98	0.28	4.125	14.7	32.00%	48.00%
624-16	0.00	2.88	-	0.00%	48.00%
232-06	0.08	0.92	11.5	8.00%	52.00%
433-11	0.04	1.88	47	4.00%	4.00%
101-13	0.08	1.38	17.2	8.00%	40.00%