



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**IDENTIFICACIÓN DE DAÑO CROMOSÓMICO NUMÉRICO Y  
ESTRUCTURAL RELACIONADO CON ENVEJECIMIENTO CELULAR EN  
PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANTONIO DE JESÚS PAZ MARTÍNEZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO**  
**INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

**DRA. LAURA BERRÓN**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO, 2024.



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.

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo a lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

IDENTIFICACIÓN DE DAÑO CROMOSÓMICO NUMÉRICO Y ESTRUCTURAL RELACIONADO CON ENVEJECIMIENTO CELULAR EN PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI

Que presenté para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, es original, de mí autoría y lo realicé con rigor metodológico exigido por el Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referenciadas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de obtención de mi grado académico.

**Atentamente**

PAZ MARTÍNEZ ANTONIO DE JESÚS  
No de cuenta UNAM: 410030936

**(Nombre, firma y número de cuenta del estudiante)**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**IDENTIFICACIÓN DE DAÑO CROMOSÓMICO NUMÉRICO Y  
ESTRUCTURAL RELACIONADO CON ENVEJECIMIENTO CELULAR EN  
PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANTONIO DE JESÚS PAZ MARTÍNEZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO**  
**INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

**DRA. LAURA BERRÓN**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO, 2024.

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
OFICIO: CGEP/CPCB/ IIBM/0436/2024  
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **08 de abril de 2024** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **PAZ MARTÍNEZ ANTONIO DE JESÚS** con número de cuenta **410030936** con la tesis titulada **“Identificación de daño cromosómico numérico y estructural relacionado con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidenta: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Vocal: DRA. ROSA MARÍA ALVAREZ GÓMEZ  
Vocal: DR. FELIPE VACA PANIAGUA  
Vocal: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO  
Secretaria: DRA. LAURA BERRÓN RUÍZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de mayo de 2024

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO**



c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/JMB/EARR/jmb



## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al posgrado en Ciencias Biológicas, por haberme permitido ser parte del programa de maestría en Ciencias Biológicas y por supuesto a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater.
- Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca CONACYT762510 otorgada para la realización de esta Maestría en Ciencias Biológicas.
- El trabajo realizado en esta tesis de maestría fue llevado a cabo con el apoyo del proyecto “Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi”, contó con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT) proyecto IN205120 y del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento del proyecto con registro CF-2023-G-800.
- A mi comité tutorial por haberme escuchado y leído, así como todas los aportes y correcciones que me hicieron:
  - Dra. Sara Frías quien fue mi tutora principal y me apoyó y enseñó muchísimo, siempre estaré agradecido y espero que más adelante podamos seguir colaborando y/o trabajando juntos.
  - Dra. Laura Berrón Ruíz, muchas gracias por su paciencia y guía que me ayudó muchísimo a poder continuar.
  - Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco, sin duda todas las observaciones y cuestionamientos que me hizo ayudaron mucho a mejorar el proyecto y fortalecer mi formación académica, sinceramente gracias.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al laboratorio de Citogenética del INP por su valioso apoyo, sin el cual hubiera sido imposible realizar este proyecto (proyecto aprobado por el Comité de Investigación y de Ética del INP, número de registro: 2020/012), especialmente a Ulises Rodríguez, Leda Torres, Enya Martínez, Pedro Reyes, Marco Mejía, Silvia Sánchez, Sandra Ramos, Bertha Molina, Moisés Fiesco-Roa, Benilde García de Teresa y por supuesto a mi tutora Sara Frías.

Al laboratorio de microscopia ADMiRA (Advanced Microscopy Applications Unit) del INCan a cargo del Dr. Alejandro López Saavedra, así como a la Dra. Eunice Fabián y Adriana Gudiño.

Al Dr. Montañón por su ayuda y consejos.

A la Dra. Ericka Rendón por su paciencia y todo lo que me enseñó.

A la maestra Alicia Cervantes por abrirme los ojos al mundo de la citogenética y todas las cosas que ignoraba.

A mis maestros y maestras del diplomado de Citogenética Humana del Hospital General: Gina, Adriana, Rosy, Laura, Adrián y Alejandro, porque sentaron las bases.

A la Unidad de Genética Aplicada, donde consolidé la mayor parte de mis conocimientos sobre citogenética, especialmente a la Dra. Dora Gilda Mayén, Ricardo Meléndez y Eva Ramírez, realmente valoro todas sus enseñanzas. A mis excompañeros Edgar, Marlene, Luz, Moy, Jackie, Noemy, Robert, Héctor, Gaby, Andrea y claro a Juanin (QEPD), por sus enseñanzas, pasé muy buenos momentos con ustedes.

Al laboratorio Akrivia y su ayuda para lograr este proyecto, Karem Nieto, Sara Martínez y Carlos Velasco. Fueron retos muy grandes, pero también de mucho aprendizaje, gracias por la confianza. Gracias, también a mis excompañeras Anita, Valeria y Sarita, hicieron más llevaderos todas las dificultades y estrés que se vivió durante la pandemia.

A LAGEM, David Sosa y Anette Rivera por permitirme continuar y prestarme ayuda con los M-FISH, por sus consejos y conocimiento. También a Fer, Diana, Naye (por tu comprensión), Caro, Ángeles (por ayudarme con mis bandas), Vero, Yos (también por ayudarme con mis bandas), Caleb, Ale, Andrea, Ángela, Faby, Elena, por el día a día y todo lo bueno que me han aportado.

Al laboratorio de Citogenética, encabezado por mi tutora la Dra. Sara Frías y su equipo de trabajo, que me han guiado y enseñado con mucha paciencia, Chivis, Bertha, Sandra, Ulises, Leda, Enya, Moy, Benilde, Marco, Pedro, MaryPaz y Charly, sin su ayuda no hubiera sido posible.

Agradezco a los pacientes y espero haber contribuido un poco a mejorar su calidad de vida.

A los amigos que han estado conmigo durante todo este tiempo: Erick, Elian, Fabian, Misael, Apa, Vicente, Olaf, tronquitos (Fernanda Ramírez). Las pláticas y risas siempre alivianando.

A mi suegra Ana Cristina, por su invaluable apoyo y cariño.

A mi suegro Arnulfo por sus consejos y preocupación.

Al gym, porque me devolvió algo que ya había perdido y claro también a mis entrenadores:  
1) Canotaje, Ávila y Alex; 2) Buceo, el equipo de la Fac. de Ciencias y Jack y 3) Box, Omar, sinceramente me han ayudado mucho.



## **Dedicatoria**

*A mi madre Ma. Guadalupe Martínez García, a mi padre Antonio Paz Vázquez, quienes me dieron todo y me han apoyado en todo momento, siempre los tengo en mi mente.*

*A mis hermanas Laura, Claudia, Diana, Brenda y hermanos Luis, Oscar y Paco que me han acompañado desde pequeño; por supuesto también a mis sobrinitos Mateo, Dany, Itzoe, Enid y esperando al bebé de Diana.*

*A Adriana Lucía Chávez Jiménez, mi amada, compañera, mejor amiga, mi gymsis, mi confidente, mi paño de lágrimas, te amo tanto, gracias por tanto y espero que pasemos mucho tiempo disfrutando la vida juntos.*

# ÍNDICE

## Contenido

Resumen .....	1
Abstract .....	3
Marco teórico .....	5
Introducción .....	5
Anemia de Fanconi .....	6
Características clínicas de pacientes con AF .....	6
La vía FA/BRCA .....	7
Genes de la vía AF/BRCA .....	7
Función de la vía FA/BRCA .....	10
La inestabilidad cromosómica como resultado de la falla de la vía FA/BRCA .....	11
Diagnostico citogenético de AF mediante inducción de aberraciones cromosómicas .....	12
Características del envejecimiento .....	13
Inestabilidad genómica .....	13
Disminución de células troncales .....	14
Inflamación crónica .....	14
Anemia de Fanconi y envejecimiento .....	15
Alteraciones genómicas relacionadas con cáncer en pacientes AF .....	16
Anormalidades clonales en AF .....	16
Análisis de daño cromosómico mediante M-FISH (Multicolor-Fluorescent in situ hybridization). .....	17
Análisis de daño genómico mediante el estudio de firmas mutacionales .....	17
Planteamiento del problema .....	18
Justificación .....	18
Pregunta de investigación .....	19
Hipótesis .....	19
Objetivo General .....	19
Objetivos Particulares .....	19
Método .....	20
Diseño del estudio .....	20
Población de estudio .....	20

Criterios de inclusión.....	21
Criterios de exclusión .....	21
Estrategia de estudio .....	21
Técnicas .....	24
Método citogenético con bandas GTG en médula ósea.....	24
Siembra.....	24
Cosecha.....	24
Preparación de laminillas para análisis microscópico.....	24
Bandeo.....	25
Análisis citogenético .....	26
Método M-FISH.....	28
Siembra.....	28
Cosecha.....	28
Preparación de laminillas para análisis microscópico.....	28
Tratamiento pre-hibridación .....	29
Desnaturalización de la sonda e hibridación .....	29
Lavados post-hibridación.....	29
Contratinción .....	30
Análisis.....	30
Detalle técnico del M-FISH .....	32
Extracción de ADN a partir de sangre periférica y médula ósea .....	36
Método de firmas mutacionales.....	38
Preparación del entorno de trabajo.....	38
Preprocesamiento de los archivos FASTQ.....	38
Anotación y calibración de las lecturas contra genoma de referencia.....	38
Identificación de variantes somáticas .....	38
Obtención de firmas mutacionales.....	38
Análisis de firmas mutacionales.....	39
Resultados.....	39
Población de Estudio.....	39
Datos generales de los pacientes .....	39
Resultados de los tres ensayos en 5 pacientes con AF. ....	42
Paciente 1 - FANC170 - 9 años - LMA.....	42

Paciente 2 - RAFMex0005 – 7.2 años – Falla medular leve .....	43
Paciente 3 - RAFMex0006 - 5.5 años – Falla medular leve .....	44
Paciente 4 - RAFMex0007 – 9.7 años – Falla medular moderada .....	45
Paciente 5 - RAFMex0008 – 11.7 años – Falla medular leve.....	46
Correlaciones en 5 pacientes con los 3 ensayos .....	47
Resultados de bandas G en 15 pacientes. ....	48
Paciente 1 - RAFMex0029 – 5.5 años – Falla medular leve .....	48
Paciente 3 - RAFMex0009 – 6.3 años – Falla medular moderada.....	49
Paciente 4 - RAFMex0010 - 6.7 años – Falla medular moderada.....	50
Paciente 5 - RAFMex0005 – 7.2 años – Falla medular leve.....	50
Paciente 6 - RAFMex0026 – 12 años - Falla medular grave .....	51
Paciente 7 - RAFMex0002 – 8.3 años – Sin falla medular.....	51
Paciente 8 - RAFMex0011 – 8.9 años - Falla medular moderada .....	52
Paciente 9 - FANC170 - 9 años – LMA, post primer quimioterapia .....	52
Paciente 10 - RAFMex0007 – 9.7 años – Falla medular moderada .....	53
Paciente 11 - RAFMex0008 – 11.7 años – Falla medular leve .....	53
Paciente 12 - RAFMex0018 – 13.3 años - Falla medular moderada .....	54
Paciente 13 - RAFMex0031 – 13.8 años – SMD.....	54
Paciente 14 - RAFMex0015 – 17.3 años – SMD.....	55
Aberraciones cromosómicas por caso bandas GTG.....	56
Frecuencia de aberraciones por cromosoma en todos los casos bandas GTG en MO .....	58
Panorama de todos los tipos de aberraciones encontradas en los pacientes AF en MO. ....	59
Frecuencia de aberraciones clonales y no clonales en pacientes AF .....	60
Correlaciones en bandas GTG .....	61
Daño genómico detectado por firmas mutacionales.....	62
Firmas de sustitución de una base (SBS).....	62
Firmas de sustitución de doble base (DBS) .....	65
Firmas de inserciones y deleciones (ID).....	67
Firmas de inserciones y deleciones (ID).....	69
Tabla 6. Resumen de la etiología de las firmas mutacionales encontradas en pacientes AF....	70
Discusión .....	71
Conclusiones.....	77
Limitaciones de este estudio. ....	78

Perspectivas.....	78
Referencias bibliográficas.....	79
Anexos.....	86
I.-Tabla 29. Resumen de todos los datos.....	86
II.- Cartas de consentimiento y asentimiento informado.....	89
III.- Aprobación del Proyecto por el comité de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría	98

## Abreviaturas

ACE: Aberraciones cromosómicas estructurales

a-CGH: Hibridación genómica comparativa en arreglo

aNHEJ: Vía alterna de unión de extremos no homólogos

AF: Anemia de Fanconi

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

AMP: Adenosin monofosfato

BRCA: Breast cancer gene, alusión a la vía FA/BRCA

C1q: primer componente implicado en la activación del complemento

CCL3: Quimiocina con especificidad para receptores CCR1 y CCR5

CHIP: Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado

CIN: Inestabilidad cromosómica que puede ser numérica (N-CIN) o estructural (S-CIN)

CMA: chromosomal microarray (microarreglo de cromosomas)

cNHEJ: Vía canónica de unión de extremos no homólogos

CpG: Islas, regiones del ADN relacionadas con promotores, donde la citocina esta seguida de una guanina y hay un fosfato entre ellas

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DBS: Sustitución de dos bases

DEB: diepoxibutano

DNMT3: ADN metiltransferasa 3

EME1: Estructura meiótica esencial 1

ERCC1: Complemento cruzado de reparación de escisión 1

ERCC4: Complemento cruzado de reparación de escisión 4

FAAP: Proteína asociada a Anemia de Fanconi

FANCA-FANCW: Nombre de los genes que están involucrados en la vía FA/BRCA.

FISH: Hibridación in situ con fluorescencia

FM: Falla medular

GDF11: Factor de diferenciación de crecimiento 11

GH: Hormona del crecimiento

GnRH: Hormona liberadora de la gonadotropina

ECiC: Enlaces cruzados inter-cadenas

ID: Insertion- deletion (inserciones y deleciones)

ID2: Complejo ID 2 de la vía FA/BRCA que se monoubiquitina y canaliza hacia la reparacion por recombinación homologa

IGF-1: Factor de crecimiento parecido a insulina 1

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1  $\beta$

IL-37: Interleucina 37

IL-6: Interleucina 6

INDELS: Inserciones y deleciones

ISS: Señalización de la insulina e IGF-1

KCl: Cloruro de potasio

mADN: ADN mitocondrial

M-FISH: Hibridación in situ con fluorescencia múltiple

MHF1/MHF2: Complejos proteicos contenedores de histonas plegadas

MIP-1  $\alpha$ : Proteína inflamatoria de macrófagos

MMEJ: Unión de extremos mediada por microhomología

MMR: Reparación por mal apareamiento de bases

MO: Médula ósea

MUS81: Subunidad de endonucleasa específica de estructura

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido+

NER: Reparación por escisión de nucleótidos

NHEJ: Reparación por unión de extremos no homólogos (non homologous end joining)

PALB2: Pareja y localizador de BRCA2

PB: Peripheral blood

PBS: Phosphate buffered saline (solución salina amortiguada)

PHENOS: skin Pigmentation, small Head, Nervous system, Otology y Short stature

RDH: Ruptura de doble hebra

RH: Recombinación homóloga

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute

SP: Sangre periférica

SABG: Beta galactosidasa asociada a senescencia

SASP: Fenotipo secretor asociado a senescencia

SBS: Sustitución de una sola base

SMD: Síndrome mielodisplásico

SNV: variables de un solo nucleótido (single nucleotide variant)

SSC: solución saline-sodium citrate

TAZ: Coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ

TET2: Metilcitosina dioxigenasa 2 TET

TGF-  $\beta$ : Factor de crecimiento transformante tipo beta

TIMP2: Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 2

STL: Síntesis translesión

VACTERL-H: Vertebral, Anal, Tracheo-esophageal fistula, Esophageal atresia, Renal, upper limb y Hydrocephalus

VEFG: Factor de crecimiento endotelial vascular

VP: variantes patogénica



## Resumen

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad genética con una clínica y genética heterogénea. Clínicamente, se caracteriza por presentar falla de la médula ósea (MO), anomalías congénitas y predisposición a cáncer hematológico, como Síndrome mielodisplásico (SMD) y Leucemia mieloide aguda (LMA) y tumores sólidos como cáncer de cabeza y cuello. La AF se debe a variantes patogénicas en alguno de los 22 genes que forman parte de la vía FA/BRCA y cuya función es la de reparar enlaces covalentes cruzados en el ADN, de una manera libre de error. Los pacientes AF, en los cuales esta vía no funciona, utilizan vías propensas a error que conducen a un fenotipo de inestabilidad cromosómica clásico, incremento en la inflamación, disfunción mitocondrial y epigenética alterada. Debido a esta deficiencia en la reparación, los pacientes AF desarrollan padecimientos que en la población general se presentan en edades avanzadas como son tumores hematológicos, tumores sólidos y la propia falla medular, por lo que algunos autores han propuesto que los pacientes AF presentan un envejecimiento prematuro.

El envejecimiento se define como el declive funcional dependiente del tiempo, que conduce al desarrollo de patologías crónicas como cáncer, diabetes, alteraciones cardiovasculares, etc., que aumentan la vulnerabilidad del individuo y lo conducen a la muerte. En los últimos años se han descrito 12 características del envejecimiento que han permitido delimitar y comprender mejor los mecanismos moleculares del mismo. De estas características, la inestabilidad genómica es una de las características celulares de los pacientes AF. La identificación de daño genómico se puede realizar por métodos citogenéticos como el análisis de bandas G y M-FISH que detectan daño cromosómico numérico y estructural en el momento actual, y métodos genómicos como la secuenciación y las firmas mutacionales que permiten evidenciar daño genómico a nivel de cambios de secuencia de diversos orígenes, acumulado a través del tiempo. El objetivo de este trabajo fue determinar si en los pacientes con anemia de Fanconi existe daño genómico expresado como alteraciones cromosómicas y firmas mutacionales y si el tipo y cantidad de daño genómico correlaciona con la edad de los pacientes.

En este proyecto de tesis, se revisaron los cromosomas de médula ósea con bandas GTG en 15 pacientes con AF, los cromosomas de sangre periférica por M-FISH en 5 pacientes con AF y las firmas mutacionales de 10 pacientes con AF, con rangos de edad entre 5,5 años y 22 años, con una mediana de 9. Se encontró daño cromosómico en todos los pacientes, 4/15 pacientes mostraron aberraciones clonales, de los cuales 3/15 progresaron a LMA/SMD. Con respecto a las firmas mutacionales, se localizaron las firmas ID83, DBS78A y SBS96A/SBS96B, estas tres *de novo* son únicas que pueden ser posibles firmas de pacientes con AF. ID83 y DBS78A están compuestas por las firmas ID10 y DBS11 que en la literatura no tienen etiología propuesta. Se hallaron también SBS96A compuesta por SBS46, SBS5 y SBS29, así como

SBS96B compuesta por SBS5, SBS42, SBS29 y SBS1; entre ellas, 1 y 5 se han asociado con el envejecimiento y llama la atención encontrarlas en pacientes jóvenes; la 5 en particular estuvo presente en la mayoría de las muestras en una proporción significativa. Respecto a la firma 29, se ha asociado a la presencia de nitrosaminas, un compuesto que se encuentra en múltiples alimentos procesados y el tabaco; se sabe que ambas sustancias causan la formación de aductos, justamente un tipo de lesiones que los pacientes AF no pueden reparar y que pueden tener varios orígenes. La SBS42 se asocia a exposición ocupacional a haloalcanos que en nuestros pacientes podría estar reflejando daño por aldehídos endógenos. La firma 46 se atribuye a artefactos de la secuenciación.

El análisis de la MO en 15 pacientes con el estudio de bandas GTG, reveló una correlación positiva significativa entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas clonales vs la edad del paciente, mientras que el estudio de los 10 pacientes con firmas mutacionales mostró una correlación negativa entre la edad vs el número de mutaciones puntuales.

Se encontró una correlación positiva entre la edad de los pacientes, y la frecuencia de daño genómico observado por aberraciones cromosómicas, tanto en MO como en SP, sin embargo, no se notó esta correlación con respecto al daño a nivel de mutaciones puntuales. Estos últimos hallazgos fueron inesperados, pero sugieren que la progresión clonal hacia cáncer en pacientes AF, podría estar determinada principalmente por pérdida y ganancia de grandes regiones de material cromosómico, más que por la presencia de mutaciones puntuales. Por lo anterior, sería conveniente realizar secuenciación de genoma completo para detectar variaciones estructurales. Indiscutiblemente es un resultado que merece investigación adicional.

Los resultados logrados en este trabajo apoyan la hipótesis de que los pacientes AF presentan envejecimiento prematuro ya que: A) a nivel cromosómico se observa una correlación positiva entre la frecuencia de aberraciones clonales y la edad. Estas aberraciones específicas se relacionan con la presencia de SMD/LMA, enfermedad asociada con edad avanzada; B) En todos los pacientes se encontraron en frecuencias elevadas, las firma 5, relacionada con envejecimiento, aun cuando la edad cronológica de los pacientes está en el rango de 5.5-22 años, con una mediana de 9 años.

## Abstract

Fanconi anemia (FA) is a genetic disorder with heterogeneous clinical and genetic features. Clinically, it is characterized by bone marrow failure (BMF), congenital anomalies, and predisposition to hematologic cancers, such as myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML), and solid tumors, such as head and neck cancer. FA is caused by pathogenic mutations in the 22 genes that are part of the FA/BRCA pathway, which is responsible for the error-free repair of double-strand breaks caused by covalent crosslinks in ADN. In FA patients in whom this pathway does not function, error-prone pathways are used, leading to a classic chromosomal instability phenotype, increased inflammation, mitochondrial dysfunction, and altered epigenetics. Due to this lack of repair, FA patients develop conditions that occur in the general population at an advanced age, such as hematologic tumors, solid tumors, and bone marrow failure itself; therefore, some authors have proposed that FA patients exhibit premature aging.

Aging is defined as the time-dependent functional decline that leads to the development of chronic pathologies such as cancer, diabetes, and cardiovascular disease, which increase the vulnerability of the individual and lead to death. In recent years, 12 characteristics of aging have been described, which have allowed us to delineate and better understand the molecular mechanisms of aging. One of these characteristics is genomic instability, which is one of the cellular characteristics of patients with FA. Genomic damage can be classified at different levels, and chromosomal and mutational damage are the most studied types of genomic damage. Cytogenetic methods, such as G-band analysis and M-FISH, detect actual numerical and structural chromosomal damage, and genomic methods, such as sequencing, detect changes in the ADN sequence, which can be analyzed through mutational signatures that indicate genomic damage of different types and origins accumulated over time. The aim of this work was to determine whether genomic damage, expressed as chromosomal alterations and mutational signatures, is present in patients with FA and whether the type and amount of genomic damage correlates with the age of the patients.

In this dissertation project, we examined the bone marrow chromosomes by GTG bands in 15 FA patients, the peripheral blood chromosomes by M-FISH in 5 FA patients, and the mutational signatures of 10 AF patients with ages ranging from 5.5 to 22 years, with a median of 9 years. We found chromosomal damage in all patients, and 4/15 patients showed clonal aberrations, of which 3/15 progressed to AML/MDS. Regarding the mutational signatures, we found the ID83, DBS78A, and SBS96A/SBS96B signatures. These three *de novo* signatures are unique signatures that may be possible signatures of FA patients. The signatures ID83 and DBS78A are composed of the signatures ID10 and DBS11, which have no proposed etiology in the literature. Signatures DBS96A is composed of signatures 46, 5, and 29 and

SBS96B is composed of 5, 42, 29 and 1; among them, signatures 1 and 5 have been associated with aging and it is striking to find them in young patients; signature 5 was present in almost all samples in a significant proportion. Signature 29 has been associated with the presence of nitrosamines, a compound found in many processed foods and tobacco. Both are known to cause the formation of adducts, exactly the type of lesions that cannot be repaired in patients with AF and that can have multiple origins. SBS42 is associated with haloalkanes exposure and in FA probably with endogen aldehydes. Signature 46 is attributed to sequencing artifacts.

In addition, the analysis of the 15 patients with GTG bands showed a significant correlation between the frequency of clonal chromosomal aberrations and the age of the patient, while the study of 10 patients with mutational signatures showed a negative correlation between age and the number of point mutations.

These data support the hypothesis that FA patients present premature aging, since A) at the chromosomal level, a positive correlation was observed between the frequency of clonal aberrations and age; these specific aberrations were associated with the presence of MDS/AML, a disease associated with advanced age. B) In all patients, signature 5, related to age, were found with high frequency, even when the chronological age of the patients was in the range of 5.5-22 years, with a median of 9 years.

Our results indicate that there is a positive correlation between the age of the patients (even when they are considered young due to their chronological age), and the frequency of genomic damage observed as chromosomal aberrations, both in BM and in PB, but this was not observed with respect to damage at the level of punctual mutations. These latter findings appear unexpected, but current evidence suggests that clonal progression to cancer in FA patients may be primarily determined by the loss and gain of large regions of chromosomal material, rather than by the presence of punctual mutations.

## Marco teórico

### Introducción

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad rara, con una prevalencia de 1 a 5 / 1,000,000 y se origina por variantes patogénicas en alguno de los 22 genes de la vía FA/BRCA, cuya principal función es la reparación de los enlaces covalentes cruzados en el ADN a través de la recombinación homóloga, una vía libre de error (Rodríguez y D'Andrea, 2017) .

La vía FA/BRCA se compone de más de 22 genes, denominados por letras de acuerdo con el tiempo de su descubrimiento (*FANCA-FANCW*); para su actividad se divide en tres complejos proteicos, el "core" o río arriba con 9 proteínas FANCA, el ID o central con 2 proteínas y el río abajo con 11 proteínas FANCA. Cuando la vía FA/BRCA no es funcional, se recurre a vías de reparación propensas a error como unión de extremos no homólogos, NHEJ (tanto canónica como alterna) (Moore y Haber, 1996; Pannunzio et al., 2018) o unión de extremos mediado por microhomología MMEJ (Scully et al., 2019), en lugar de la recombinación homóloga (RH), que es una vía libre de error, con el fin de rescatar la viabilidad celular, aunque a expensas de tener gran cantidad de daño genómico (Juárez-Figueroa et al., 2018; Rodríguez et al., 2019; Rodríguez y D'Andrea, 2017).

Este fenotipo celular se aprovecha para llevar a cabo el diagnóstico por la prueba de aberraciones cromosómicas inducidas por diepoxibutano (DEB). Este daño se puede identificar a nivel cromosómico, en donde es posible encontrar rupturas o aberraciones cromosómicas por reunión anormal (Sasaki y Tonomura, 1973; Schuler et al., 1969)

El daño genómico por su parte, se puede detectar a través de mutaciones puntuales, perfiles de expresión génica anormales o como cicatrices mutacionales; en particular éstas últimas permiten detectar aberraciones genómicas acumulativas (Niraj et al., 2019), como sustituciones de nucleótidos, duplicaciones, deleciones e indels que en conjunto pueden agruparse como una firma genómica particular que pueden servir como biomarcadores de respuesta a alteraciones de varios procesos como la reparación del ADN, replicación o exposición a agentes genotóxicos. Alexandrov et al. (2013, 2020), encontraron más de 30 firmas mutacionales que se relacionan con diferentes procesos mutacionales; por ejemplo, la firma SBS1 se corresponde con la edad ya que surge por la desmetilación de la 5 metilcitosina, que ocurre a tasas constantes a través del tiempo.

La obtención de las firmas se puede realizar mediante la secuenciación de nueva generación y tiene la ventaja de detectar daño genómico acumulado y en especial el origen de las alteraciones, como la exposición a agentes exógenos o endógenos, la deficiencia en alguno de los sistemas de reparación del ADN, o por envejecimiento. Las firmas mutacionales se descubrieron en diversos tipos de cáncer (a nivel de células somáticas afectadas) (Alexandrov et al., 2013, 2020; Rodríguez y D'Andrea, 2017) .

Si bien algunos autores han propuesto que la AF pudiera presentar envejecimiento prematuro (Brosh Jr., 2017; Che et al., 2017) hasta ahora no hay estudios que lo confirmen. En la AF, es posible que haya diferencias entre la edad biológica y la edad cronológica y que la variabilidad de entornos entre tejidos pudiera afectar diferencialmente la acumulación de daño y progresión del envejecimiento. En pacientes AF, las características clínicas son: falla de la médula ósea de manera temprana (aproximadamente a los 7 años), padecimiento que en individuos no-AF se observa como parte del envejecimiento normal; el síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide aguda en pacientes AF se desarrolla entre los 12 y 20 años de edad (Fiesco-Roa et al., 2019, 2022; Rochowski et al., 2012; Rosenberg et al., 2008), mientras que en la población general se observan después de los 65 años, los tumores sólidos por otra parte en AF se manifiestan entre los 26 y 30 años y en población no Fanconi se encuentran con menor frecuencia y en la adultez mayor (Fiesco-Roa, 2019). Todo esto sugiere que los pacientes AF podrían presentar envejecimiento prematuro, pero aún falta evidencia que soporte dicha afirmación.

### Anemia de Fanconi

La Anemia de Fanconi (AF), es una enfermedad rara, descrita inicialmente por el pediatra sueco Guido Fanconi en 1927 (Fanconi, 1927; Lobitz y Velleuer, 2006), con una prevalencia de 1 a 5 en 1,000,000 en EUA y se diagnostica generalmente cuando se presenta falla medular en una edad promedio de 7 años (Rosenberg et al., 2011; Sroka et al., 2020). Es tanto clínica como genéticamente heterogénea, los pacientes pueden tener anomalías congénitas que pueden afectar todos los órganos y además hay predisposición a cáncer. La característica molecular clave de la AF es la incapacidad de reparar enlaces cruzados intercadena (ECiC), lo cual conduce a una hipersensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales (sustancias que generan ECiC) que se manifiesta como aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), principalmente del tipo rupturas cromatídicas y figuras radiales y es esta característica lo que permite diagnosticar de manera confiable la AF (Auerbach, 2015; Giampietro et al., 1993; Molina et al., 2022).

### Características clínicas de pacientes con AF

Debe de sospecharse de AF en todos los niños que presenten múltiples anomalías, particularmente las que se agrupan en el fenotipo de los acrónimos PHENOS (skin Pigmentation, small Head, small Eyes, Nervous system, Otology y Short stature), y la asociación VACTERL-H (Vertebral, Anal, Cardiac, Tracheo-esophageal fistula, Esophageal atresia, Renal, upper Limb y Hydrocephalus (J. C. Barnes y Smith, 1978; Quan y Smith, 1973).

Las anomalías tipo PHENOS en un paciente con alguna malformación tipo VACTERL-H, deben orientar a una fuerte sospecha de AF, aún más si las anomalías que coexisten son del eje radial y renales (Fiesco-Roa et al., 2022).

Hasta un 79% de los pacientes AF tienen al menos alguna anomalía de cualquier tipo y las comúnmente observadas en un 27%-43% de los pacientes son: talla baja, defectos del eje radial, cambios en la pigmentación de la piel, malformaciones renales y microcefalia, todas ellas parte de PHENOS y VACTERL-H. Dado que la edad promedio a la que empiezan a encontrarse manifestaciones hematológicas en pacientes AF es a los 6.5 años de edad, las alteraciones del desarrollo juegan un papel muy importante, ya que están presentes desde el nacimiento y pueden orientar a un diagnóstico temprano, lo cual es de suma importancia al permitir acortar la odisea diagnóstica, que la familia busque, prevenga y maneje las morbilidades asociadas y a que haya un asesoramiento genético certero que brinde información acerca del padecimiento, pronóstico y riesgo de recurrencia (M. Fiesco-Roa et al., 2022).

Respecto a la asociación fenotipo-genotipo, se ha encontrado que los genes asociados con un mayor número de anomalías específicas fueron *FACNB*, seguido de *FACND2*, el complejo ID y los genes río abajo. Los pacientes con variantes patogénicas (VP) nulas muestran una mayor proporción de al menos una anomalía como malformación renal, microcefalia, estatura baja y la combinación de VACTERL-H cuando se compararon con los fenotipos hipomórficos (Fiesco-Roa et al., 2019).

La presentación de la falla medular (FM) es variable, pero tres de cada cuatro pacientes muestran evidencia de su desarrollo al menos de forma moderada en la primera década de la vida; en los pacientes con VP en los genes *FANCA*, *FANC* y *FANG*, el promedio de edad de presentación es a los 7.6 años (M. Fiesco-Roa et al., 2022; Sroka et al., 2020). Se ha hipotetizado que la presentación de la FM se debe principalmente al funcionamiento anormal de las vías de reparación del ADN, lo cual daña a las células troncales hematopoyéticas (Sroka et al., 2020), así como la presencia de ECiC y la hiperactivación de vías que suprimen el crecimiento y generan un ambiente proapoptótico como son la vía p53 y la del factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Rodríguez et al., 2021).

### La vía FA/BRCA

#### Genes de la vía AF/BRCA

Las VP de cualquiera de los 22 genes conocidos de la vía FA/BRCA causan AF y de acuerdo con el gen afectado se reconocen grupos de complementación que van desde *FANCA* hasta *FANCW*. Todos los genes *FANC* tienen una forma de herencia autosómica recesiva, a excepción de *FANCB* la cual es recesiva ligada al cromosoma X, y *FANCR* que tiene una herencia autosómica dominante (Bluteau et al., 2016; García-De-Teresa et al., 2020; Inano et al., 2017).

Las proteínas de los 22 genes de AF, junto con proteínas asociadas a AF, son coordinadas en una vía común de reparación de ECiC, que se ha denominado vía FA/BRCA. La cual está



encargada de realizar la detección y remoción de ECiC a través de las vías STL (síntesis translesión), NER (reparación por escisión de nucleótidos) y HR (recombinación homóloga), con una contribución menor de otras vías de reparación (Che et al., 2017).

Esta vía está fuertemente implicada en cáncer, ya que, se ha visto en personas que son portadores de mutaciones que se encuentran de manera heterocigota en genes de la vía FA/BRCA que tienen predisposición a cáncer (Nalepa y Wade, 2014), correspondiente con este hallazgo, estudios genómicos a gran escala han revelado la inactivación somática monoalélica de genes AF en cánceres esporádicos en pacientes que no tienen AF; por otro lado, está el hecho de que pacientes con AF tienen predisposición a varios tipos de cáncer, por ejemplo los pacientes con las mutaciones *FANCD1 (BRCA2)* y *FANCN (PALB2)* tienen susceptibilidad a leucemia mieloide aguda (LMA) y tumores embrionarios (neuroblastoma, meduloblastoma y tumor de Wilms), los pacientes con las mutaciones *FANCS (BRCA1)*, *FANCN (PALB2)* y *FANCD1 (BRCA2)* tienen susceptibilidad a cáncer de ovario y de mama y por último las mutaciones en los demás grupos de complementación tienen susceptibilidad a síndrome mielodisplásico (SMD), LMA y carcinomas de células escamosas (Wang y Smogorzewska, 2015).

Tabla 1.- Genes FANC descritos hasta la fecha, sus alias, localización citogenética, función, tipo de herencia y frecuencia en los pacientes con AF.

		Gen	Alias	Ubicación citogenética	Tipo de herencia	Frecuencia de pacientes (%)	Funciones moleculares
Genes mutados en pacientes AF	Complejo core FA	FANCA	/	16q24.3	Autosómica recesiva	64	Subcomplejo con FANG y FAAP20
		FANCB	/	Xp22.2	Recesiva Ligada a X	2	Complejo core FA; subcomplejo con FAAP100 y FANCL
		FANCC	/	9q22.32	Autosómica recesiva	12	Complejo core FA; forma un complejo cuaternario con FANCE, FANCF y FACND2
		FANCE	/	6p21.31	Autosómica recesiva	1	Complejo core FA, puente entre el complejo core AF y FACND2
		FANCF	/	11p14.3	Autosómica recesiva	2	Complejo core FA; requerido para interacciones entre FANCA, FANCC y FANCE
		FANCG	XRCC9	9p13.3	Autosómica recesiva	8	Complejo core FA; subcomplejo con FANCA y FAAP20; complejo con BRCA2, CRCC3 y FACND2
		FANCL	/	2p16.1	Autosómica recesiva	0.4	Dominio RING que contiene la ubiquitin ligasa E3 dentro del complejo core FA
		FANCM	/	14q21.2	Autosómica recesiva	0.1	Activación de checkpoint mediado por ATR; reclutamiento del complejo core FA y complejo BLM
	FANCT	UBE2T	1q32.1	Autosómica recesiva	0.1	Complejo core FA; enzima conjugadora de ubiquitin E2	
	ID2	FANCD2	/	3p25.3	Autosómica recesiva	4	Complejo ID2; múltiples funciones en la reparación de ICL y respuesta de nucleasas al estrés replicativo para procesar ICLs
		FANCI	/	15q26.1	Autosómica recesiva	1	Complejo ID2 monoubiquitinado recluta las proteínas de reparación y facilita la reparación de ICLs y respuesta al estrés replicativo
	FA/RH	FANCP	SLX4, BTBD12	16p13.3	Autosómica recesiva	0.5	Scaffold maestro y regulador de ERCC1Z-XPF, MUS81-EME1/2 y SLX1
		FANCD1	BRCA2	13q13.1	Autosómica recesiva	2	RH; estimula a la recombinasa RAD51; estabilización de la orquilla
		FANCI	BRIP1, BACH1	17q23.2	Autosómica recesiva	2	Interacción con BRCA1 que promueve la RH e inhibe STL; ATP-asa dependiente de DNA y helicasa 5'-3'
		FANCN	PALB2	16q12.2	Autosómica recesiva	0.7	RH; estimula la recombinasa RAD51; estabilización de la orquilla; una BRCA1 y BRCA2
		FANCO	RAD51C	17q22	Autosómica recesiva	0.1	RH
		FANCR	RAD51	15q15.1	Autosómica dominante	Rara	RH; estabilización de la orquilla
		FANCS	BRCA1	17q21.31	Autosómica recesiva	0.1	RH; evicción del complejo CMG(CDC45-MCM-GINS) en las orquillas detenidas inducidas por ICL
		FANCU	XRCC2	7q36.1	Autosómica recesiva	0.1	RH
	Genes recientes	FANCV	REV7, MAD2L2	1p36.22	Autosómica recesiva	Un paciente	Regula negativamente la resección de extremos del DNA; promueve la unión de extremos; modula la respuesta de PARP1
		FANCW	RFWD3	16q23.1	Autosómica recesiva	Un paciente	Ubiquitin ligasa E3 para regular el recambio de RPA y RAD51 durante la RH y la reparación de ICLs
		FANCQ	ERCC4, XPF	16p13.12	Autosómica recesiva	0.1	Inciación de DNA y NER
	Genes asociados a AF	FAAP10	STRA13, CENPX, MHF2	17q25.3	Autosómica recesiva	/	Complejo core FA; proteína que contiene motivo de histona; localización de FANCM en cromatina constitutiva
		FAAP16	APITD1, CE NPS, MHF1	1p36.22	Autosómica recesiva	/	Complejo core FA; proteína que contiene motivo de histona; localización de FANCM en cromatina constitutiva
		FAAP20	C1orf86	1p36.33	Autosómica recesiva	/	Estabilidad de FANCA; une la polimerasa REV1 a STL ubiquitinados
		FAAP24	C19orf40	19q13.11	Autosómica recesiva	/	Complejo core FA; interactúa con FANCM
		FAAP100	C17orf70	17q25.3	Autosómica recesiva	/	Complejo core FA
		FAN1	KIAA1018, MTMR15	15q13.3	Autosómica recesiva	/	Nucleasa; reinicio de orquillas de replicación detenidas
UAF1		KIAA1449, SPG60, P80, Bun62	3p22.2	Autosómica recesiva	/	Deubiquitinización de ID2	
UHRF1		ICBP90	19p13.3	Autosómica recesiva	/	Reconocimiento de la lesión	
USP1		HUBP	1p31.3	Autosómica recesiva	/	Deubiquitinización de ID2	

Safraim M, Rosen N, Twik M, BarShir R, Iny Stein T, Dahary D, Fishilevich S, and Lancet D. The GeneCards Suite Chapter, Practical Guide to Life Science Databases (2022) pp 27-56 [PDF]. Wang, A. T., & Smogorzewska, A. (2015). SnapShot: Fanconi anemia and associated proteins. Cell, 160(1), 354-354. Niraj, J., Färkkilä, A., & D'Andrea, A. D. (2019). The Fanconi anemia pathway in cancer. Annual review of cancer biology, 3, 457-478. García-de-Teresa, B., Rodríguez, A., & Frias, S. (2020). Chromosome instability in Fanconi anemia: from breaks to phenotypic consequences. Genes, 11(12), 1528.

### Función de la vía FA/BRCA

La reparación de ECiC mediada por la vía FA/BRCA ocurre durante la fase S/G2, cuando las horquillas de replicación se encuentran detenidas en un ICL que impide separar el dúplex de ADN, los cromosomas ya están replicados y tienen dos cromátidas hermanas con ADN idéntico. Estas horquillas detenidas son la estructura intermediaria de ADN que se reconoce y estabiliza por la vía AF. Por el contrario, en células que no se están dividiendo, los ECiC se reparan a través de la vía NER, que puede ser global o estar acoplada a la transcripción. La eliminación de los ECiC se produce después de la activación de la vía AF en la fase S, gracias a la maquinaria de reparación y replicación que actúa de manera coordinada (Niraj et al., 2019).

Existen tres grupos principales de proteínas en la vía FA/BRCA que se clasifican según su función: en el primero se encuentran las "proteínas río arriba" e incluye a FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM y FANCT. El segundo, se denomina "Complejo ID2", está formado por FANCD2 y FANCI. Finalmente, el tercero se conoce como "proteínas río abajo" e incluye a FANCD1, FANCI, FANCO, FANCP, FANCO, FANCP, FANCO, FANCR, FANCS, FANCU, FANCV y FANCW. Las proteínas río arriba tienen la función de detectar el daño y activar la monoubiquitinización del complejo ID. Una vez activado este complejo, atrae a las proteínas río abajo al lugar de la lesión, donde se llevan a cabo procesos como la escisión de nucleótidos, la síntesis translesión, la escisión del aducto y el proceso de recombinación homóloga (Rodríguez y D'Andrea, 2017).

Los ECiC se detectan tanto por la proteína UHRF1 como por el complejo FANCM-MHF1-MHF2, el cual posteriormente recluta al heterodímero FANCD2-I (ID2) y al complejo central al sitio de lesión. El complejo central, está compuesto por diez proteínas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FAAP100, FAAP20 y FAAP24), y tiene una función de ubiquitin E3 ligasa, que en conjunto con FANCT/UBE2T catalizan la monoubiquitinación del complejo ID2. Es importante destacar que la estabilidad del complejo central es esencial, ya que, si se pierde alguna de las proteínas que lo conforman, el complejo puede perder su habilidad para realizar la ubiquitinización. Este escenario llevaría a una falta de ubiquitinización del complejo ID2, que es responsable de controlar la escisión nucleolítica del ADN, liberando el ICL de una de las hebras parentales mediante un proceso llamado "unhooking". Asimismo, este complejo realiza la translocación a los sitios de daño, lo que provoca el reclutamiento de los efectores río abajo en la fase S/G2. Una vez que el complejo ID2 ha sido ubiquitinado, actúa como anclaje del dímero a la cromatina y de FANCP/SLX4, que a su vez funciona como sitio de andamiaje para los cuatro diferentes tipos de endonucleasas específicas. Estas endonucleasas realizan un corte endonucleolítico hacia 3'-5' del ICL, y son FANCO-ERCC1, ERCC4-ERCC1, MUS81-EME1 y SLX1. Es importante destacar

que toda esta actividad genera tres tipos de lesiones que requieren ser reparadas de manera diferente (Dong et al., 2015; Muniandy et al., 2010; Rodríguez y D'Andrea, 2017).

- A) Segmentos de hebra sencilla de ADN: durante la síntesis translesión (STL), se produce una reparación de segmentos de hebra sencilla de ADN, en la que se insertan nucleótidos en el sitio de la lesión y se permite la extensión de la nueva cadena de ADN, proceso que es llevado a cabo con la ayuda de la polimerasa de STL conformada por REV1 y POL $\zeta$ , la cual a pesar de que es propensa a error, logra recuperar la doble hélice.
- B) Aducto: la lesión se forma en la cromátida donde se llevaron a cabo los cortes endonucleolíticos y una vez que se ha completado la STL en la cadena opuesta, el aducto se elimina mediante la reparación por escisión de nucleótidos (NER), que utiliza la nueva cadena de doble hebra de enfrente como molde.
- C) Ruptura de doble hebra: la ruptura de doble hebra (RDH) se produce en la cromátida opuesta al aducto y se repara principalmente por RH o por c-NHEJ. La elección del tipo de reparación depende de la fase del ciclo celular en la que se encuentra la célula. Durante la fase S/G2, se prioriza la RH. En la RH, las proteínas FANC rio abajo, incluyendo FANCD1/BRCA2 y FANCN/PALB2, se asocian con la cromatina mientras que FANCR/RAD51 y sus parálogos FANCO/RAD51C, remplazan a la proteína RPA que recubre la hebra sencilla de ADN, esto promueve la formación de nucleofilamentos que invaden la cromátida hermana y la utilizan como molde para sintetizar el ADN de reparación.

La inestabilidad cromosómica como resultado de la falla de la vía FA/BRCA

En los pacientes AF la vía FA/BRCA no funciona correctamente, por lo que se utilizan vías de reparación alternas como son la unión de extremos no homólogos canónica (cNHEJ) y la vía alterna de unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), estas vías conducen a la formación de ACE debido a que son propensas a error (Che et al., 2017; Liu et al., 2020).

La formación de ACE requiere la ruptura y posterior reunión de moléculas de ADN, por lo que las RDH se consideran el origen de las mismas. Las ACE pueden ser de dos tipos: reunidas y no reunidas. Las ACE no reunidas son las rupturas cromatídicas y cromosómicas. Las rupturas cromatídicas resultan de una reparación incompleta de una lesión de entrecruzamiento del ADN. Este tipo de rupturas se forman durante la fase postreplicativa de la célula, lo que significa que solo una cromátida se ve afectada. En cambio, si la ruptura es cromosómica, entonces esta debió formarse durante la fase G1. En las células AF, lo más probable cuando se encuentra una ruptura tipo cromosómica, es que sea el resultado de dos RDH muy cercanas, cada una en una cromátida, lo que se denomina ruptura isocromatídica.

En general, las rupturas isocromatídicas son menos frecuentes que las rupturas cromatídicas. (García-De-Teresa et al., 2020).

Las ACE reunidas corresponden a las translocaciones, cromosomas dicéntricos, figuras radiales y cromosomas marcadores; se originan cuando dos extremos rotos de ADN se unen con poca o ninguna homología. La formación de estas ACE implica la actividad de las vías de reparación del ADN conocidas como cNHEJ y MMEJ, que operan principalmente durante S/G2 del ciclo celular, cuando el cromosoma replicado está compuesto por dos cromátidas hermanas. En estas fases, la unión de una de estas cromátidas con una cromátida no hermana de otro cromosoma (ya sea homólogo o no homólogo) dará origen a las ACE reunidas mencionadas anteriormente (Groot et al., 2023).

Las figuras radiales derivan de un procesamiento aberrante o incompleto de RDH por MMEJ (Rogers et al., 2023; Siri et al., 2021) y se nombran según el número de brazos cromosómicos involucrados. Los cuadriradiales surgen cuando al menos dos RDH de cromátidas no hermanas se unen. En estas dos RDH, hay cuatro extremos de ADN disponibles, y si estos cuatro extremos son reunidos por una maquinaria propensa a errores como la NHEJ, se genera una figura tetraradial cerrada. Por otro lado, una figura triradial se forma cuando hay tres RDH, una de ellas en una cromátida del cromosoma receptor y dos más del tipo de ruptura isocromatídica en el segundo cromosoma para unirse a una cromátida del cromosoma receptor. Por lo tanto, las figuras poliradiales, como su nombre lo indica, requieren la unión de varias RDH para su formación (García-De-Teresa et al., 2020).

Además de las ACE ya mencionadas, hay aberraciones numéricas como son las aneuploidías y la poliploidización. También se sabe que las células AF tienen alteraciones en la duración del ciclo celular, lo cual puede provocar nuevos ciclos de replicación en la ausencia de mitosis y citocinesis (García-De-Teresa et al., 2020), lo que lleva a la endoreduplicación de cromosomas, por esto, es común encontrar células tetraploides y figuras mitóticas con cromosomas endoreduplicados con cuatro cromátides en lugar de dos (Sasaki y Tonomura, 1973; Schroeder et al., 1964). Los pacientes AF también tienen alterado el punto de control del huso mitótico, lo cual se manifiesta en una segregación inadecuada de cromosomas, así como una resolución de puentes de ADN ineficiente (Nalepa y Wade Clapp, 2014).

Diagnostico citogenético de AF mediante inducción de aberraciones cromosómicas  
La hipersensibilidad de los pacientes con AF a los agentes inductores de ECiC, ha servido para establecer una prueba citogenética capaz de diagnosticar con certeza a cualquiera de los pacientes AF. Los compuestos que se usan para inducir las aberraciones son la mitomicina C (MMC), el diepoxibutano (DEB) y cisplatino, siendo este último el que más ampliamente se usa en el mundo. El análisis se puede realizar en sangre periférica, en médula ósea, fibroblastos de piel, vellosidades coriales, amniocitos y sangre fetal. En todos los casos debe

incluirse un control positivo que son, ya sea una línea linfoblastoide o una línea de fibroblastos, ambas positivas a AF, y un control negativo que puede ser fibroblastos de una línea celular corregida, fibroblastos de una persona sana, línea celular linfoblastoide corregida o muestra de sangre periférica de personas sanas (Molina et al., 2022). El análisis se realiza en metafases sin bandeado, ya que las bandas evitan visualizar todas las rupturas en los cromosomas. Se determina en cada metafase el número cromosómico y el tipo de aberraciones. Se cuantifican las roturas cromatídicas y cromosómicas o isocromatídicas, los fragmentos céntricos y acéntricos, anillos, dicéntricos, figuras radiales y “otras”. Un paciente es diagnosticado como positivo para AF si la frecuencia de aberraciones cromosómicas es 10 veces mayor a la que se obtiene en el cultivo sin tratamiento y a la del control negativo (Molina et al., 2022).

### Características del envejecimiento

El envejecimiento puede ser definido de manera amplia, como el declive funcional tiempo-dependiente que afecta a casi todos los organismos vivos. Recientemente ha sido objeto de escrutinio científico debido a los grandes avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de la vida. López-Otín et al. (2013, 2023) han conceptualizado la esencia del envejecimiento y sus mecanismos y proponen las 12 características del envejecimiento que se pueden subdividir en tres grandes grupos, los cuales son; a) características primarias: inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, pérdida de proteostásis; b) antagonistas: senescencia celular, disfunción mitocondrial, detección desregulada de nutrientes y c) integrativos: disminución de células troncales, comunicación celular alterada, inflamación crónica y disbiosis.

Para algunas de estas características, su presencia está confirmada en la AF y a continuación, se describen las que más relación tienen con este proyecto.

### Inestabilidad genómica

La integridad y estabilidad del ADN, está siendo continuamente retada por agentes exógenos físicos, químicos y biológicos, así como por insultos endógenos como errores en la replicación del ADN, reacciones hidrolíticas espontáneas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (López-Otín et al., 2013, 2023).

La CIN o inestabilidad cromosómica, se define como un incremento en la tasa a la cual fragmentos de cromosomas o cromosomas completos se pierden o se ganan y tiene un impacto profundo en la estabilidad del genoma al inducir constante y simultáneamente cambios en el número de copias en grandes grupos de genes. Las alteraciones cromosómicas asociadas con CIN pueden ser clasificadas en 1) Inestabilidad cromosómica numérica (N-CIN), que involucra pérdidas o ganancias de cromosomas enteros y 2) Inestabilidad cromosómica estructural (S-CIN) que involucra deleciones, amplificaciones, inversiones y translocaciones

de regiones cromosómicas que van en rango de tamaño desde genes hasta brazos de cromosomas completos. Por lo tanto, la CIN es un fenotipo dinámico que incrementa la probabilidad de adquirir la miríada de cambios genéticos relacionados con el desarrollo y progresión del cáncer y envejecimiento (Lepage et al., 2019).

En la AF, desde 1973 se detectó la CIN como una característica celular constante, que puede exacerbarse con la exposición a agentes que inducen ECiC (Sasaki y Tonomura, 1973).

#### Disminución de células troncales

Una de las características más evidentes del envejecimiento es la disminución en el potencial regenerativo de los tejidos (López-Otín et al., 2013; Shaw et al., 2010). Este proceso ocurre en prácticamente todos los compartimentos celulares y tejidos. Este declive en el potencial regenerativo se origina entre otras cosas, por la acumulación de daño al ADN, sobreexpresión de p16INK4a y el acortamiento de telómeros (Fumagalli et al., 2012; López-Otín et al., 2013).

Se ha propuesto que los aldehídos endógenos son la principal fuente de daño y agotamiento de células troncales hematopoyéticas en AF, además de la auto renovación limitada de células troncales por el *checkpoint* de diferenciación inducido por daño en el ADN. Por otro lado, las células troncales hematopoyéticas con daño que escapan de la dormancia reparan el ADN con mecanismos propensos a error, lo que resulta en un agotamiento de la reserva de células troncales, que se traduce en FM en los pacientes AF (Brosh Jr., 2017).

#### Inflamación crónica

Durante el envejecimiento hay un incremento en la inflamación, como se evidencia por la circulación de biomarcadores de inflamación y por las manifestaciones sistemáticas como la arteriosclerosis, neuroinflamación, osteoartritis y degeneración intervertebral. La inflamación puede ser desencadenada por diferentes mecanismos durante el envejecimiento como la translocación del ADN mitocondrial al citosol, especialmente cuando la autofagia, no funciona de manera adecuada (López-Otín et al., 2023). Otros procesos que aumentan la inflamación durante el envejecimiento son la aparición de hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) y el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)(López-Otín et al., 2023).

En AF la inflamación crónica es una de las principales causas de la FM, ya que existe una fuerte relación entre la inestabilidad genómica y la inflamación, incluyendo la producción de p53, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Landelouci y Sinha, 2022; Rodríguez et al., 2021), también en pacientes AF se sabe que existen células senescentes con SASP, lo que incrementa la inflamación (Brosh Jr., 2017). La aparición de clonas con potencial indeterminado también es un fenómeno ampliamente descrito en pacientes AF (Behrens et al., 2021).



## Anemia de Fanconi y envejecimiento

Al igual que la AF, algunas enfermedades genéticas monogénicas como el síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de Cockayne y Xeroderma pigmentosa son un grupo de patologías asociadas al envejecimiento a edades mucho más tempranas que en población normal. El común denominador es la falla en la reparación del ADN, lo cual sugiere que la inestabilidad genómica y la acumulación de daño genómico, son los principales factores que contribuyen a la homeostasis disminuida de las células troncales y el envejecimiento acelerado (Brosh Jr., 2017).

Se ha observado que la AF presenta características de envejecimiento acelerado como son: disfunción endócrina, osteoporosis, sarcopenia, deficiencias inmunes, síndrome mielodisplásico y cáncer. El SMD surge en población normal aproximadamente a los 70 años, mientras que en pacientes AF es alrededor de los 10 años; para la LMA, la edad de presentación en población general es alrededor de los 70 años, mientras que en pacientes AF es alrededor de los 30 años y en pacientes con mutaciones en FANCD1 y FANCN se presenta alrededor de los 5 años. En cuanto a la edad de aparición de los tumores de células escamosas de cabeza y cuello, en la población general es aproximadamente a los 60 años, mientras que en población AF se presenta entre los 30-40 años. Todo esto ha llevado a proponer que la AF es un desorden de envejecimiento prematuro segmental como los síndromes mencionados anteriormente (Brosh Jr., 2017).

Los pacientes con AF se caracterizan por un estado pro-oxidante, ya que el ADN muestra niveles elevados de 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG), un marcador de oxidación de bases. Adicionalmente, los pacientes AF muestran niveles incrementados de citocinas inflamatorias debido al daño persistente en el ADN y al daño oxidante, que funcionan como mediadores inflamatorios; de esta manera los pacientes con AF entran en un círculo vicioso, ya que el daño al ADN induce inflamación y la inflamación induce daño al ADN. El daño al ADN puede inducirse por aldehídos endógenos que causan enlaces covalentes cruzados en el ADN, y en condiciones normales se reparan por la vía FA/BRCA (Garaycochea y Patel, 2014).

El agotamiento de células troncales hematopoyéticas se hace evidente en los pacientes AF cuando aparece la FM, debido al daño al ADN, la hiperactivación del eje de respuesta al daño del ADN p53/p21, que lleva a un arresto del ciclo celular en las células troncales hematopoyéticas de AF (Brosh Jr., 2017). Estas deficiencias están interconectadas y actúan de manera sinérgica para causar defectos en las células troncales hematopoyéticas y FM, aunado a tumores de la sangre, problemas endócrinos, respuesta inmune deficiente, osteoporosis, y sarcopenia, todas ellas características del envejecimiento (Brosh Jr., 2017; García-De-Teresa et al., 2020).

## Alteraciones genómicas relacionadas con cáncer en pacientes AF

Las aproximaciones citogenéticas con bandas GTG, Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH) y CMA, detectan N-CIN y S-CIN. En padecimientos hemato-oncológicos es una importante herramienta para obtener información para guiar el tipo de tratamiento; en estudios de seguimiento, permite la detección de evolución clonal y de nuevos procesos malignos no relacionados al primer cáncer (Mikhail et al., 2016).

En pacientes AF, el estudio citogenético de la MO permite evaluar anormalidades citogenéticas comunes a los pacientes con AF y las relacionadas con el surgimiento de una clona anormal que podría evolucionar a SMD o LMA (Behrens et al., 2021; Sroka et al., 2020).

Una clona se define como (Arsham et al., 2017) :

- o Dos o más células teniendo la misma anormalidad estructural
- o Dos o más células teniendo el mismo cromosoma adquirido
- o Tres o más células teniendo la misma pérdida de cromosoma

## Anormalidades clonales en AF

Los resultados de análisis citogenéticos de los pacientes con AF han revelado una amplia variedad de tipos y frecuencias de clonas (Alter et al., 2000). Butturini et al. (1994) han identificado que el riesgo de desarrollar SMD o LMA dentro de los tres primeros años después de la observación de una clona es de aproximadamente 1 en 3 (33%), mientras que el riesgo para los pacientes sin clonas es de 1 en 30 (3%).

En pacientes con AF, las aberraciones cromosómicas recurrentes más frecuentes son la ganancia de material en el brazo largo del cromosoma 1 (1q+), ganancia de material cromosómico en el brazo largo de 3q (3q+) y pérdida total o parcial del cromosoma 7 (-7 o 7q-), de hecho estas aberraciones pueden constituir hasta el 75% de todas las aberraciones clonales que se han observado en pacientes con AF (Behrens et al., 2021; Mehta et al., 2010; Meyer et al., 2012; Rochowski et al., 2012; Tönnies et al., 2003). Estas aberraciones pueden presentarse solas o en combinación con alteraciones que involucren otros cromosomas (Cioc et al., 2017). En AF, la aberración 3q+, se asocia frecuentemente con -7 y ambas con la evolución hacia SMD (Sroka et al., 2020). El rol pronóstico de la ganancia cromosómica de 3q para predecir el riesgo de progresión hacia SMD o LMA se ha evidenciado en varios trabajos (Cioc et al., 2017; Mehta et al., 2010; Sroka et al., 2020; Vundinti et al., 2010), en algunos se ha podido precisar que el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer a tres años puede ser hasta de 9 en 10 (90%) comparado con 1 en 10 (10%) para pacientes sin estas alteraciones clonales (Tönnies et al., 2003).

Respecto a la ganancia de 1q, Behrens et al. (2021) encontraron que solo los pacientes con 1q+ que además tenían 3q+ o 7q- desarrollaron neoplasia, mientras que los pacientes con 1q+ aislado o en combinación con otras aberraciones como 6p- o 7p-, no progresaron a neoplasia mieloide dentro del periodo de observación. Sin embargo, recientemente Sebert et al. (2023) reportaron elegantemente, que la ganancia del brazo largo del cromosoma 1, aberración que es de las más frecuentes y tempranas en la historia natural de la FM de pacientes AF, define una ruta hacia la leucemia, al conducir a hematopoyesis clonal debido a una triple dosis del gen *MDM4*, el cual es un regulador negativo de p53 por lo que inhibe la señalización que conduce a la apoptosis. Esta alteración confiere una ventaja selectiva a la clona, que posteriormente puede evolucionar hacia cáncer por la adquisición de nuevas lesiones oncogénicas.

#### Análisis de daño cromosómico mediante M-FISH (Multicolor-Fluorescent in situ hybridization)

El M-FISH permite la visualización simultánea de cada par cromosómico en un color diferente (Arsham et al., 2017), esto permite aumentar la detección de múltiples rearrreglos crípticos, translocaciones complejas, inserciones y amplificaciones respecto al bandeo cromosómico. Se ha usado para investigar la presencia de clonas, Cioc et al. (2017) lo utilizaron en 119 pacientes con AF y encontraron anomalías clonales en el 32.4% de los pacientes, el 77.8 de éstos tuvieron ganancia de 1q, ganancia de 3q y/o delección de 7q, monosomía 7; en conjunto estas aberraciones suman el 56% del total de las anomalías clonales. Sin duda, la identificación de estas alteraciones ha sido más eficiente cuando se utilizan metodologías como M-FISH.

#### Análisis de daño genómico mediante el estudio de firmas mutacionales

Las firmas mutacionales son patrones característicos que se pueden encontrar en la secuenciación de ADN de los diferentes tipos de cáncer o tejidos. Desde una perspectiva biológica, una firma mutacional refleja la actividad de procesos mutacionales originados de manera tanto endógena como exógena (Alexandrov et al., 2013, 2020). Esta herramienta se desarrolló al utilizar modelado matemático y análisis computacional a partir de datos de secuenciación masiva. Es importante hacer notar que una firma mutacional es matemática y conceptualmente diferente de un patrón mutacional del genoma del cáncer. Un patrón mutacional del genoma del cáncer puede ser observado directamente en los datos de la secuencia, una firma mutacional no es observable directamente en la mayoría de los casos, en su lugar, una firma mutacional corresponde a una abstracción que surge a través de una serie de aproximaciones numéricas (Alexandrov et al., 2020).

Al observar los patrones mutacionales de cientos de cánceres, fue posible identificar tres diferentes categorías: sustitución de base única o SBS por sus siglas en inglés, sustituciones

de doble base o DBS y pequeñas inserciones y deleciones denominadas en conjunto INDELS. Se han descrito 96 SBS, 78 DBS y 83 INDELS (ID) (Alexandrov et al., 2020). Para definir las categorías se considera que cada pirimidina puede sufrir dos transversiones y una transición, es decir, T>A, T>G, T>C, C>A, C>G y C>T, que resulta en 6 diferentes variantes de nucleótido único, las cuales si se consideran sus nucleótidos adyacentes hacia 3' y 5', tienen cuatro posibilidades diferentes y se genera un total de 96 combinaciones distintas (4x4x6) que se expresan en el eje de las X en las gráficas de las firmas mutacionales mientras que en el eje de las Y se representa el porcentaje de mutaciones totales (Alexandrov et al., 2013).

Estas firmas han permitido identificar muchos agentes etiológicos en tumores y en particular vale la pena mencionar la firma SBS1 que se asocia con la desaminación espontánea de la 5-metil-citosina que es una firma parecida a reloj, ya que es un indicador de envejecimiento. Por otro lado, está la firma SBS5 que también se considera una firma parecida a reloj, pero de la cual se desconoce su etiología; ambas se consideran asociadas a la edad biológica, por lo que se pueden utilizar para estudiar el envejecimiento por su origen y como indicador de acumulación de daño (Alexandrov et al., 2013, 2020; Phillips, 2018; Polak et al., 2017).

Las firmas mutacionales se pueden utilizar como un método indirecto para observar cómo aumenta el número de mutaciones *de novo* en la descendencia, conforme aumenta la edad de los padres y se relacionan principalmente con las firmas 1 y 5, que son firmas asociadas al envejecimiento. Estas firmas podrían estar presentes en pacientes con AF, si en efecto la AF genera un envejecimiento prematuro. Adicionalmente se podrían presentar otras firmas como por ejemplo las que se relacionan con defectos en la reparación del ADN (Kim et al., 2021).

### Planteamiento del problema

En pacientes con Anemia de Fanconi se desarrollan padecimientos propios de la vejez en edades tempranas, lo cual sugiere que hay un envejecimiento prematuro. Dicho envejecimiento prematuro puede acompañarse por un aumento en las aberraciones cromosómicas y la presencia y acumulación de daño mutacional en el ADN. Es posible que la acumulación de daño en el ADN juegue un papel importante en el envejecimiento, de manera que en un padecimiento como la AF, con CIN, es posible que la edad biológica de los pacientes sea diferente de la edad cronológica. Aunque se ha propuesto que la AF puede tener envejecimiento prematuro, por el momento no hay estudios que lo confirmen.

### Justificación

El envejecimiento es un proceso inherente a las especies superiores; se define como el declive funcional, dependiente del tiempo que conduce al desarrollo de patologías crónicas que aumentan la vulnerabilidad del individuo y lo conducen a la muerte. Debido a que la población humana mundial tiende a vivir cada vez más tiempo, los problemas inherentes al

envejecimiento se han tornado muy importantes y existe poco conocimiento sobre sus mecanismos, por lo que la generación de conocimiento sobre ellos es extremadamente importante para la sociedad actual. Se han descrito 12 características básicas del envejecimiento, que han permitido entender los mecanismos de este proceso y entre éstas se encuentra la inestabilidad genómica. Esta característica se manifiesta en pacientes con enfermedades de respuesta al daño al ADN, como la anemia de Fanconi. Esta enfermedad cursa también con características propias de la población de adultos mayores, aunque los pacientes sean pediátricos, por lo que, el poder vincular de manera directa la falla en la reparación del ADN con un aceleramiento del envejecimiento, sería una muy buena aportación al conocimiento básico y a la identificación de un modelo para envejecimiento prematuro.

## Pregunta de investigación

¿En los pacientes con AF se encuentran aberraciones cromosómicas y firmas mutacionales que se relacionen con envejecimiento prematuro?

## Hipótesis

- Los pacientes con anemia de Fanconi presentan una frecuencia de alteraciones cromosómicas y eventos de firmas mutacionales que incrementan con la edad, en células de médula ósea y sangre periférica.

## Objetivo General

Determinar si en los pacientes con anemia de Fanconi existe daño genómico expresado como alteraciones cromosómicas y firmas mutacionales y si el tipo y cantidad de daño genómico correlaciona con la edad de los pacientes.

## Objetivos Particulares

- Identificar daño cromosómico numérico y estructural mediante el ensayo de cariotipo con bandedo GTG y M-FISH y en muestras de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP) de los pacientes con anemia de Fanconi.

MO y SP.

- Determinar el tipo y cantidad de daño genómico, mediante la búsqueda de “firmas mutacionales” en MO y SP.
- Correlacionar la cantidad y tipo de daño genómico con la edad cronológica de los pacientes con AF
- Determinar si la presencia y cantidad de las firmas genómicas de envejecimiento, correlacionan con la cantidad de daño cromosómico numérico y estructural y/o con otras firmas genómicas asociadas a falla en la reparación del ADN, en (MO) y (SP) de los pacientes con anemia de Fanconi.

## Método

### Diseño del estudio

Tipo de estudio: Exploratorio

Según el objetivo: Analítico

Según la orientación: Transversal

Según el tiempo: Prospectivo

Según la intervención: observacional y correlacional

### Población de estudio

Universo de estudio

Pacientes con anemia de Fanconi diagnosticados por estudio citogenético

### Población objetivo

Pacientes diagnosticados con AF que acudan al instituto Nacional de Pediatría en el año 2021

Se determinó una n a conveniencia, ya que la incidencia de la AF es de 1-5 en un millón.

Los pacientes a los que fue posible acceder fueron un total de 15 con un rango de edad de 5.5-22 años, específicamente nueve en los primeros diez años de vida, cinco entre los 10 y 20 años y finalmente uno mayor a los 20 años.

Las muestras se solicitaron cuando el paciente debía hacerse estudios rutinarios, tanto de médula ósea como de sangre periférica.

### Criterios de inclusión

- 1) Pacientes con diagnóstico citogenético de AF mediante prueba de aberraciones cromosómicas con diepoxibutano.
- 2) Pacientes con variante patogénica en cualquier gen *FANC*.
- 3) Sin trasplante de médula ósea o células troncales hematopoyéticas.
- 4) Que aceptaran y firmaran el consentimiento informado.

### Criterios de exclusión

- 1) Que las muestras obtenidas no fueran adecuadas para realizar los estudios planteados (exclusión temporal).
- 2) Hábitos que afecten las variables del estudio (por ejemplo, tabaquismo).

### Estrategia de estudio

1. A los pacientes con AF diagnosticados por ensayo de aberraciones cromosómicas, a los cuales se les hicieran tomas de muestra de MO para seguimiento, se les invitó a participar en el proyecto y a firmar el consentimiento informado.
2. Se tomaron muestras de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) (Figura 1A).
3. Con la sangre periférica se hicieron cultivos de 48 horas para obtener metafases y posteriormente realizar M-FISH (Figura 1B, ver a detalle en **Método M-FISH**) y se analizaron por lo menos 15 metafases.
4. Con la muestra de médula ósea se sembraron dos cultivos primarios sin estímulo para división celular. Se utilizó medio MarrowMax®, se incubaron por 48 horas y posteriormente se realizó la cosecha para obtener metafases.
5. Se analizaron aberraciones cromosómicas por bandas GTG (Figura 1B y 1C, ver a detalle en **Método citogenético con bandas GTG en médula ósea**).
6. Tanto de la muestra de SP como de MO, se extrajo gADN para realizar secuenciación de exoma (WES).
7. Con el análisis de los archivos FASTQ, se buscaron las firmas mutacionales (Figura 1E).
8. En la MO se estudiaron los cariotipos en cultivos sin estimulación con fitohemaglutinina, para analizar solamente las células troncales hematopoyéticas y en la SP, estimuladas con fitohemaglutinina, se cosecharon para obtención de cromosomas, se realizaron bandeo GTG y M-FISH, se hibridó con sondas de tinción completa con color específico para M-FISH (Spectra Vision) para cada uno de los 24 diferentes cromosomas. Se adquirieron de 20 a 50 imágenes de metafases y se

analizaron los cariotipos en microscopio de fluorescencia Imager Z-1 Zeiss. Se registró el daño cromosómico numérico y estructural y se calculó la frecuencia de aberraciones por célula.

9. A partir de ADN genómico de cada tejido, se secuenció el exoma utilizando la plataforma HiSeq de Illumina. Se determinó el perfil mutacional de las muestras, específicamente SNV e indels con el programa GATK (Broad Institute), se usó el programa SigProfiler (Algoritmo libre del diseño de análisis del Wellcome Trust Sanger) y DeconstrugSig para identificar la presencia de más de 30 firmas mutacionales descritas (Alexandrov et al., 2020; Polak et al., 2017) en las muestras de pacientes AF. Se buscaron las firmas presentes en los pacientes con AF y se buscó si existe una firma propia de los pacientes AF.



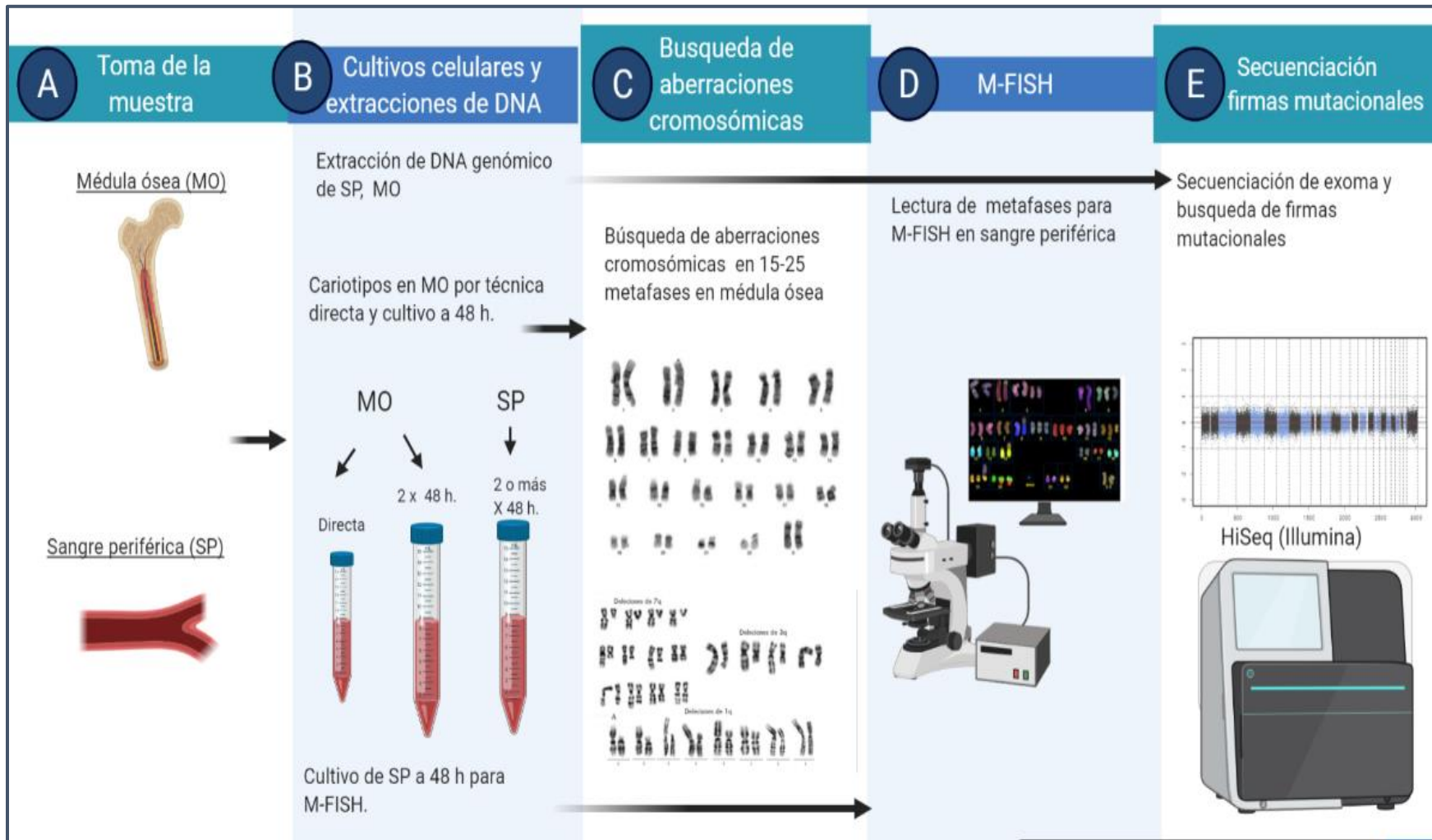


Figura 1. Estrategia de estudio

## Técnicas

### Método citogenético con bandas GTG en médula ósea

#### Siembra

- 1) A partir de una muestra de 3 mL de médula ósea se sembraron aproximadamente 1-1.5 mL de médula ósea en ~5 mL de medio MarrowMax<sup>®</sup>. Se realizaron por lo menos dos cultivos primarios.
  - o Nota: en pacientes con AF, es frecuente encontrar médulas óseas hipocelulares.
2. Los cultivos primarios de médula ósea se dejaron a 37°C en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h.
3. Se generó una cosecha directa.
  - o Se añadieron 10 mL de solución hipotónica a 37°C, más 100 µL de colcemid, más 1-2 mL de médula ósea, se dejaron incubando por 30 minutos.
  - o Se realizó prefijación en la cosecha (Figura 2).

#### Cosecha

4. Pasadas las 48 h, se verificaron los cultivos para ver si hubo cambio de coloración en el medio, se procuró que hubiera por lo menos un cambio de color ligeramente amarillo.
5. Se le agregaron 50 µL de colcemid a cada tubo y se dejaron incubando por 1 hora.
6. Luego del tiempo de colcemid, se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.
7. Se les retiró el sobrenadante y se añadieron 10 mL de solución hipotónica de KCl 0.075 M sobre el vórtex. Se dejó incubando por 1 h.
8. Se agregaron 0.5 mL de fijador Carnoy (metanol: ácido acético en una proporción 3:1), se homogeneizó y centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente (prefijación).
9. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 5 mL de fijador Carnoy sobre el vórtex (lavado 1).
10. Se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.
11. Repetir paso 9 (lavado 2).
12. Se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.
13. Repetir paso 9 (lavado 3). (Figura 2)

#### Preparación de laminillas para análisis microscópico

14. Se retiró sobrenadante hasta dejar aproximadamente 0.5 mL de fijador por encima del botón y se resuspendió.

15. Se dejaron caer tres gotas del botón resuspendido sobre portaobjetos limpios desde una distancia de aproximadamente 30-50 cm, se les sopló fuertemente dos veces, se colocaron sobre una plancha caliente con gasas húmedas (~40°C) y se les volvieron a poner tres gotas de fijador a lo largo de la laminilla.
16. Después de aproximadamente 1 minuto, se retiraron de la plancha y se secaron de abajo para monitorearlas bajo el microscopio en contraste de fases y revisar la presencia o ausencia de metafases, la apertura, número de metafases y morfología de los cromosomas.
17. Se gotearon aproximadamente 4 laminillas por cultivo primario.
18. Se dejaron madurando durante 24 h a 75°C y otras 24 h a temperatura ambiente sobre gradillas de vidrio en un horno (Figura 2).

#### Bandeo

19. Se pesaron 0.004 g de tripsina liofilizada y se disolvieron en 40 mL de PBS pH 7.0 a temperatura ambiente en un coplin.
20. En otro coplin se agregaron 40 mL de PBS pH 7.0 a temperatura ambiente que serviría para enjuagar.
21. En otros dos coplin se agregaron 37.5 mL de solución Gurr pH 6.8 a temperatura ambiente. A uno de los coplin se le añadieron 2.5 mL de colorante Wrigth y al otro 2.5 mL de colorante Giemsa. A ambos colorantes se les limpió con papel la nata que se forma en la parte superior.
22. En otro coplin se colocaron 40 mL de solución Gurr a pH 6.8 a temperatura ambiente que serviría para enjuagar los colorantes.
23. Se sumergieron las laminillas maduras en la solución de tripsina durante 45-50 segundos.
24. Se sacaron de la solución de tripsina y se enjuagan en el PBS.
25. Se sumergieron en el colorante Wrigth durante 1:30 minutos.
26. Se sumergieron en el colorante Giemsa durante 1:30 minutos.
27. Se enjuagaron rápidamente en un movimiento en la solución Gurr pH 6.8.
28. Rápidamente se secaron con una bomba de aire para quitar el agua y mantener una tinción homogénea.
29. Se revisaron bajo el microscopio con campo claro a 10X primero y luego a 100X para evaluar el bandeo, si el bandeo fue adecuado se continua con el mismo procedimiento con todas las laminillas.
30. Se guardaron hasta que se analizaron, protegidas del polvo y la luz del sol (Figura 2).

### Análisis citogenético

31. Se analizaron de 15-40 metafases, siendo por regla general 20 metafases de por lo menos dos cultivos primarios bajo el microscopio, inicialmente se buscaron las metafases a 10X.
32. Una vez encontrada se agregó aceite de inmersión y se enfocó a 100X.
33. Se capturaron imágenes con el programa Cytovision e Ikaros, se analizaron con ayuda de dicho programa en los casos que fue necesario y se generaron los cariotipos.
34. Se recabó la información de los cariotipos en una hoja de lectura.
35. Las imágenes fueron compartidas con otras dos citogenetistas del Laboratorio de citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, para confirmar los hallazgos.
36. Finalmente se cotejó el resultado entre los tres observadores y en los casos en que fue necesario se volvió a analizar bajo el microscopio.
37. Se generó el reporte citogenético especificando la cantidad de aberraciones reunidas y no reunidas, así como la presencia de aberraciones clonales y no clonales (Figura 2).

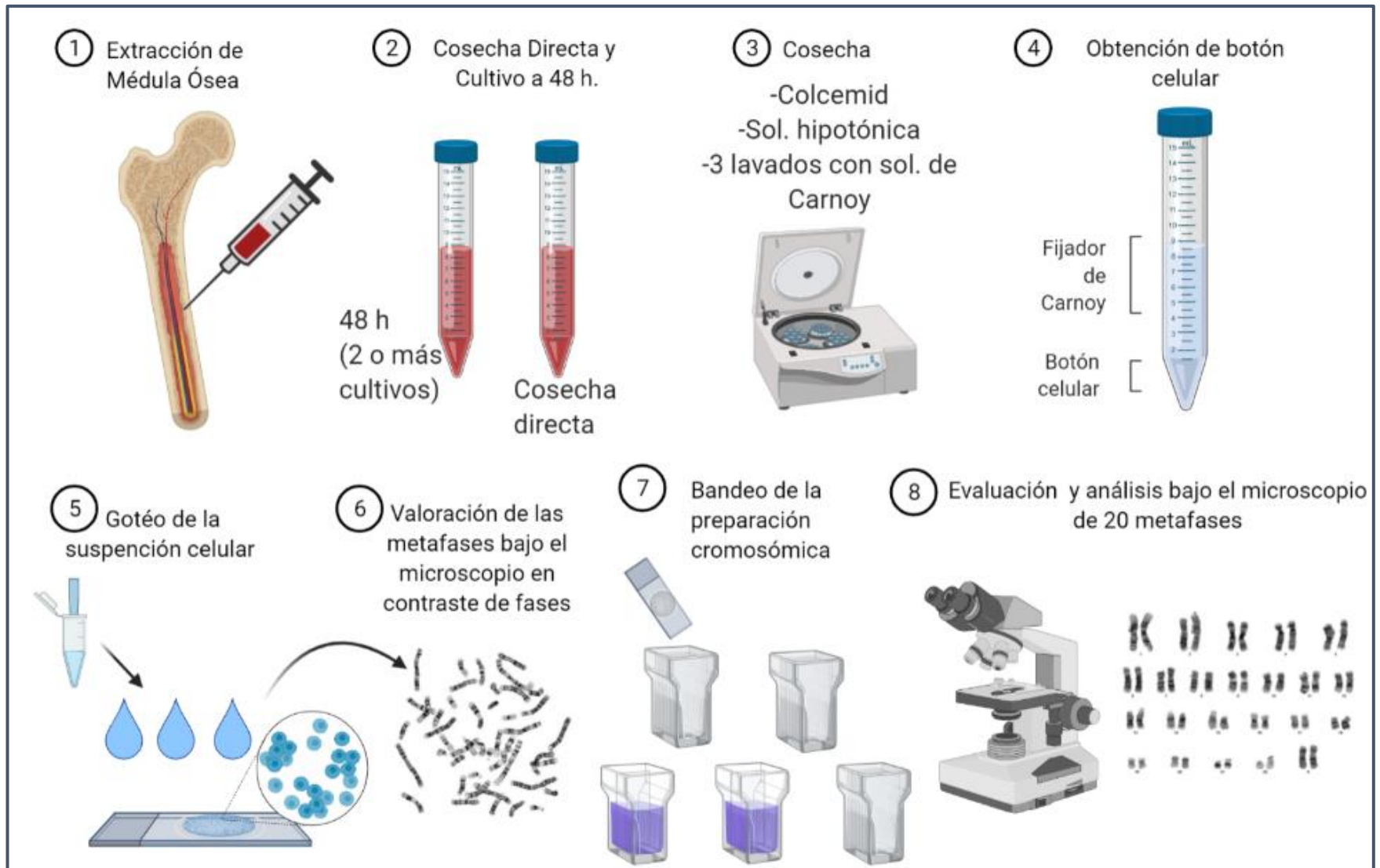


Figura 2. Método: Bandas GTG en médula ósea

## Método M-FISH

### Siembra

1. A partir de una muestra de 3 mL de sangre periférica se sembraron aproximadamente 0.5-1 mL en ~5 mL de medio RPMI suplementado con fitohemaglutinina. Se sembraron por lo menos dos cultivos primarios.
2. Los cultivos primarios de sangre periférica se dejaron a 37°C en la incubadora de CO<sub>2</sub> durante 48 h (Figura 3).

### Cosecha

3. Pasadas las 48 h, se verificaron los cultivos para ver si hubo cambio de coloración en el medio, se procuró que hubiera por lo menos un cambio de color ligeramente amarillo.
4. Se le agregaron 50 µL de colcemid a cada tubo y se dejaron incubando por 1 hora.
5. Luego del tiempo de colcemid, se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.
6. Se les retiró el sobrenadante y se añadieron 10 mL de solución hipotónica de KCl 0.075 M sobre el vórtex. Se dejó incubando por 1 h.
7. Se agregaron 0.5 mL de fijador Carnoy (metanol: ácido acético en una proporción 3:1), se homogeneizó y centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente (prefijación).
8. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 5 mL de fijador Carnoy sobre el vórtex (lavado 1)
9. Se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.
10. Repetir paso 9 (lavado 2).
11. Se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.
12. Repetir paso 9(lavado 3). (Figura 3)

### Preparación de laminillas para análisis microscópico

13. Se retiró sobrenadante hasta dejar aproximadamente 0.5 mL de fijador por encima del botón celular y se resuspendió.
14. Se puso a hervir agua en una plancha caliente, evitando el escape del vapor.
15. Se dejaron caer tres gotas de ácido acético glacial sobre laminillas limpias, luego se dejaron caer tres gotas del botón resuspendido sobre las laminillas, desde una distancia de aproximadamente 5-10 cm, se colocaron por 1 segundo sobre el vapor, se retiraron del vapor, se les pusieron tres gotas de ácido acético a lo largo de la laminilla y finalmente se colocaron sobre una plancha caliente a ~40°C.
16. Después de aproximadamente 1 minuto, se retiraron de la plancha y se secaron de abajo para monitorear bajo el microscopio en contraste de fases la presencia o

ausencia de metafases, la apertura, número de metafases y morfología de los cromosomas y principalmente la presencia de citoplasma.

17. Se gotearon aproximadamente 4 laminillas por cultivo primario.
18. Se dejaron madurando durante 24 h en un horno a 75°C y otras 24 h a temperatura ambiente sobre gradillas de vidrio (Figura 3).

#### Tratamiento pre-hibridación

19. Se colocaron vasos coplin con 0.1xSSC y 2xSSC en el refrigerador.
20. Se pusieron a calentar coplin con 2xSSC a 70°C (+/- 1°C) en un baño de agua.
21. Las laminillas se colocaron en 2xSSC a 70°C (+/- 1°C) y se incubaron por 30 minutos.
22. Se quitó el coplin del baño agua y se dejó enfriar por 20 minutos.
  - o En este punto se inició la desnaturalización de la sonda.
23. Las laminillas se transfirieron a 0.1xSSC a temperatura ambiente por 1 minuto.
24. Se desnaturalizaron las laminillas en NaOH 0.07 N a temperatura ambiente por 1 minuto.
25. Se colocaron 0.1xSSC a 4°C por 1 minuto.
26. Se colocaron en 2xSSC a 4°C por 1 minuto.
27. Se deshidrataron en etanol al 70%, 85% y 100% respectivamente por 1 minuto.
28. Se dejaron secar al aire (Figura 3).

#### Desnaturalización de la sonda e hibridación

29. Se añadieron 8 µL de sonda en un microtubo de 10 µL.
30. Se desnaturalizó en un termociclador a 75°C (+/- 1°C) por 5 minutos.
31. Se colocó en hielo brevemente.
32. Se colocó a 37°C en la incubadora de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos.
33. Se centrifugó brevemente en una microcentrífuga.
34. Se añadieron los 8 µL de sonda sobre la laminilla con las metafases.
35. Se colocó un cubreobjetos asegurándose que no quedaran burbujas y sellando con cemento iris.
36. Se incubó por 1-2 días en una cámara húmeda a 37°C que previamente fue preparada y precalentada (Figura 3).

#### Lavados post-hibridación

37. Se precalentó 0.4xSSC pH 7.0-7.5 en un coplin a 72°C (+/-1°C).
38. Se removió el sellador y cubreobjetos con cuidado.
39. Se colocaron las laminillas en la solución de 0.4xSSC precalentada a 72°C durante 2 minutos.
40. Se incubaron las laminillas en 2xSSC/0.05% Tween, pH 7.0-7.5 por 0.5 minutos.
41. Se enjuagaron las laminillas en agua destilada.

42. Se dejaron secar al aire (Figura 3).

#### Contratinción

43. Se añadieron 10 microlitros de DAPI/Antifade (6  $\mu$ L de DAPI + 4  $\mu$ L de Antifade)

44. Se colocó un cubreobjetos de 50x24 mm y se eliminaron las burbujas.

45. Se almacenaron las laminillas a -20°C hasta antes de su análisis (Figura 3).

#### Análisis

46. En la computadora, se abrió el programa Isis de Metasystem y se abrió una carpeta nueva para cada caso.

47. Se capturó la imagen con los parámetros preestablecidos, es importante mencionar que según la versión de software de ISIS, puede variar el orden de filtros que se captura.

48. Se verificó que en cada canal de captura estuviera en el plano adecuado, ya que generalmente si el color verde está enfocado, no es el mismo enfoque que se requiere para enfocar adecuadamente el color magenta; en estos casos se puede recapturar el color que este enfocado adecuadamente y sobrescribirlo.

49. Luego de que se capturaron las imágenes, se modificaron los umbrales hasta tener el color adecuado.

50. Se separaron los cromosomas tanto automáticamente como manualmente hasta tener cada uno identificable (con base en el color, el tamaño y las bandas de DAPI inverso).

51. Se formó el cariotipo de manera automática y luego se hicieron las correcciones de los cromosomas que estuvieran apareados de manera incorrecta, una vez que se tenía el cariotipo adecuado se anotó en una hoja de Excel el número de imagen y la fórmula cromosómica.

52. Finalmente se hizo una segunda revisión de las metafases armadas otro observador con experiencia en el análisis de M-FISH, se registraron en la hoja de Excel, hasta completar el análisis de todas las imágenes capturadas. El número de metafases analizadas se encontró en el rango de 30-50.

53. Con estos datos se obtuvo la frecuencia de aberraciones cromosómicas y las proporciones por tipo de aberraciones cromosómicas que posteriormente se correlacionaron con los datos de firmas mutacionales y de bandas GTG (Figura 3).



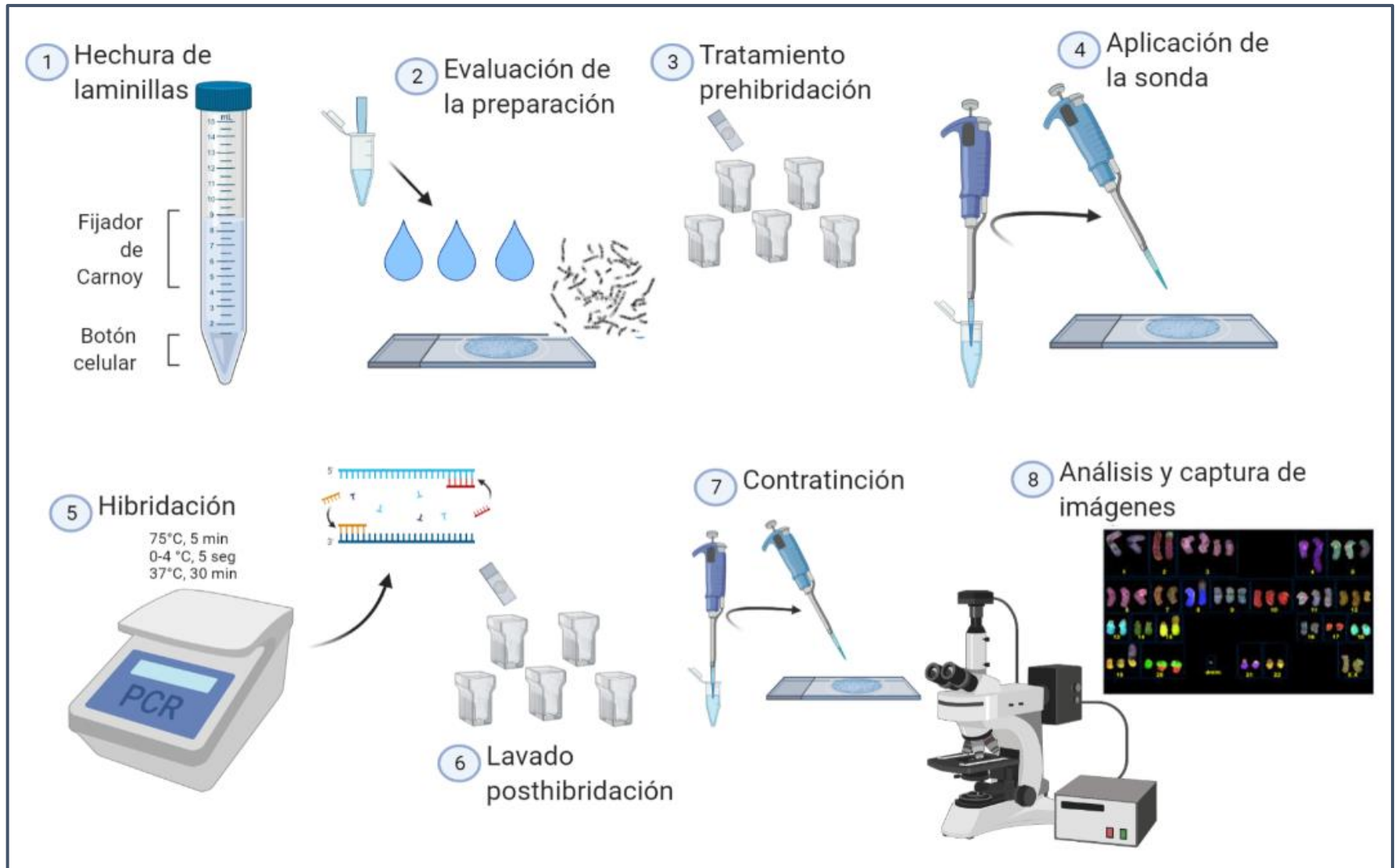


Figura 3. Método de M-FISH en sangre periférica.

## Detalle técnico del M-FISH

EL FISH multicolor se basa en la hibridación simultánea de sondas de tinción específica para cada cromosoma en el genoma de interés (24 diferentes en el caso del ser humano), con diferente combinación de fluorocromo o fluoróforos. El número de combinaciones Booleanas de 2 fluoróforos es  $2^N-1$ ; por lo que hay 31 combinaciones posibles para 5 fluoróforos. El marcaje combinatorio hace posible discriminar muchos más blancos que el número de fluoróforos resolubles espectralmente. Se usan cinco colores diferenciales espectralmente ya sea solos o en combinación para crear una mezcla de sondas, con una particular firma espectral para cada cromosoma (Arsham et al., 2017). En la tabla 2 se muestran los fluoróforos usados y los filtros recomendados por el fabricante para realizar la captura (Los filtros pueden ser consultados para verificar su espectro de absorción y emisión en la siguiente página: <https://www.chroma.com/products/fluorochrome>). Una vez que las imágenes son adquiridas en los 6 diferentes fluoróforos (incluyendo DAPI), se hace el solapamiento de manera automática en el programa ISIS y se separa cada cromosoma para posteriormente realizar el ordenamiento de estos en el modo de cariotipo (Figura 4). El ordenamiento se realiza basándose en el tamaño del cromosoma, posición de centrómero, en el patrón de bandas por DAPI inverso y posteriormente por el color de los fluoróforos solapados o de manera individual (Figura 5). Finalmente se obtiene el cariotipo ordenado y se recomienda hacer uso del color falso para discriminar si hay alteraciones en alguno de los cromosomas (Figura 6). La firma de color única para cada par cromosómico se logra del marcaje diferencial que se obtiene de acuerdo a la combinación de fluoróforos que se muestra en el cuadro de la figura 6.

<b>Marcaje del fluoróforo</b>	<b>Filtro recomendado</b>	<b>CHROMA</b>	<b>Color percibido por el ojo humano</b>
<b>DAPI (Contratinción)</b>	SP-100		Azul
<b>Aqua</b>	31036v2		Cian
<b>Green</b>	MF-101		Verde
<b>Orange</b>	31003		Rojo
<b>Red</b>	SP-107 (SP-103v1)		Magenta
<b>Near infrared</b>	SP-104v2		Amarillo

Tabla 2. Mostrando los diferentes fluoróforos que se usan para la adquisición de imágenes, el filtro recomendado por el fabricante y el color que percibe el ojo humano.

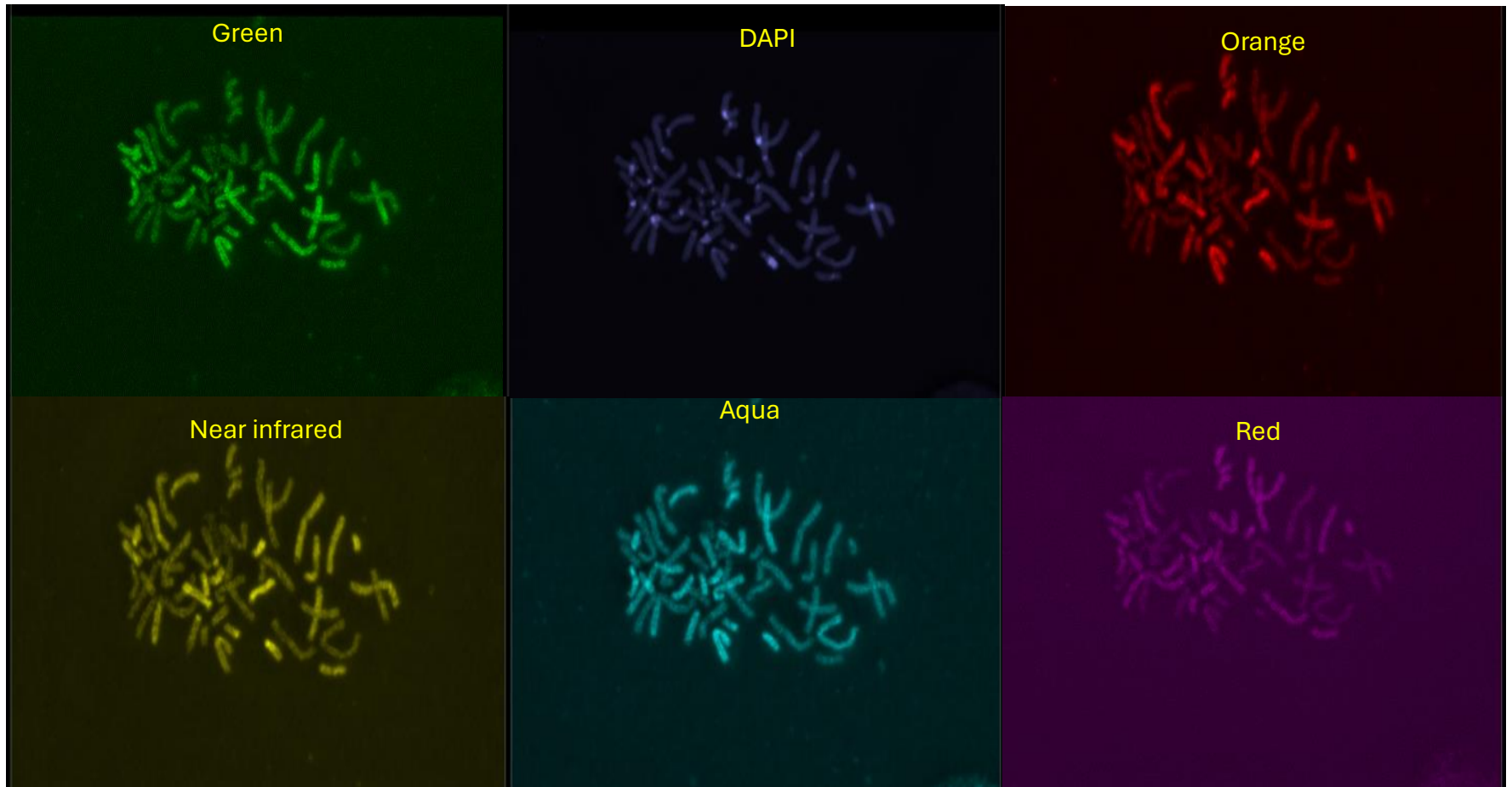


Figura 4. Se muestran las imágenes de metafases adquiridas en el M-FISH. Durante la adquisición se toman 6 fotos para los diferentes fluorocromos: verde (Cy3), amarillo (Cy5), azul (DAPI), Aqua (Cy6), Rojo (FIT-C) y Magenta (Cy3). El orden en que se toman los fluorocromos puede variar según la configuración del programa ISIS o su versión. Nótese que en cada fluorocromo se tiñen cromosomas diferencialmente, a excepción del DAPI que tiñe a todos, el posterior superposición de las 6 diferentes imágenes generan el color único a cada par de cromosomas.

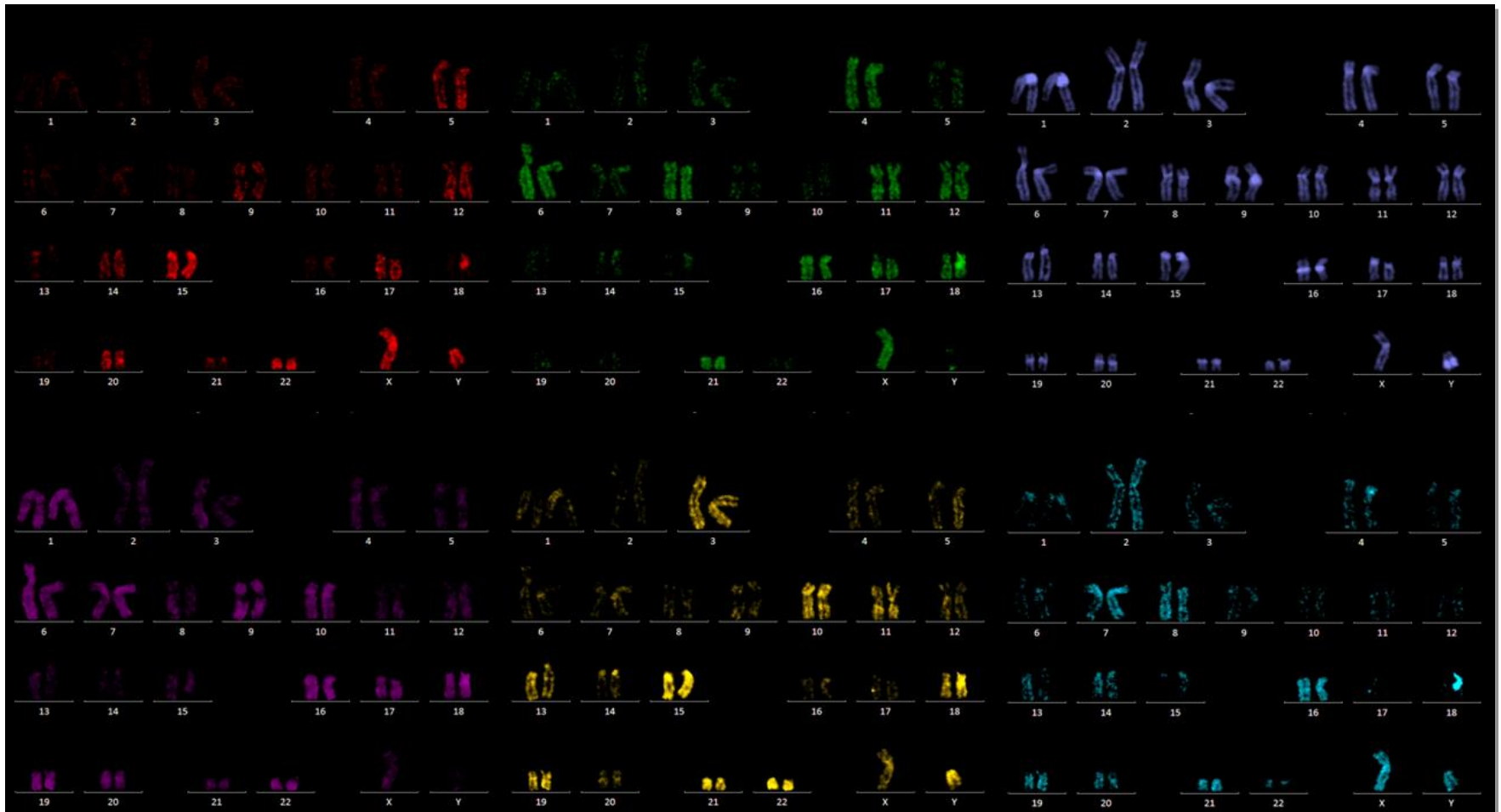


Figura 5. Imágenes de un cariotipo en los diferentes colores para los cuales hay fluoróforos, nótese que los colores que marcan los 24 pares cromosómicos son diferentes. Se deben verificar en los canales individuales cada par con el fin de comprobar el acomodo correcto, además del tamaño, posición de centrómero y color.

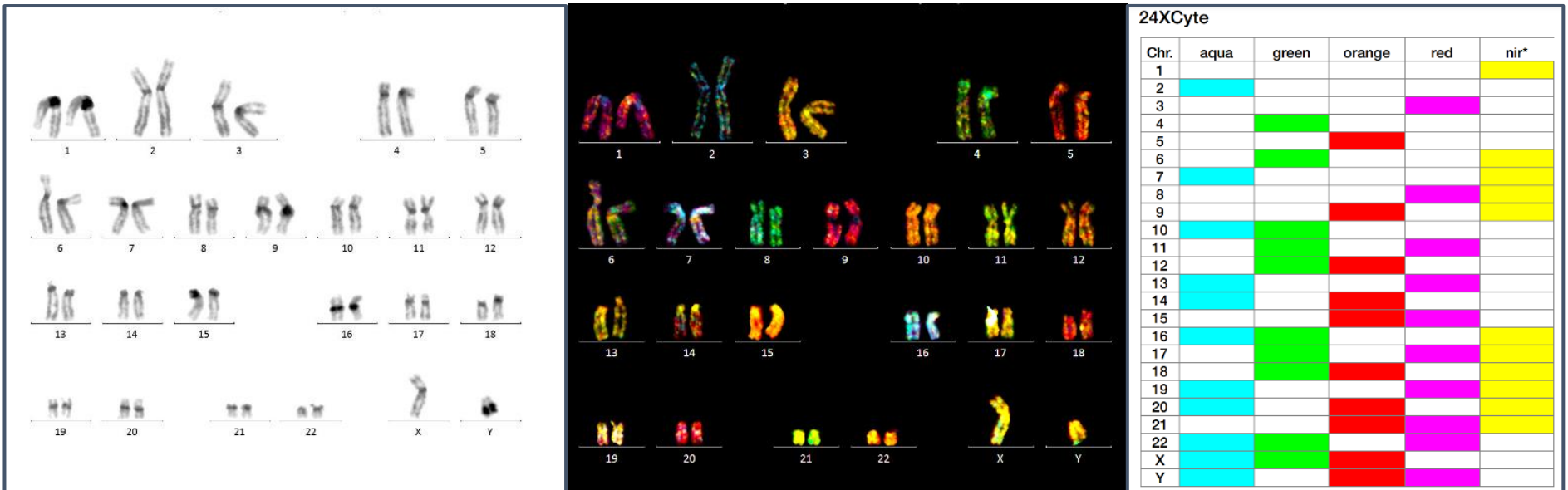


Figura 6. En la izquierda se muestra en patrón de bandas por DAPI invertido que permite ordenar los cromosomas ya que se obtiene un patrón de bandas similar al de bandas GTG (ejemplo). En el centro se muestra el cariotipo con el patrón de color único para cada cromosoma que se obtiene al sobrelapar los 6 fluoróforos. En la derecha se muestra el patrón de combinación de colores que tiene cada cromosoma (Imagen tomada del inserto de la sonda para M-FISH 24Xcyte de Metasystem: <https://metasystems-probes.com/en/probes/mfish/d-0125-600-di/>)

## Extracción de ADN a partir de sangre periférica y médula ósea

- 1) Se verificó el nombre y número de identificación anónimo del paciente a procesar.
- 2) Se corroboró el volumen de la muestra a procesar.
- 3) Se colocó el volumen en el tubo Falcon correspondiente y se verificaron los datos de la muestra.
- 4) Se colocaron 3 volúmenes de solución de lisis de rojos (RBC) por cada volumen de muestra (por ejemplo, por cada 1 mL de muestra, se debieron colocar 3 de solución de RBC).
- 5) Se resuspendió la muestra por inversión (10-15 veces) y se colocó en incubadora a 37°C por 10 minutos.
- 6) Finalizada la incubación, se centrifugó a 2000xg por 15 minutos.
- 7) Se retiró cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta Pasteur con filtro. Debía observarse un pellet blanco.
- 8) Se añadió 1 volumen de solución de lisis celular (debía ser el mismo volumen de la sangre original).
- 9) Se aplicó vórtex vigorosamente por 20 segundos
- 10) Se colocó el baño de agua a 55°C. Se revisó periódicamente la temperatura hasta garantizar su estabilidad al menos por 15 min.
- 11) Se preparó una cava pequeña con hielo.
- 12) Se añadieron 15 µL de solución de RNAsa y se mezcló por inversión (15 veces).
- 13) Se incubó a 37°C en incubadora por 30 minutos.
- 14) Se agregaron 15 µL de proteinasa K y se incubó en baño de agua a 55°C por 30 minutos.
- 15) Finalizada la incubación, se colocó la muestra rápidamente en hielo por 1-2 min. La incubación en hielo se podía prolongar por toda la noche, ya que su función es detener la actividad enzimática de la RNAsa.
- 16) Se agregó 1 mL de solución precipitadora de proteínas, y se aplicó vórtex vigorosamente por 20 s.
- 17) Se centrifugaron las muestras a 2000xg por 10 minutos (a 4°C).
- 18) Se rotularon tubos eppendorf estériles de 1.5 mL, de acuerdo con el número de muestras que se estaban procesando.
- 19) Se usó una micropipeta y se colocó el sobrenadante en el tubo de 1.5 mL correspondiente. Se tuvo cuidado de no remover el contenido del ~~pellet~~ botón durante este paso.

- 20) Se agregaron 300  $\mu$ L de isopropanol a cada tubo. Para tubos pequeños (1.5-2 mL) se completó con isopropanol hasta aproximadamente 1.3-1.4 mL. Para tubos grandes de 15 se colocó el mismo volumen de isopropanol que del volumen que ya tenía el tubo (Si el tubo tiene 4 mL, coloque 4 mL de isopropanol).
- 21) Se añadió 1  $\mu$ L de glicógeno a cada tubo (independientemente del volumen, se agregó lo mismo para muestras grandes o pequeñas, ya que ayuda a visualizar el ADN).
- 22) Se mezclaron las muestras por inversión 50 veces. El ADN debía observarse como un hilo fino.
- 23) Se centrifugó durante 1 min a 13000-16000 xg. El ADN debía observarse como un botón blanquecino. Para tubos de 15 mL se centrifugó a 2000 xg por 5 minutos.
- 24) Se usó una micropipeta para retirar el sobrenadante. Cuidando no tocar el botón (se trató de dejar el menor volumen, no era necesario que quedara totalmente seco). Para tubos de 1.5 mL, se dejó aproximadamente 100-200  $\mu$ L.
- 25) Se añadieron 300  $\mu$ L de etanol al 70% a cada muestra. Se invirtió varias veces (25 veces) para lavar el botón de ADN.
- 26) Se centrifugaron las muestras por 5 min a 13000-16000 xg a 4°C.
- 27) Se calentó en el termobloque a 55°C.
- 28) Con ayuda de una micropipeta de 1 mL, se retiró el sobrenadante, hasta descartar el máximo volumen posible sin tocar el botón.
- 29) Se colocaron los tubos en el termobloque por al menos 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se revisaron periódicamente los tubos hasta que se aseguró que el botón estaba completamente seco (este paso pudo tardar hasta 25-30 min).
- 30) Se ubicó la solución de TE-Low EDTA.
- 31) Se disolvió el ADN de la siguiente manera:
  - A. Si el botón era fácilmente visible y abundante: se disolvió en 50  $\mu$ L de Buffer TE-Low EDTA.
  - B. Si el botón era escaso o poco visible: se disolvió en 22  $\mu$ L de Buffer TE-Low EDTA.
- 32) Se resuspendió ligeramente la muestra con golpecitos para ayudar a diluir el botón.
- 33) Se colocó en el bloque a 65°C por 10 minutos.
- 34) Se almacenaron las muestras en refrigeración hasta el momento de la lectura en el Nanodrop.

35) Estas muestras fueron enviadas a secuenciación de WES con la empresa NOVOGENE y posteriormente fueron devueltos los archivos FASTQ de todas aquellas muestras que hubiesen pasado la prueba de calidad.

#### Método de firmas mutacionales

Una vez que se obtuvieron los archivos FASTQ, se realizó el procesamiento de los datos para obtener las firmas mutacionales usando herramientas en Linux y Python, de la siguiente manera:

##### Preparación del entorno de trabajo

Se instalaron los paquetes y programas necesarios para realizar el análisis, los cuales incluyeron: Python, SigProfiler, SAMtools y BWA. Igualmente se creó una carpeta de trabajo donde se fueron almacenando los archivos necesarios que se iban generando.

##### Preprocesamiento de los archivos FASTQ

Una vez obtenidos los archivos Fastq del proveedor del servicio, se realizó un preprocesamiento de los datos observando en que calidad venían con la herramienta FASTQC y poder determinar y eliminar lecturas erróneas, adaptadores y realizar el “trimming” o recorte de bases de mala calidad con el programa Trimmomatic.

Posteriormente, se realizó nuevamente la evaluación de los archivos con FASTQC para determinar si los archivos ya tenían los parámetros óptimos para continuar con el análisis de las firmas mutacionales.

##### Anotación y calibración de las lecturas contra genoma de referencia

Una vez que se obtuvieron las lecturas de buena calidad se continuó con la anotación de éstas contra el genoma de referencia la versión GRCh38 con ayuda del programa BWA. A continuación, se realizó la calibración de las bases anotadas de cada lectura con ayuda de la herramienta GATK donde se empleó el BaseRecalibrator y ApplyBQSR para este proceso.

##### Identificación de variantes somáticas

Para obtener el archivo VCF con las variantes somáticas presentes en cada muestra se utilizó el programa MUTEC2, el cual puede detectar mutaciones cortas, que incluyen alteraciones de un solo nucleótido (SNV) e inserciones y deleciones (INDEL).

##### Obtención de firmas mutacionales

Para poder determinar las firmas mutacionales presentes en los pacientes con anemia de Fanconi se usó el programa SigProfiler tool, el cual utiliza como entrada los archivos VCF generados con MUTEC2. El programa genera resultados de las firmas mutacionales de cambio de un solo nucleótido (SBS), de doble sustitución (DBS) y las de inserciones y deleciones (ID).



## Análisis de firmas mutacionales

Una vez obtenidos los resultados, se determinaron las firmas que estaban presentes en los pacientes con anemia de Fanconi. Se realizó una búsqueda bibliográfica de los procesos que pueden estar generando estas firmas en los pacientes y llegar a proponer el mecanismo de generación de la firma en el contexto de la enfermedad.

También se revisaron los archivos que indican la cantidad de mutaciones que tuvo cada muestra, con el fin de comparar el número de mutaciones entre las muestras de SP y MO de cada paciente y entre pacientes.

Una versión más extensa del pipeline que uso para obtener las firmas mutacionales puede ser encontrado en el repositorio de Github ([https://github.com/ehatl/Mutational\\_Signature\\_pipeline](https://github.com/ehatl/Mutational_Signature_pipeline)), donde está almacenado el código de Python y Unix que se usó para la obtención de las firmas mutacionales y que es el proyecto de tesis de licenciatura de la Bioquímica Diagnóstica Enya Enara Martínez Torres quien participo en este proyecto (Martínez , 2023).

## Resultados

A continuación, se describe la población de estudio. Enseguida, debido a que no fue posible realizar los tres tipos de estudio en los 15 pacientes que se incluyeron, se presentan los datos de 5 de ellos, en los cuales se realizaron los tres ensayos (Bandeo G, M-FISH y Firmas mutacionales). Posteriormente, se describen los resultados obtenidos por bandas GTG en 15 pacientes, y los datos obtenidos de firmas mutacionales en 10 de ellos.

## Población de Estudio

### Datos generales de los pacientes

La mediana de edad de los pacientes fue de 9 años. Respecto al grado de falla medular, los pacientes se distribuyeron en: 2 sin falla, 4 con FM leve, 5 FM moderada, 1 FM grave, 3 LMA/SMD (Figura 7C y Tabla 3).

La proporción de mujeres respecto a hombres es de 1.5:1 (Figura 7A). La mediana de edad, de presentación de falla medular en los pacientes fue de en 15.15 años sin falla, 7.2 falla medular leve, 8.9 falla moderada, 12 falla medular grave, y 13.8 SMD/LMA.

Tabla 3. Descripción de la población de estudio (N=15).

ID paciente	Edad (años)	Grado de falla medular (1=Sin falla, 2=Leve,3=moderada,4=grave,5=SMD /LMA)	Sexo
RAFMex0029	5.5	Leve	Masculino
RAFMex0006	5.5	Leve	Masculino
RAFMex0009	6.3	Moderada	Femenino
RAFMex0010	6.7	Moderada	Femenino
RAFMex0005	7.2	Leve	Femenino
RAFMex0002	8.3	Sin falla	Femenino
RAFMex0011	8.9	Moderada	Femenino
FANC170	9	SMD/LMA	Femenino
RAFMex0007	9.7	Moderada	Femenino
RAFMex0008	11.7	Leve	Masculino
RAFMex0026	12	Grave	Femenino
RAFMex0018	13.3	Moderada	Femenino
RAFMex0031	13.8	SMD/LMA	Masculino
RAFMex0015	17.3	SMD/LMA	Masculino
RAFMex0027	22	Sin falla	Masculino

Tabla 3.- Descripción de la población de estudio (N=15). SD= Sin dato.

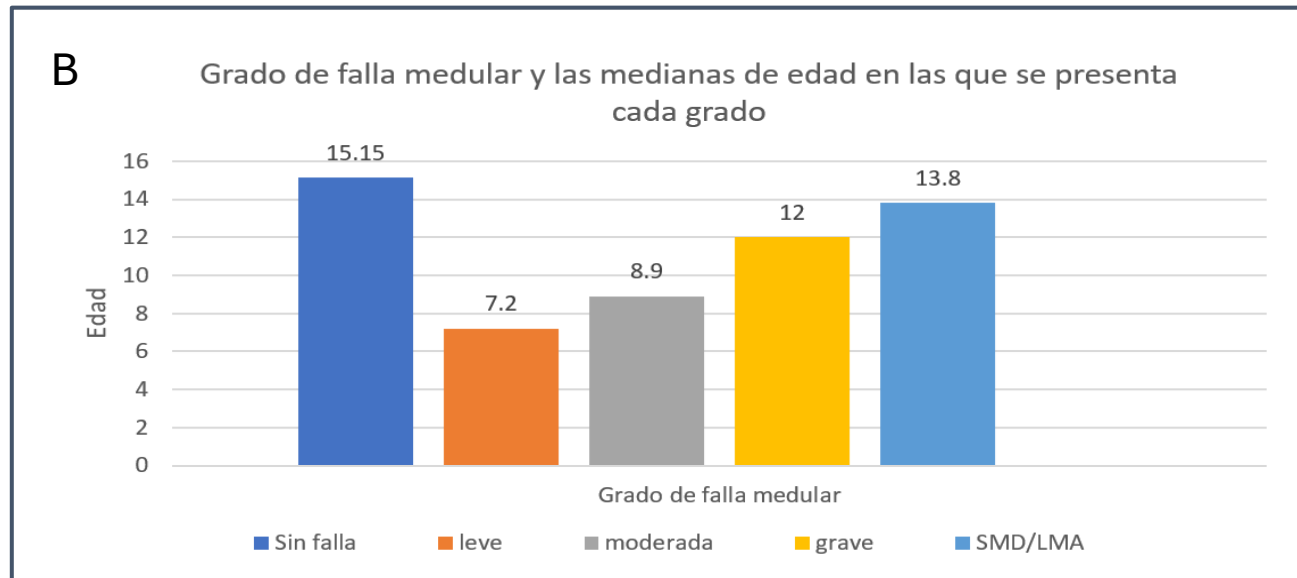
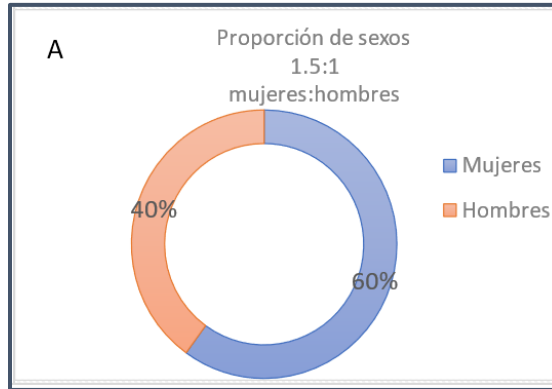


Figura 7.- A) Gráfico de dona que muestra la proporción de hombres y mujeres estudiados, hubo una relación de 1.5 a 1 de mujeres: hombres. B) Gráfica de falla medular en 15 pacientes AF. Sobre las barras se presenta la mediana de edad para cada grado de falla medular. SMD/LMA= síndrome mielodisplásico/leucemia mieloide aguda.

Resultados de los tres ensayos en 5 pacientes con AF.

Paciente 1 - FANC170 - 9 años - LMA

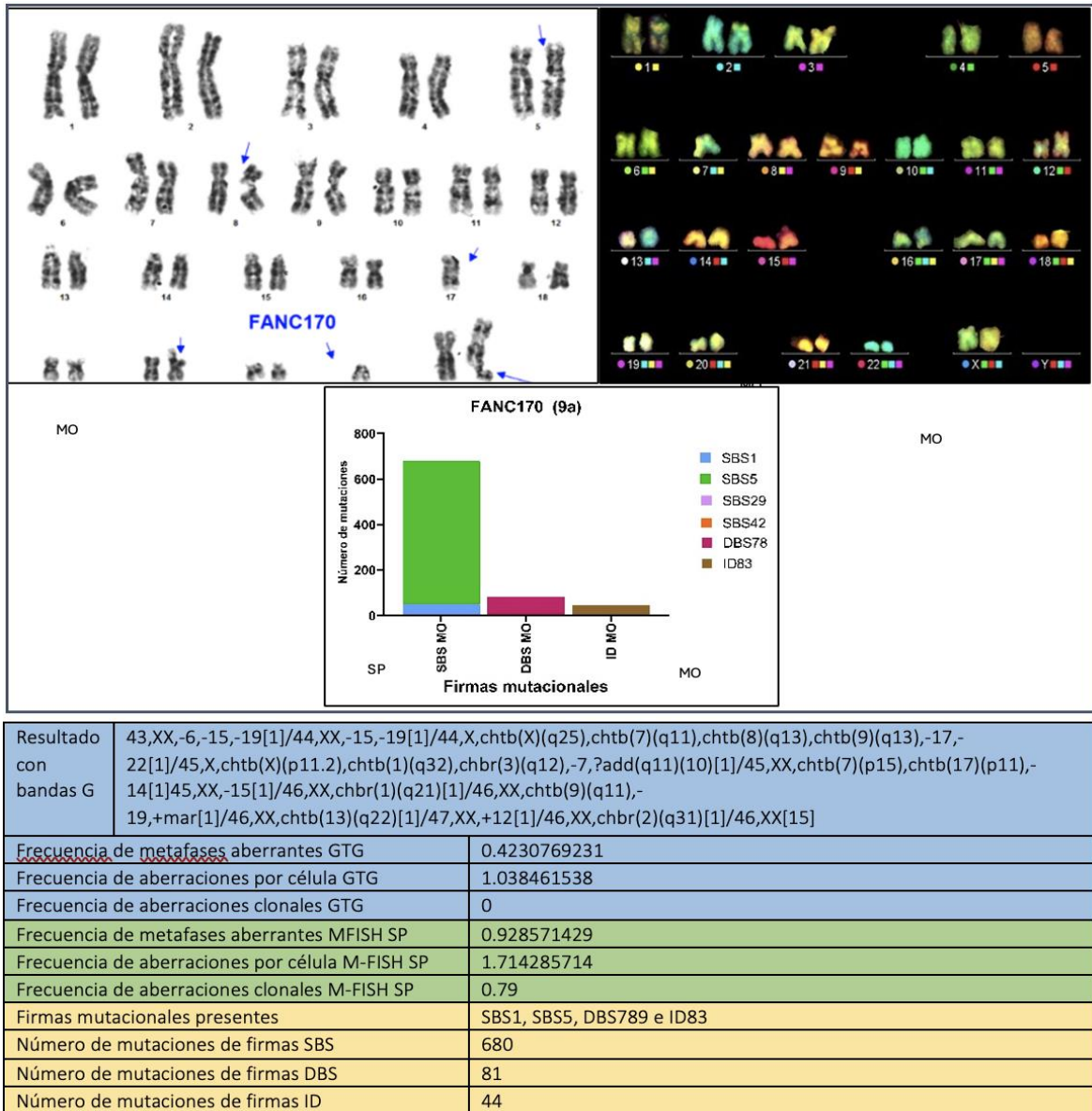
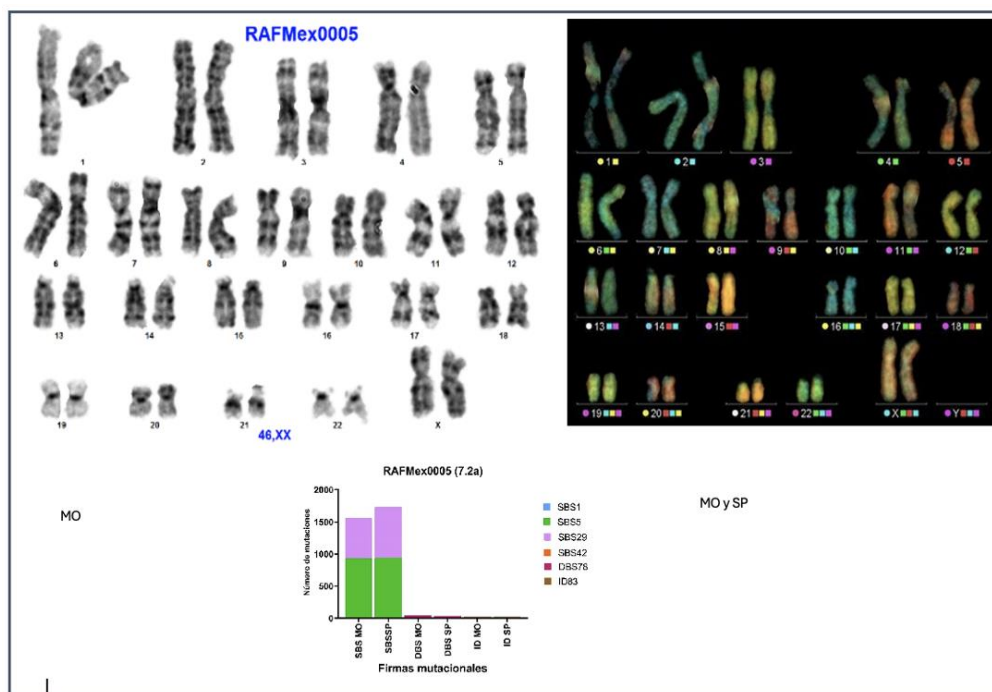


Figura 8- Datos obtenidos por los tres ensayos en pacientes FANC170. Se muestra el resultado de bandas GTG, las frecuencias de aberraciones observadas en bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas por M-FISH, el tipo de firmas mutacionales encontradas y el número de cada una de ellas. Se muestran una imagen de bandas GTG (izquierda) y M-FISH (centro); se muestra la gráfica de firmas mutacionales con el tipo y número de mutaciones de cada tipo (derecha).

La paciente FANC170, tenía 9 años al momento de la toma de muestra de MO, cursaba con LMA y había recibido la primera quimioterapia, la paciente falleció debido a la LMA. Con bandas GTG, se obtuvo un resultado sin clonalidad, con una frecuencia de metafases

aberrantes de 0.42 y frecuencia de aberraciones por célula de 1.038. Respecto a lo obtenido por M-FISH, se encontró presencia de clonalidad, con una frecuencia de 0.79, que incluía la monosomía 7 y una probable translocación entre el cromosoma 2 y 3. En relación a las firmas mutacionales, se obtuvieron SBS1, SBS5, DBS789 e ID83, siendo la SBS5, la que se encontró en mayor cantidad.

Paciente 2 - RAFMex0005 – 7.2 años – Falla medular leve



Resultado con bandas G	40,XX,-2,-5,-9,-15,-17[1]/42,XX,-10,-12,-20,-21[1]/44,XX,-6,-20[1]/44,XX,-4,-8[1]/44,XX,chtb(8)(p11),-9,-20[1]/45,XX,-14[1]/45,XX,-19[1]/46,XX[13]
Frecuencia de metafases aberrantes GTG	0.35
Frecuencia de aberraciones por célula GTG	0.9
Frecuencia de aberraciones clonales GTG	0
Frecuencia de metafases aberrantes MFISH SP	0.307692 308
Frecuencia de aberraciones por célula M-FISH SP	0.538461538
Frecuencia de aberraciones clonales M-FISH SP	0
Firmas mutacionales presentes	SBS5, SBS29, DBS78 e ID83
Número de mutaciones de firmas SBS	1562 (MO) / 1731 (SP)
Número de mutaciones de firmas DBS	46 (MO) / 35 (SP)
Número de mutaciones de firmas ID	27 (MO) / 26 (SP)

Figura 9. Se muestra la tabla con los datos obtenidos por los tres ensayos en pacientes RAFMex0005. Se muestra la tabla con el resultado de bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas en bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas por M-FISH, el tipo de firmas mutacionales encontradas y el número de cada una de ellas. Se muestran una imagen representativa de bandas GTG (izquierda) y M-FISH (centro); se muestra la gráfica de firmas mutacionales con el tipo y número de mutaciones de cada tipo (derecha).

La paciente RAFMex0005 tenía 7.2 años al momento de la toma de muestra de MO, cursaba con falla medular leve y no presentó clonalidad, respecto a las frecuencias, se encontró lo siguiente, de metafases aberrantes 0.35, de aberraciones por célula 0.9. En el M-FISH, de

metafases anormales fue de 0.3 y de aberraciones por célula fue de 0.43, además de que tampoco reveló la presencia de clonas. Respecto a las firmas mutacionales, se encontraron SBS5, SBS29, DBS78 e ID83. siendo la SBS5 y SBS29 las que mayor número de mutaciones tuvieron.

Paciente 3 - RAFMex0006 - 5.5 años – Falla medular leve

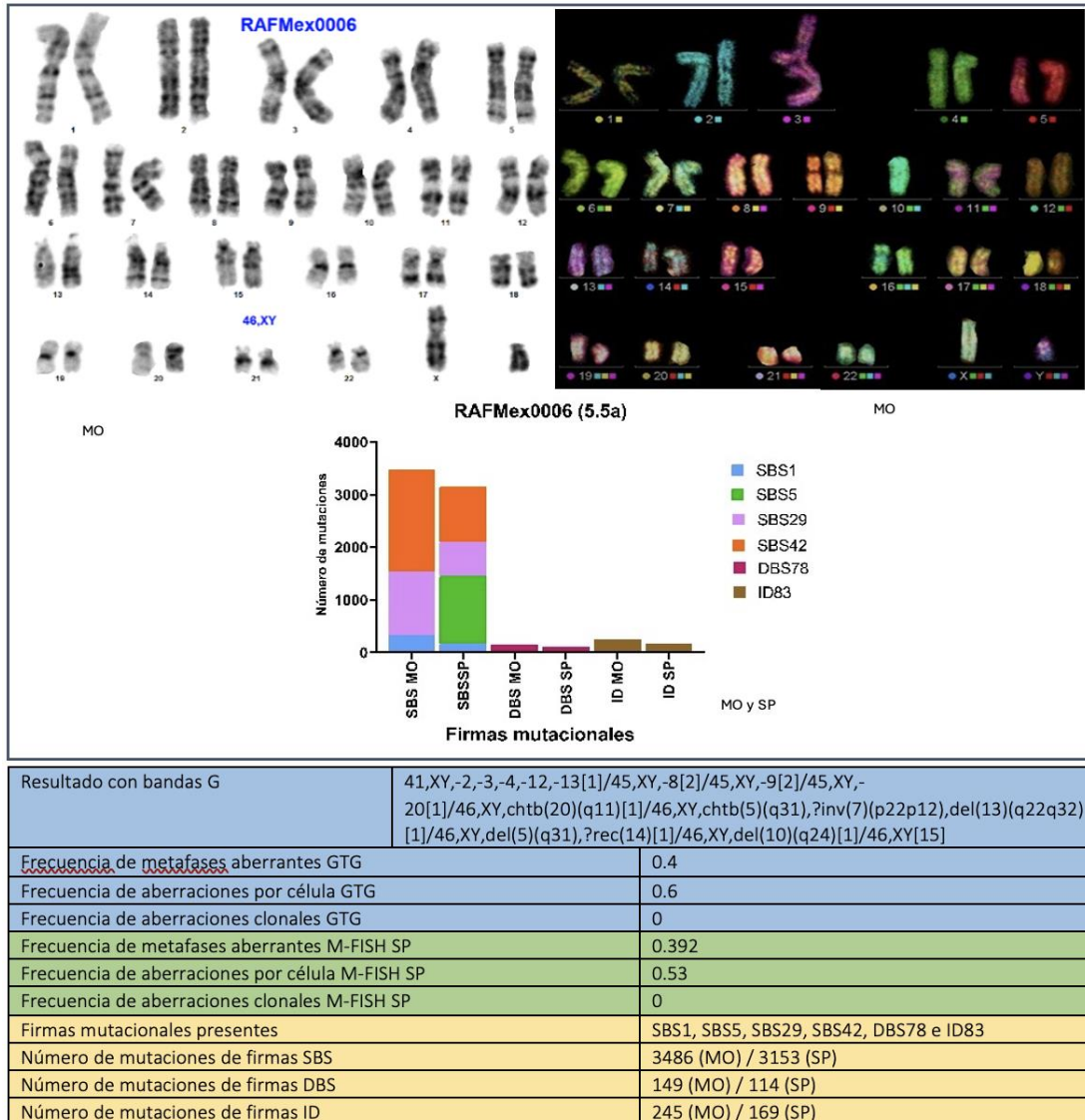


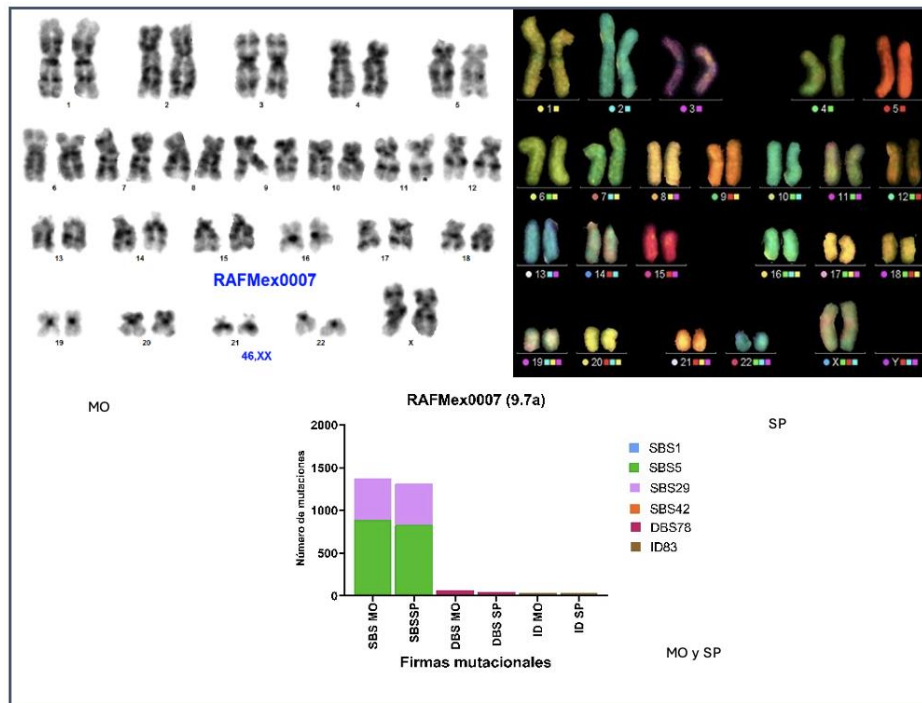
Figura 10. Se muestra la tabla con los datos obtenidos por los tres ensayos en pacientes RAFMex0006. Se muestra la tabla con el resultado de bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas en bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas por M-FISH, el tipo de firmas mutacionales encontradas y el número de cada una de ellas. Se muestran una imagen representativa de bandas GTG (izquierda) y M-FISH (centro); se muestra la gráfica de firmas mutacionales con el tipo y número de mutaciones de cada tipo (derecha).

La paciente RAFMex0006 tenía 5.5 años al momento de la toma de muestra de MO, cursaba con falla medular leve al momento de la toma de muestra y no presentó clonalidad por



análisis de bandas GTG, respecto a las frecuencias encontradas, fueron las siguientes: de metafases aberrantes fue de 0.4, de aberraciones por célula de 0.6. En el M-FISH, de metafases aberrantes fue de 0.39 y la de aberraciones por célula fue de 0.53, tampoco se reveló la presencia de clonas, Respecto a las firmas mutacionales, se encontraron la SBS1, SBS5, SBS29, SBS42, DBS78 e ID83, siendo la SBS29 y SBS42 las que mayor número de mutaciones tuvieron, llama la atención que solamente en SP se encontró SBS5.

Paciente 4 - RAFMex0007 – 9.7 años – Falla medular moderada



Resultado con bandas G	39,XX,-1,-7,-12,-13,-14,-14,-20[1]/42,XX,-1,-3,-5,-12[1]/44,XX,-5,-22[1]/45,XX,-19[1]/45,XX,-22[1]/46,XX,chtb(3)(q25)[1]/46,XX,?add(5)(q31),del(18)(q22)[1]/46,X,cttb(X)(q26)[1]/46,XX[12]
Frecuencia de metafases aberrantes GTG	0.4
Frecuencia de aberraciones por célula GTG	0.95
Frecuencia de aberraciones clonales GTG	0
Frecuencia de metafases aberrantes M-FISH SP	0.51
Frecuencia de aberraciones por célula M-FISH SP	0.88
Frecuencia de aberraciones clonales M-FISH SP	0
Firmas mutacionales presentes	SBS5, SBS29, DBS78 e ID83
Número de mutaciones de firmas SBS	1370 (MO) / 1310 (SP)
Número de mutaciones de firmas DBS	64 (MO) / 41 (SP)
Número de mutaciones de firmas ID	34 (MO) / 33 (SP)

Figura 11. Se muestra la tabla con los datos obtenidos por los tres ensayos en pacientes RAFMex007. Se muestra la tabla con el resultado de bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas en bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas por M-FISH, el tipo de firmas mutacionales encontradas y el número de cada una de ellas. Se muestran una imagen representativa de bandas GTG (izquierda) y M-FISH (centro); se muestra la gráfica de firmas mutacionales con el tipo y número de mutaciones de cada tipo (derecha).

La paciente RAFMex0007 tenía 9.7 años al momento de la toma de muestra de MO, cursaba con falla medular moderada al momento de la toma de muestra y no presentó clonalidad por análisis de bandas GTG, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.4 y una frecuencia de aberraciones por célula de 0.95. El M-FISH tampoco reveló la presencia de clonas, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.51 y la frecuencia de aberraciones por célula fue de 0.88. Respecto a las firmas mutacionales, se encontraron las SBS5, SBS29, DBS78 e ID83, siendo la SBS5 y SBS29 las que mayor número de mutaciones tuvieron.

Paciente 5 - RAFMex0008 – 11.7 años – Falla medular leve

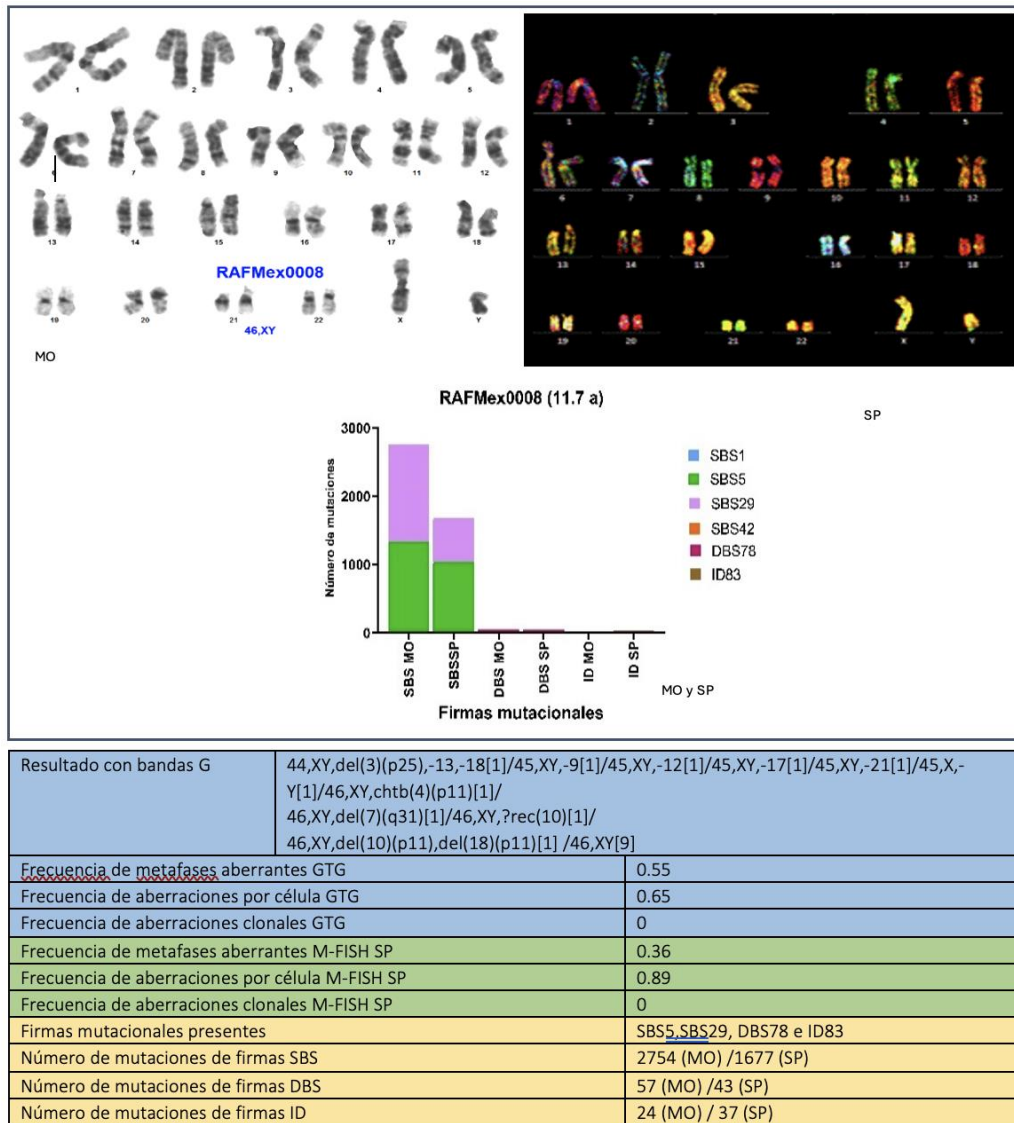


Figura 12. Se muestra la tabla con los datos obtenidos por los tres ensayos en pacientes RAFMex0008. Se muestra la tabla con el resultado de bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas en bandas GTG, las frecuencias de aberraciones obtenidas por M-FISH, el tipo de firmas mutacionales encontradas y el número de cada una de ellas. Se muestran una imagen representativa de bandas GTG (izquierda) y M-FISH (centro); se muestra la gráfica de firmas mutacionales con el tipo y número de mutaciones de cada tipo (derecha).



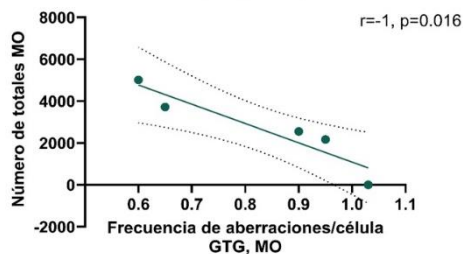
El paciente RAFMex0008 tenía 11.7 años al momento de la toma de muestra de MO, cursaba con falla medular leve al momento de la toma de muestra y no presentó clonalidad por análisis de bandas GTG, respecto a las frecuencias encontradas, se describen a continuación: la de metafases aberrantes fue de 0.55 y la de aberraciones por célula de 0.65. En el M-FISH la de metafases aberrantes fue de 0.36 y la de aberraciones por célula fue de 0.89, tampoco se reveló la presencia de clonas. Respecto a las firmas mutacionales, se encontraron las SBS5, SBS29, DBS78 e ID83, siendo la SBS5 y SBS29 las que mayor número de mutaciones tuvieron.

### Correlaciones en 5 pacientes con los 3 ensayos

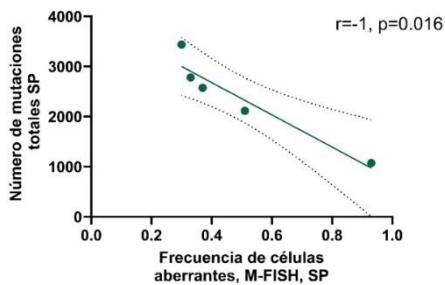
Se buscaron correlaciones y se utilizó el análisis de correlación de Spearman entre las diferentes variables: frecuencia de células aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula, tanto en MO como en SP; el número de mutaciones de cada firma mutacional, haciendo énfasis en las mutaciones SBS y el número de mutaciones totales en MO y SP.

Se obtuvo una correlación negativa entre el número de mutaciones totales en SP observadas en firmas mutacionales y la frecuencia de células aberrantes en SP por M-FISH ( $r=-1, p=0.016$ ) y una correlación negativa entre el número de mutaciones totales en MO observadas por firmas mutacionales y la frecuencia de aberraciones por célula observada en MO por bandas GTG ( $r=-1, p=0.016$ ).

**Correlación negativa entre número de mutaciones totales MO y frecuencia de aberraciones/celula en bandas GTG, MO**



**Correlación negativa entre mutaciones totales en SP y frecuencia de células aberrantes M-FISH en SP**



*Figura 13. Se muestran las gráficas de correlación. Panel superior, se observa una correlación negativa entre mutaciones totales en MO, detectadas en firmas mutacionales y la frecuencia de aberraciones por célula detectadas en MO por bandas GTG. Panel inferior, se muestra una correlación negativa entre el número de mutaciones totales en SP y la frecuencia de células aberrantes en SP observadas por M-FISH.*

Resultados de bandas G en 15 pacientes.

Con el fin de evaluar si hay correlación entre la cantidad de daño cromosómico y la edad, se tomaron en cuenta los 15 pacientes que se captaron en el tiempo programado. Los pacientes están ordenados por edad de menor a mayor.

Paciente 1 - RAFMex0029 – 5.5 años – Falla medular leve

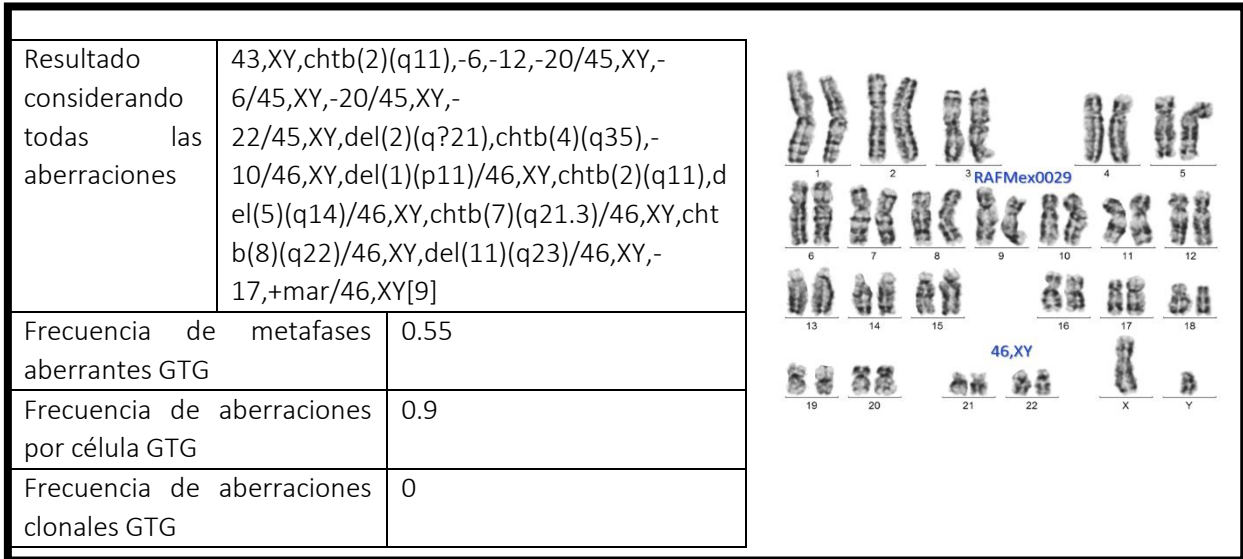


Figura 14. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0029. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados

El paciente RAFMex0029 con 5.5 años y FM leve, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.55 y la de aberraciones por célula fue de 0.9. Figura 14.

Paciente 2 - RAFMex0006 - 5.5 años – Falla medular leve

Resultado considerando todas las aberraciones	41,XY,-2,-3,-4,-12,-13[1]/45,XY,-8[2]/45,XY,-9[2]/45,XY,-20[1]/46,XY,cttb(20)(q11)[1]/46,XY,cttb(5)(q31),?inv(7)(p22p12),del(13)(q22q32)[1]/46,XY,del(5)(q31),?rec(14)[1]/46,XY,del(10)(q24)[1]/46,XY[15]	
Frecuencia de metafases aberrantes GTG	0.4	
Frecuencia de aberraciones por célula GTG	0.6	
Frecuencia de aberraciones clonales GTG	0	

Figura 15. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0006. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex0006 con 5.5 años y FM leve, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.4 y la de aberraciones por célula fue de 0.6. Figura 15.

Paciente 3 - RAFMex0009 – 6.3 años – Falla medular moderada

Resultado considerando todas las aberraciones	44,XX,-20,-21[1]/45,N[2]/45,XX,-17[1]/45,XX,-20[1]/46,XX,cttb(1)(q11)[1]/46,XX,cttb(6)(p21)[1]/46,XX,del(6)(q25),del(12)(p13)[1]/46,XX,del(7)(p15),del(15)(q22)[1]/46,XX,del(7)(q36)[1]/46,XX,del(7)(p21p15)[1]/46,XX,-11,+mar[1]/46,XX,?inv(14)(q11.2q32)[1]/46,XX[30]	
Frecuencia de metafases aberrantes GTG	0.302	
Frecuencia de aberraciones por célula GTG	0.348	
Frecuencia de aberraciones clonales GTG	0	

Figura 16. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0009. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados

El paciente RAFMex0009 con 6.3 años y FM moderada, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.302 y la de aberraciones por célula fue de 0.348. Figura 16.

Paciente 4 - RAFMex0010 - 6.7 años – Falla medular moderada

Resultado considerando todas las aberraciones	41,XX,-5,-9,-18,-21,-21[1]/45,XX,-18[1]/45,XX,-21[1]/45,XX,chtb(3)(q11),chtb(17)(q12),-21[1]/46,X,chtb(X)(q25),chtb(3)(p11)[1]/46,XX,chtb(1)(q21)[1]/46,XX,chtb(3)(p14)[1]/46,XX,chtb(3)(p11)[1]/46,XX,chtb(6)(p21),chtb(9)(q12)[1]/46,XX,chtb(6)(q16)[1]/46,XX,chtb(8)(q24)[1]/46,XX,chtb(9)(q22)[1]/46,XX,del(22)(q13)[1]/46,XX,chtb(20)(p13)[1]/46,XX[6]	
Frecuencia de metafases aberrantes GTG	0.7	
Frecuencia de aberraciones por célula GTG	1.05	
Frecuencia de aberraciones clonales GTG	0	

Figura 17. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0010. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados

El paciente RAFMex0010 con 6.7 años y FM moderada, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.7 y la de aberraciones por célula fue de 1.05. Figura17.

Paciente 5 - RAFMex0005 – 7.2 años – Falla medular leve

Resultado considerando todas las aberraciones	40,XX,-2,-5,-9,-15,-15,-17[1]/42,XX,-10,-12,-20,-21[1]/44,XX,-6,-20[1]/44,XX,-4,-8[1]/44,XX,chtb(8)(p11),-9,-20[1]/45,XX,-14[1]/45,XX,-19[1]/46,XX[13]	
Frecuencia de metafases aberrantes GTG	0.35	
Frecuencia de aberraciones por célula GTG	0.9	
Frecuencia de aberraciones clonales GTG	0	

Figura 18. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0005. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex0005 con 6.3 años y FM leve, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.35 y la de aberraciones por célula fue de 0.9. Figura 18.

Paciente 6 - RAFMex0026 – 12 años - Falla medular grave

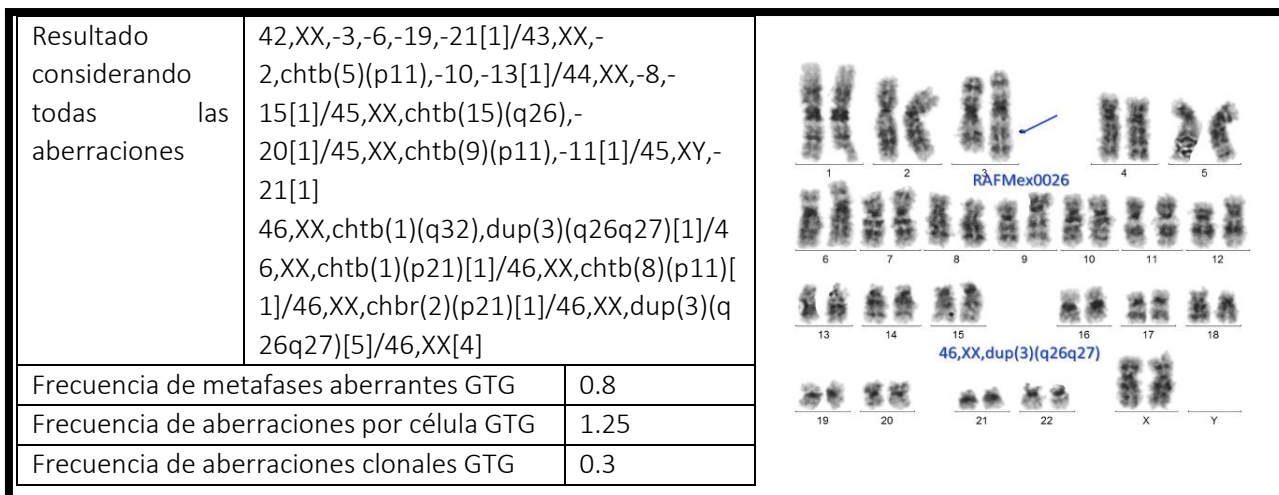


Figura 19. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0026. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex0026 con 6.3 años y FM grave al momento de la toma de muestra, mostró presencia de aberraciones clonales con una frecuencia de 0.3, la aberración clonal encontrada, la duplicación de 3q26q27, es una de las aberraciones de mayor importancia en pacientes AF, ya que se ha asociado con progresión a SMD/LMA, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.8 y la de aberraciones por célula fue de 1.25. Figura 19.

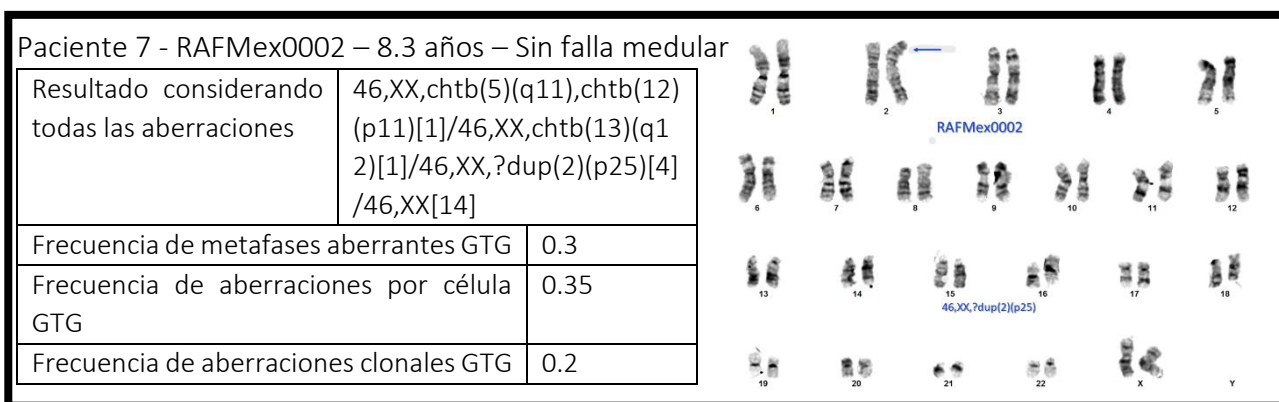


Figura 20. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0002. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex0002 con 8.3 años y sin FM, mostró presencia de aberraciones clonales, una presunta duplicación en 2p25 con una frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.3 y la de aberraciones por célula fue de 0.35. La aberración clonal no está descrita en pacientes AF. Figura 20.

Paciente 8 - RAFMex0011 – 8.9 años - Falla medular moderada.

Resultado considerando todas las aberraciones	45,XX,-14[1]/45,XX,-22[1]/46,XX,del(5)(p15)[1]/46,XX,?del(5)(q35)[1]/46,XX,chtb(2)(q10)[1]/46,XX,chtb(5)(p15)[1]/46,XX,chtb(8)(q11)[1]/46,XX,inv(10)(p12p15)[1]/46,XX,?del(11)(q23)[1]/46,XX,del(12)(p13)[1]/47,XX,+ace[1]/46,XX[9]	
Frecuencia de metafases aberrantes GTG	0.55	
Frecuencia de aberraciones por célula GTG	0.55	
Frecuencia de aberraciones clonales GTG	0	

Figura 21. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0011. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex0011 con 8.9 años y FM moderada, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.55 y la de aberraciones por célula fue de 0.55. Figura 21.

Paciente 9 - FANC170 - 9 años – LMA, post primer quimioterapia

Resultado considerando todas las aberraciones	43,XX,-6,-15,-19[1]/44,XX,-19[1]/44,X,chtb(X)(q25),chtb(7)(q11),chtb(8)(q13),chtb(9)(q13),-17,-22[1]/45,X,chtb(X)(p11.2),chtb(1)(q32),chbr(3)(q12),-7,?add(q11)(10)[1]/45,XX,chtb(7)(p15),chtb(17)(p11),-14[1]45,XX,-15[1]/46,XX,chbr(1)(q21)[1]/46,XX,chtb(9)(q11),-19,+mar[1]/46,XX,chtb(13)(q22)[1]/47,XX,+12[1]/46,XX,chbr(2)(q31)[1]/46,XX[15]	
Frecuencia de metafases aberrantes GTG	0.423	
Frecuencia de aberraciones por célula GTG	1.038	
Frecuencia de aberraciones clonales GTG	0	

Figura 22. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente FANC170. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas

El paciente FANC170 con 9 años y cursaba con LMA, al momento de la toma de muestra ya había recibido la primera sesión de quimioterapia, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.423 y la de aberraciones por célula fue de 1.038. Figura 22.

Paciente 10 - RAFMex0007 – 9.7 años – Falla medular moderada

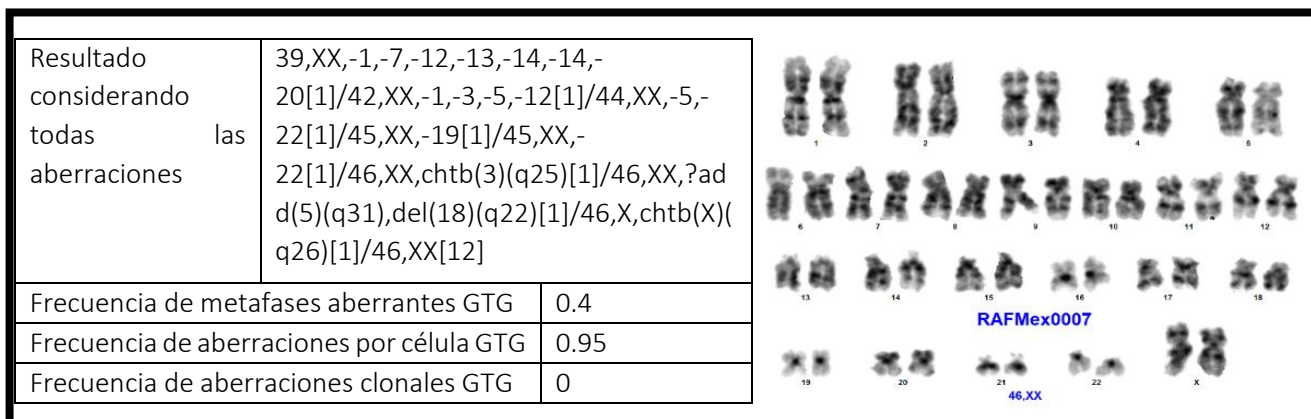


Figura 23. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0007. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex007 con 9.7 años y FM moderada, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.4 y la de aberraciones por célula fue de 0.95. Figura 23.

Paciente 11 - RAFMex0008 – 11.7 años – Falla medular leve

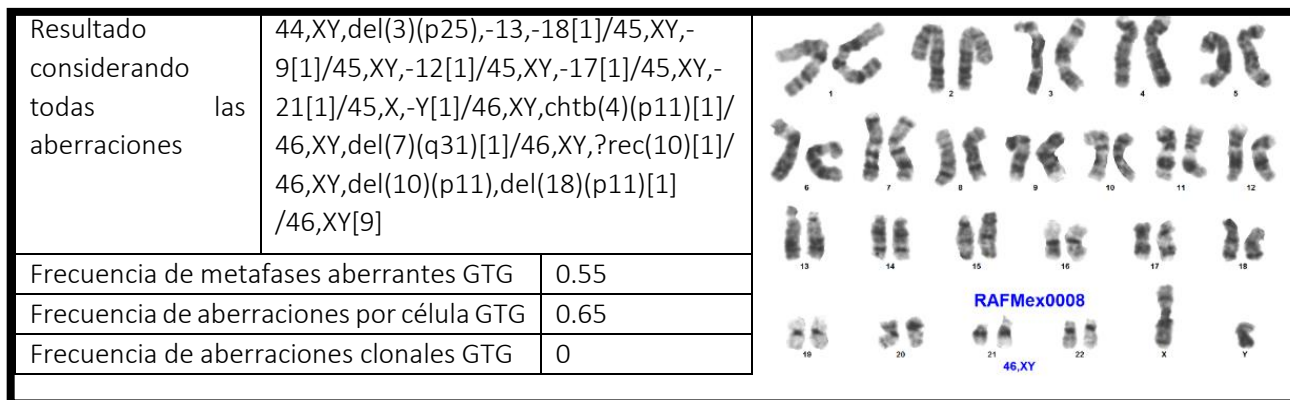


Figura 24. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0008. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.



El paciente RAFMex0008 con 11.7 años y FM leve, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.55 y la de aberraciones por célula fue de 0.65. Figura 24.

Paciente 12 - RAFMex0018 – 13.3 años - Falla medular moderada

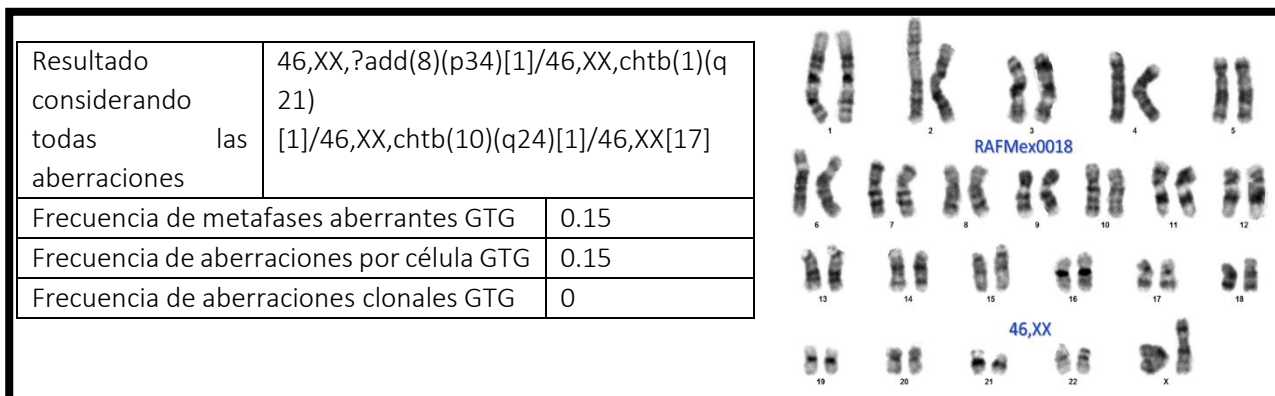


Figura 25. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0018. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex0018 con 13.3 años y FM moderada, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.15 y la de aberraciones por célula fue de 0.15. Figura 25.

Paciente 13 - RAFMex0031 – 13.8 años – SMD

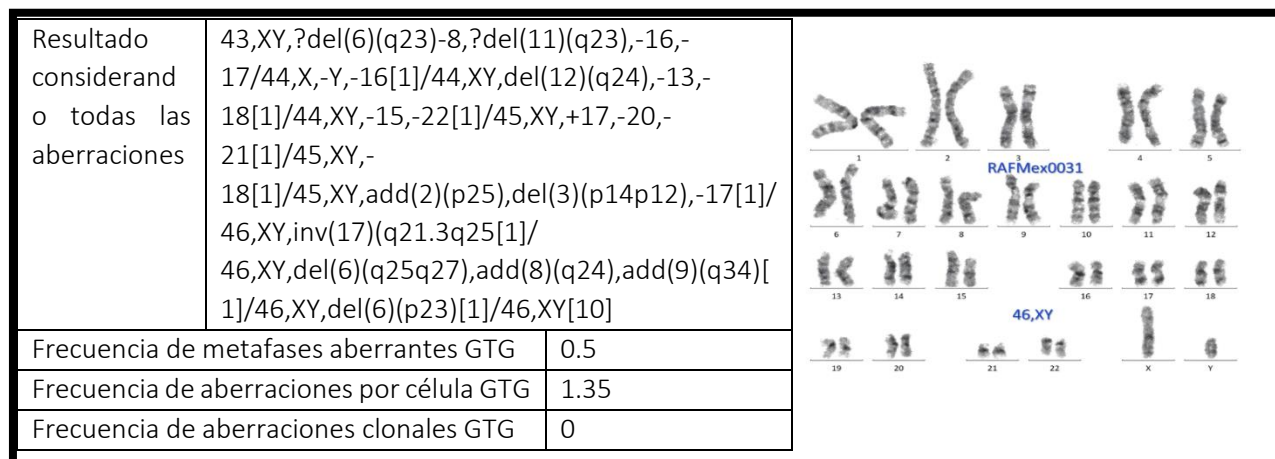


Figura 26. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0031. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.



El paciente RAFMex0031 con 13.8 años y SMD, no mostró presencia de aberraciones clonales, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.5 y la de aberraciones por célula fue de 1.35. Curso con la segunda frecuencia más alta de aberraciones por célula. Figura 26.

Paciente 14 - RAFMex0015 – 17.3 años – SMD

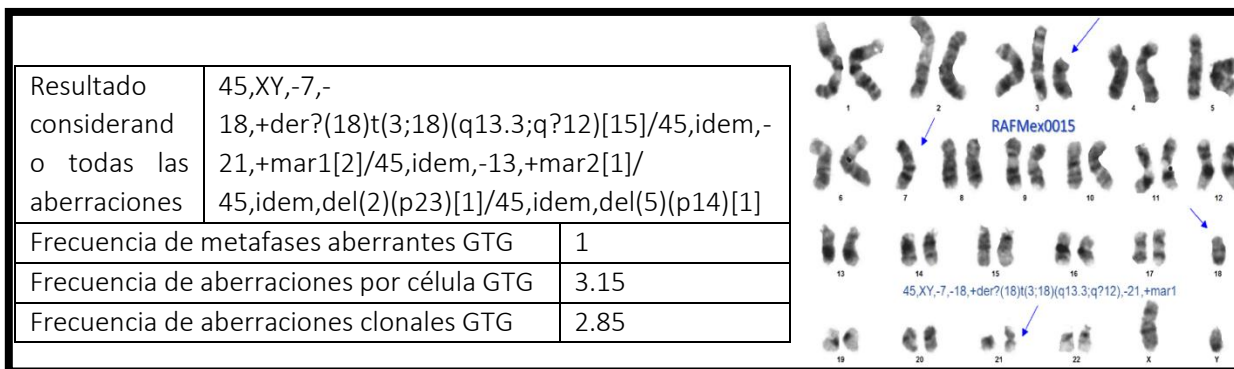


Figura 27. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0015. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex0015 con 17.3 años y SMD, mostró una frecuencia de aberraciones clonales de 2.85, prácticamente todas las metafases tuvieron alteraciones, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 1 y la de aberraciones por célula fue de 3.15. Este fue el paciente con frecuencia más alta de aberraciones por célula. Figura 27.

Paciente 15 - RAFMex0027 – 22 años – Sin falla medular, mosaico

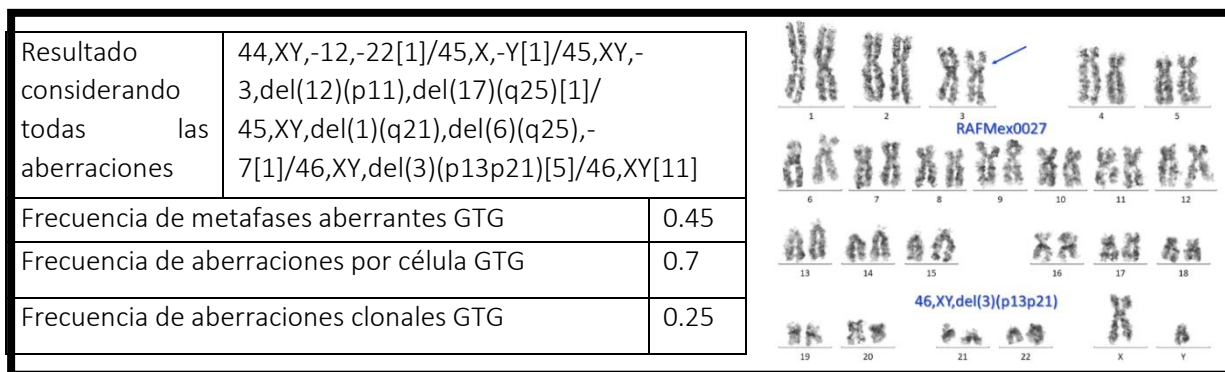


Figura 28. Se muestra la tabla con los resultados obtenidos de frecuencia de metafases aberrantes, frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de aberraciones clonales del paciente RAFMex0027. A la derecha se muestra una imagen representativa de los cromosomas observados.

El paciente RAFMex0027 con 22 años y sin falla medular, mostró presencia de aberraciones clonales, una delección intersticial de (3)(p13p21), con una frecuencia de 0.25, la frecuencia de metafases aberrantes fue de 0.45 y la de aberraciones por célula fue de 0.7. Figura 28.

Aberraciones cromosómicas por caso bandas GTG

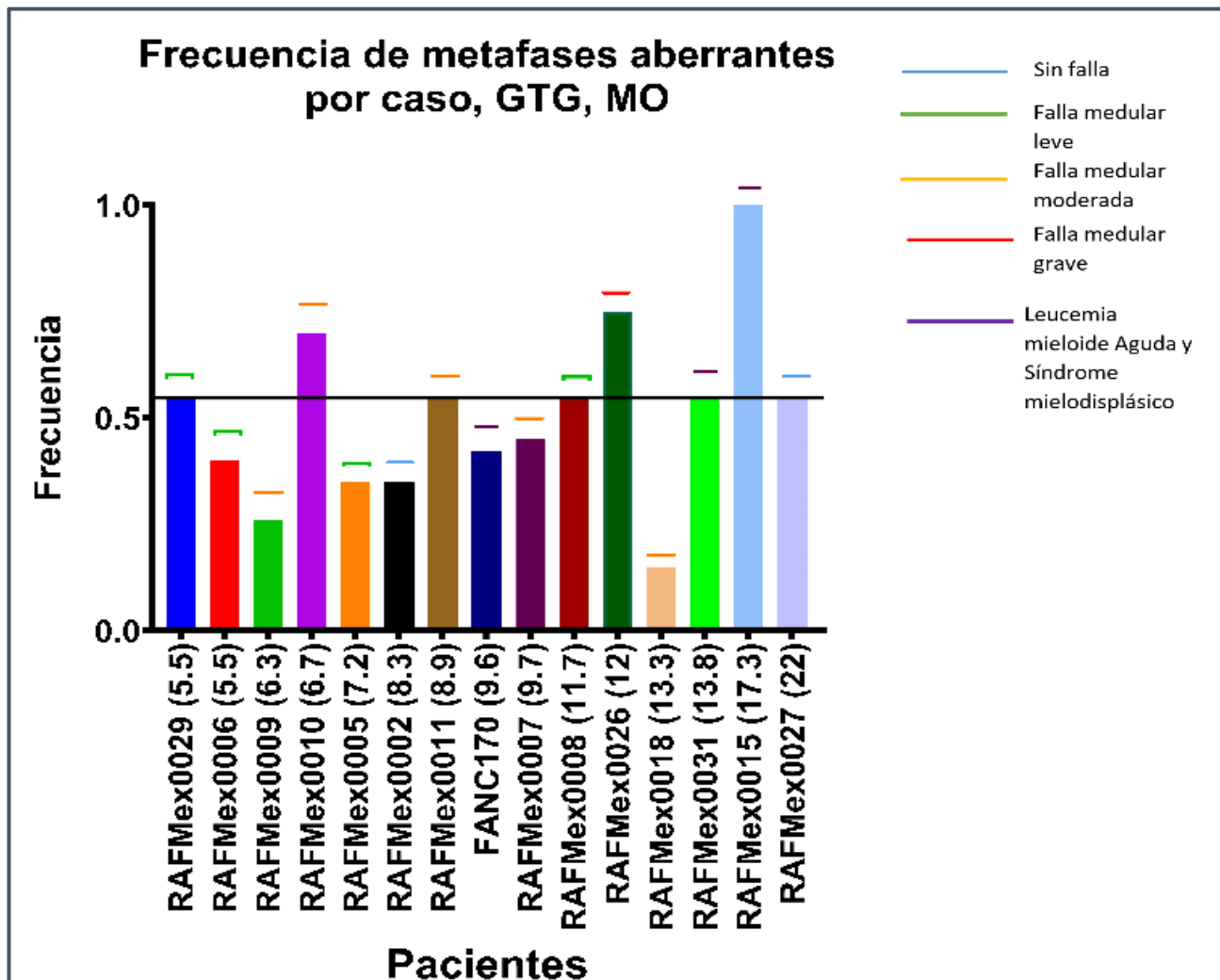


Figura 29. Gráfico de barras que muestra las frecuencias de células aberrantes en las diferentes pacientes obtenidas por análisis de bandas GTG en médula ósea.

La figura 29 muestra una gráfica de las frecuencias de células aberrantes, ordenadas de acuerdo a la edad de los pacientes. La línea marca la mediana, se observan las clasificaciones de grado de falla medular en: sin falla, leve, moderada, grave y los casos donde hay síndrome mielodisplásico (SMD)/leucemia mieloide aguda (LMA). Con flecha negra se marcan los pacientes que desafortunadamente fallecieron, llama la atención que dos de estos pacientes son de los de mayor edad, mientras que otros dos estaban entre los 8 y 9 años, pero presentaron falla medular grave o cáncer. EL paciente RAFMex0026 mostró falla medular

grave, lo cual concordó con el hallazgo de la duplicación del brazo largo del cromosoma 3, que está descrita como uno de los hallazgos más importantes y graves en médula ósea de pacientes con AF; este paciente fue ingresado para trasplante de células progenitoras

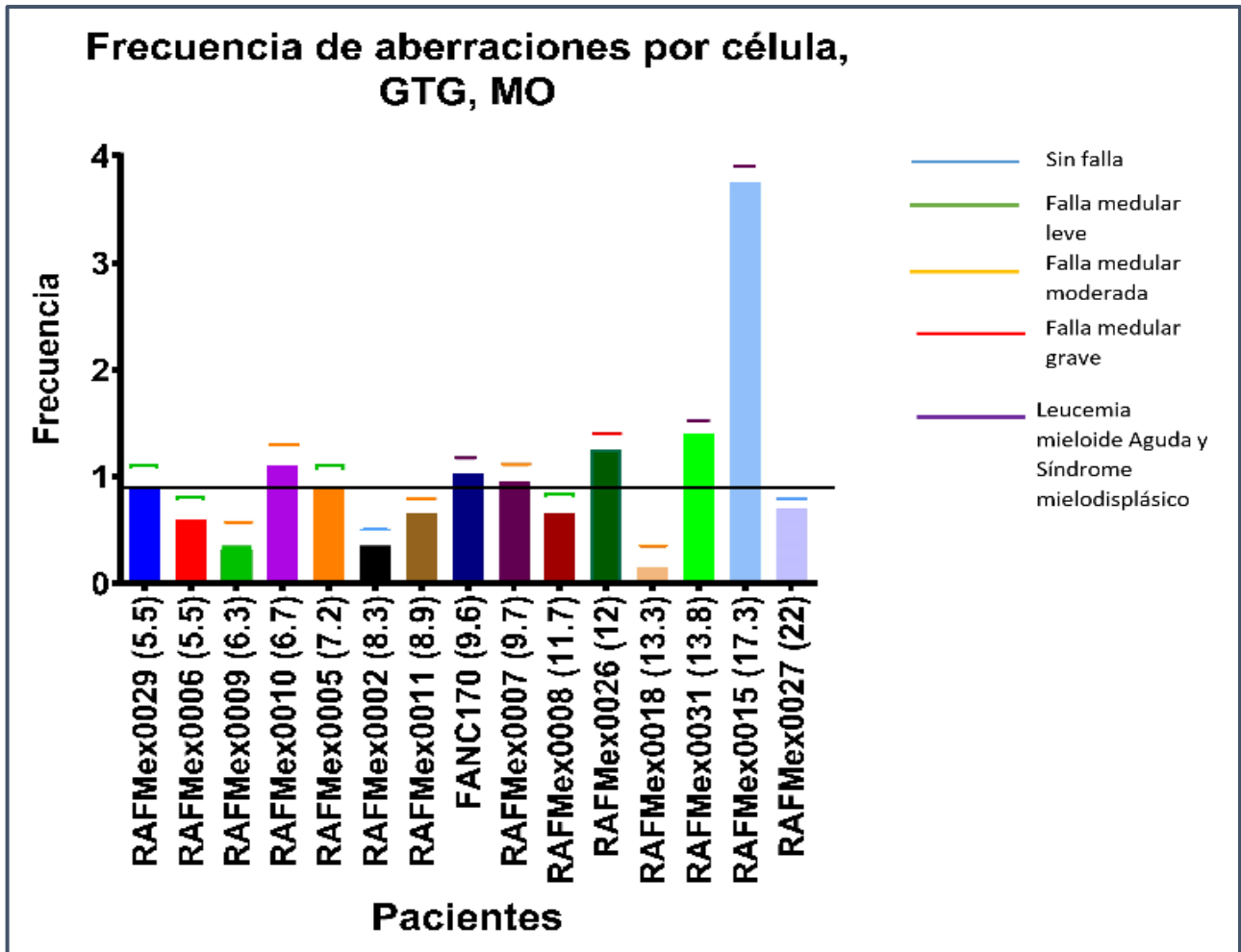


Figura 30. Gráfico de barras que muestra las frecuencias de aberraciones por célula en las diferentes pacientes obtenidas por análisis de bandas GTG en médula ósea.

hematopoyéticas pero desafortunadamente falleció debido a una infección oportunista. La paciente FANC170 fue estudiada cuando ya tenía un diagnóstico de LMA y se había realizado la primera quimioterapia, la cual hizo que las células más afectadas a nivel de daño cromosómico murieran; esto puede explicar porque se encontró una frecuencia baja aberraciones muy parecida a la de los pacientes sin enfermedad neoplásica, en este caso se observaron con M-FISH, principalmente rupturas, y monosomía 7 así como otras aberraciones clonales relacionadas con cambios neoplásicos.

Respecto a los otros dos pacientes que fallecieron, ambos presentaban SMD y se encontraban entre los 14 y 17 años. En general, se observó una tendencia a encontrar más

células aberrantes conforme aumenta la edad de los pacientes AF. Lo cual sugiere asociación entre la edad y el incremento en daño cromosómico, pero también fue evidente que la adquisición de clonas aumenta con la edad; esto es el resultado de la selección positiva por alteraciones cromosómicas que confieren ventaja mediante el escape de la apoptosis y la activación de vías de proliferación celular.

La figura 30 muestra una gráfica de la frecuencia de aberraciones por célula. Los pacientes están ordenados por edad y se observa en general que los pacientes que se encuentran en la derecha y que presentaron ya sea falla medular grave o SMD, son los que evidenciaron las frecuencias más altas de aberraciones por célula, la cual fue mayor a la mediana. Es notable como RAFMex0026 a pesar de que no tuvo alta frecuencia por célula, las alteraciones que presentó estaban relacionadas fuertemente con neoplasia (3q+). Asimismo, en los casos de RAFMex0015 y FANC170 en los que se encontró monosomía 7 más otras alteraciones y monosomía 7 sola. FANC170 además tuvo en su mayoría aberraciones tipo rupturas, lo que se relacionan con el hecho de que la muestra fue obtenida después del primer ciclo de quimioterapia. RAFMex0031 por otro lado, no mostró clonalidad pero si una frecuencia bastante alta de aberraciones por célula.

Frecuencia de aberraciones por cromosoma en todos los casos bandas GTG en MO

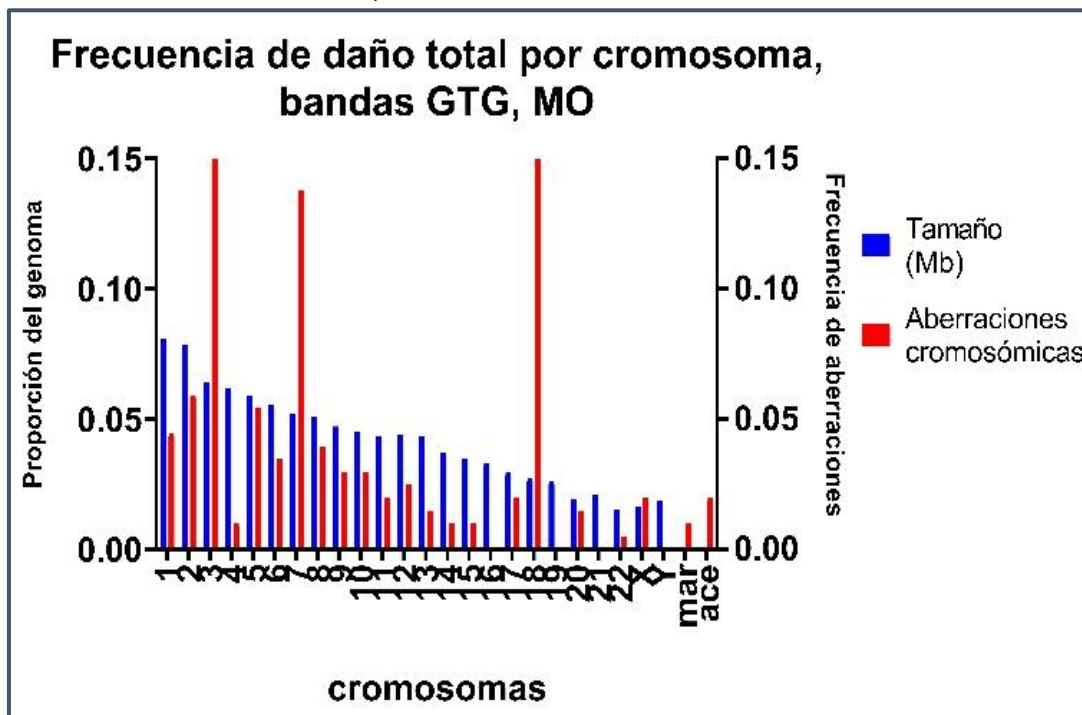


Figura 31. Se muestra en azul el tamaño proporcional de cada cromosoma al genoma humano y en rojo la frecuencia de los cromosomas en los cuales se encontraron las aberraciones, nótese que cromosomas como el 3, 7 y 18, otros pasan por encima de la línea azul, que sería lo esperado si las aberraciones se distribuyeran al azar. Del lado izquierdo están las aberraciones. Datos obtenidos por bandas GTG en MO.

En la figura 31 se muestran los cromosomas que más frecuentemente se vieron involucrados en aberraciones cromosómicas por bandas GTG. En color azul está dividido todo el genoma entre lo que le corresponde a cada cromosoma, siendo el cromosoma 1 el que mayor proporción del genoma representa y por lo tanto donde más aberraciones se esperarían por azar. Se puede observar que los cromosomas que tienen más aberraciones de las esperadas son: 3, 7, 18.

Panorama de todos los tipos de aberraciones encontradas en los pacientes AF en MO.

Se muestran en la figura 32 los diferentes tipos de aberraciones que se encontraron por bandeado GTG y su proporción, las alteraciones más frecuentes fueron las deleciones seguidas de duplicaciones.

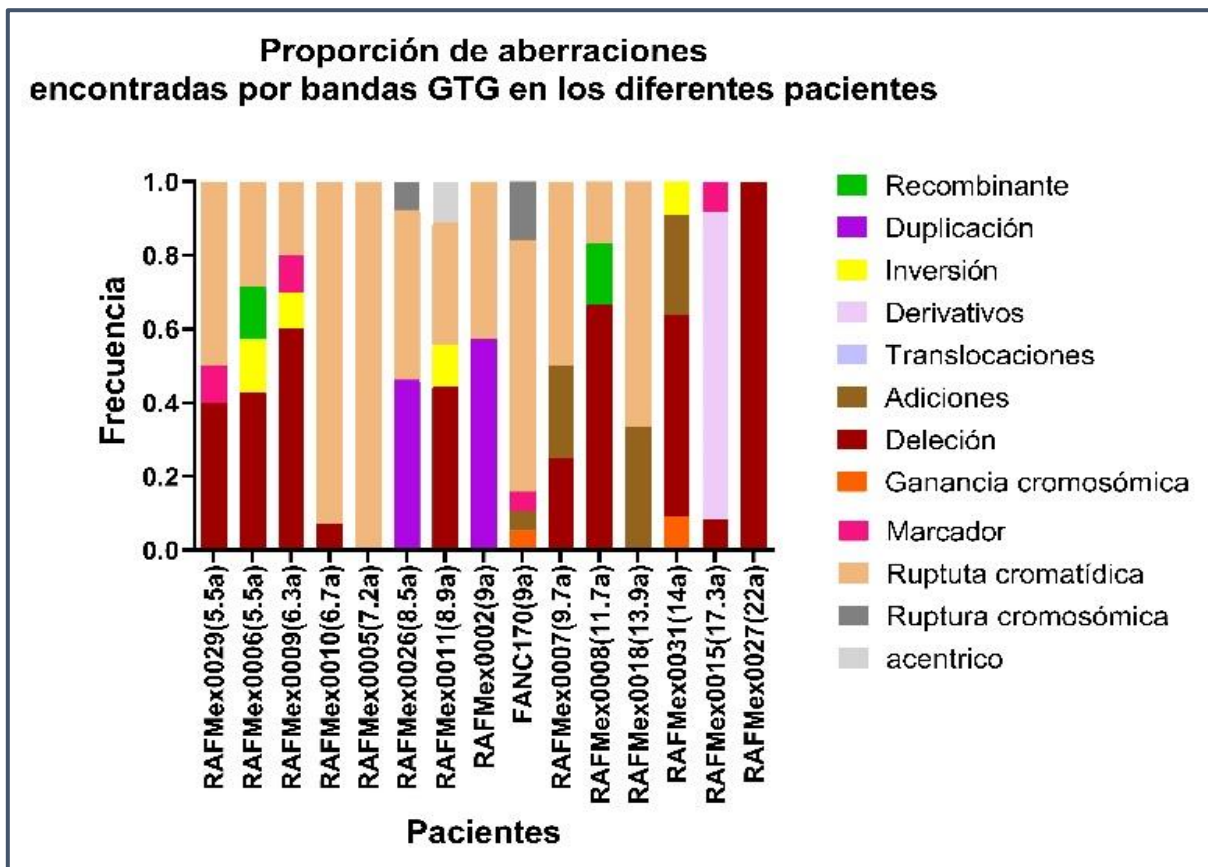


Figura 32. Se muestran el panorama de todas las aberraciones y su proporción que se presentaron en los pacientes en MO por bandas GTG. Nótese que las deleciones es el tipo de aberración más común.

La gráfica 32 muestra a todos los pacientes ordenados por edad y la frecuencia de aberraciones tanto clonales como no clonales que se observaron, puesto que una célula podía tener más de una aberración, la frecuencia puede ser mayor a 1. Se subraya el grado

de falla medular con colores encima de la barra. La flecha negra indica a los pacientes que fallecieron. En color azul están representadas las aberraciones no clonales en MO por bandas GTG en rojo las aberraciones clonales. La línea oscura marca la mediana de la frecuencia de aberraciones en MO. Nótese que la mayoría de los pacientes que sobrepasan este son aquellos que presentaron LMA, SMD o falla medular grave (4/7).

Frecuencia de aberraciones clonales y no clonales en pacientes AF

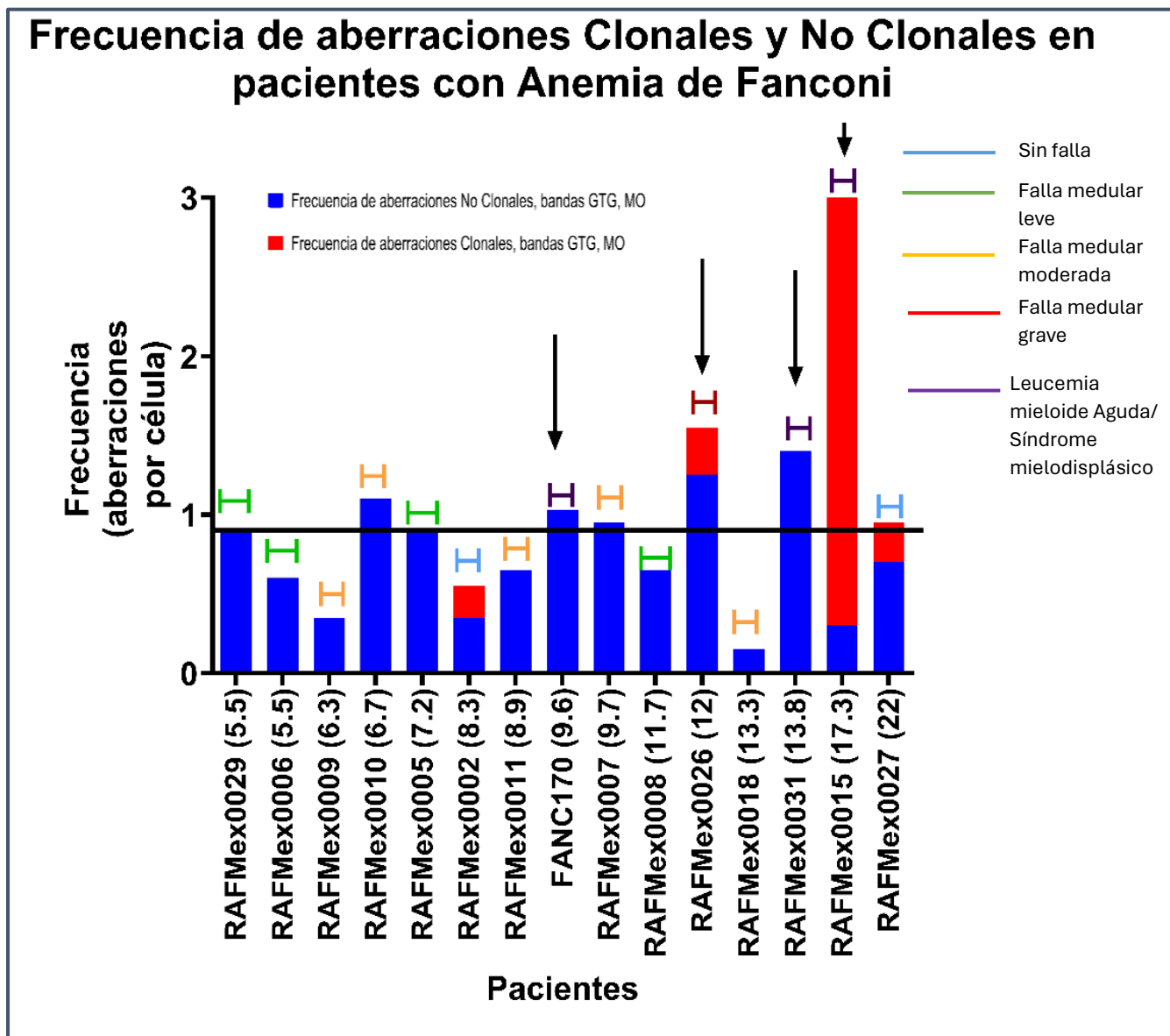


Figura 33. Se muestran todas las alteraciones que se obtuvieron tanto por bandas GTG en MO como por M-FISH en SP, en azul están las aberraciones no clonales en MO, en rojo las aberraciones no clonales en SP y los demás colores denota la presencia de clonas. La flecha roja marca los pacientes que han fallecido. En los rectángulos de colores se denota el grado de falla medular o la presencia de LMA/SMD.

La gráfica 33 muestra a todos los pacientes ordenados por edad y la frecuencia de aberraciones tanto clonales como no clonales que se observaron, puesto que una célula podía tener más de una aberración, la frecuencia puede ser mayor a 1. Se subraya el grado de falla medular con colores encima de la barra. La flecha negra indica a los pacientes que fallecieron. En color azul están representadas las aberraciones no clonales en MO por bandas GTG t en rojo las aberraciones clonales. La línea oscura marca la mediana de la frecuencia de aberraciones en MO. Nótese que la mayoría de los pacientes que sobrepasan este son aquellos que presentaron LMA, SMD o falla medular grave (4/7).

#### Correlaciones en bandas GTG

La edad mostró una correlación positiva ( $p=0.048$ ,  $r=0.52$ ) con la frecuencia de aberraciones clonales; en la frecuencia de aberraciones no clonales por célula y frecuencia de células aberrantes, solamente se observa una tendencia a que a mayor edad haya mayor frecuencia de células aberrantes y de aberraciones. Figura 34.

El grado de falla medular mostró una correlación significativa con la frecuencia de aberraciones por célula ( $p=0.011$ ,  $r=0.647$ ), es decir a mayor grado de falla medular, mayor frecuencia de aberraciones por célula.

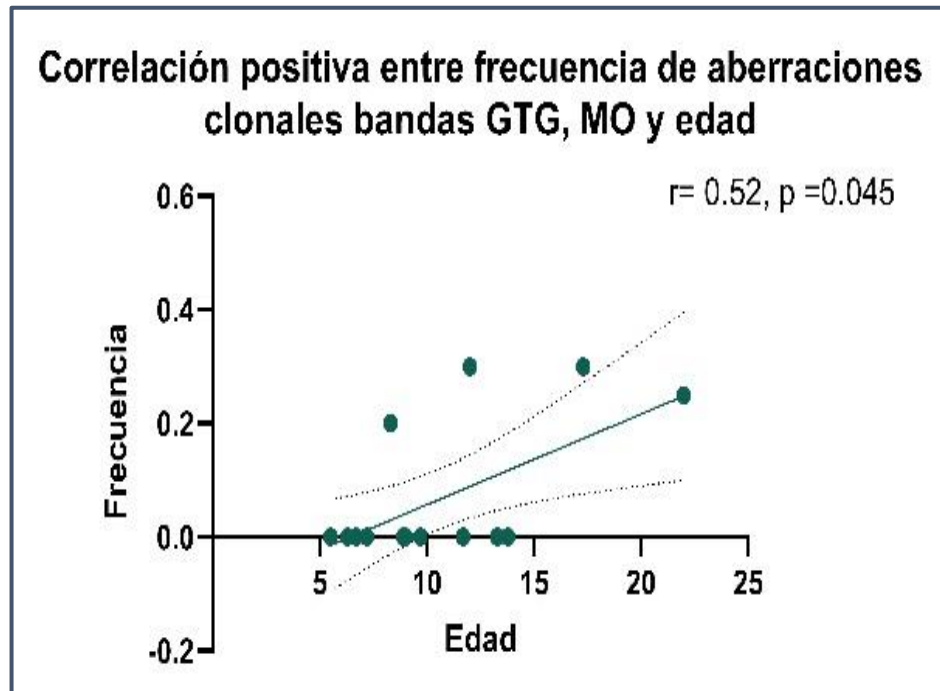


Figura 34. Correlación positiva entre la edad y la frecuencia de aberraciones clonales en pacientes AF, detectadas por bandas GTG en MO,  $p<0.05$ ,  $r0.52$

## Daño genómico detectado por firmas mutacionales

En 10 de los 15 pacientes estudiados se realizó la búsqueda de firmas mutacionales en sangre periférica y médula ósea, en los pacientes FANC170 sólo se analizó en MO y en RAFMex0015 únicamente en SP. Se obtuvieron las firmas *de novo* de SBS, DBS e Indels (ID). A continuación se describen los resultados obtenidos de cada tipo de firma.

### Firmas de sustitución de una base (SBS)

Respecto a las SBS, se encontraron dos firmas que podrían ser propias de pacientes con AF (figura 35A y 35B).

La firma SBS96A está compuesta por SBS46, SBS5 y SBS29, mientras que SBS96B está compuesta por SBS5, SBS42, SBS29 y SBS1.

La SBS1 se asocia con la desaminación espontánea de la 5-metil-citosina, es una firma parecida a reloj, ya que ocurre a tasas constantes a través del tiempo, se observó en poca proporción en las muestras FANC170 y RAFMex0006 de SP y MO. La SBS5 se relaciona con una firma parecida a reloj y se encontró en todos los pacientes, a excepción de la muestra de MO de RAFMex0006.

La firma SBS29 se encontró en todos los pacientes a excepción de FANC170, paciente con LMA que había recibido su primer quimioterapia al momento de la toma de muestra. Esta firma se asocia con la masticación de tabaco en cáncer de pulmón; en el contexto de los pacientes AF participantes en este estudio, es posible que tenga relación con la inducción de lesiones semejantes, por algún mecanismo que hasta el momento no se ha podido dilucidar.

La firma SBS42 está asociada a la exposición a haloalcanos y solo se encontró en RAFMex0006 en ambos tejidos, así como en RAFMex0015 en SP.

Por último la firma SBS46 se ha interpretado como un artefacto de la técnica de secuenciación y estuvo presente en todas las muestras.



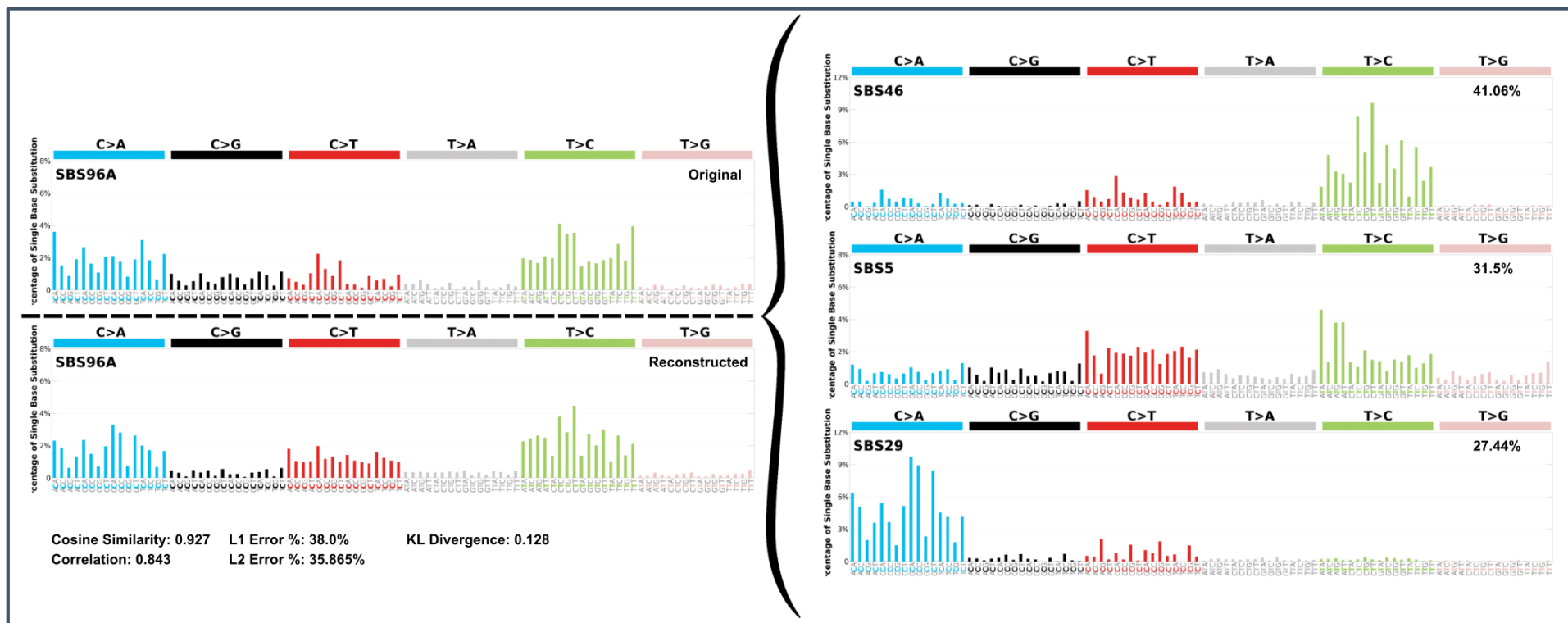


Figura 35 A) Se muestra la firma mutacional SBS96A y las firmas que la componen: SBS46, SBS5 y SBS29 obtenidas a partir de nuestros pacientes.

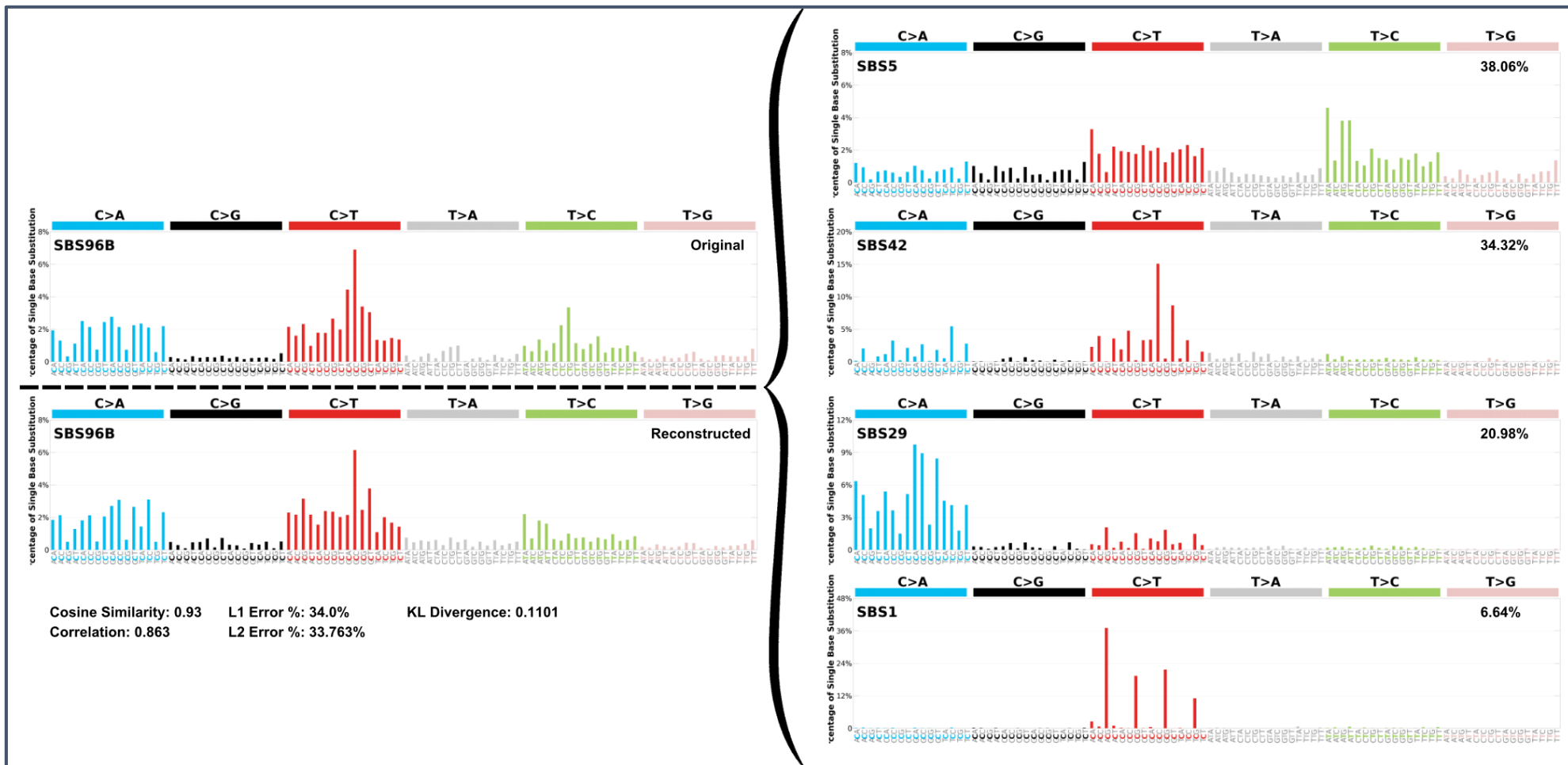


Figura 35 B) Se muestran la firma mutacional SBS96B que está compuesta por las firmas SBS5, SBS42, SBS29 y SBS1. Datos obtenidos a partir de nuestros pacientes.

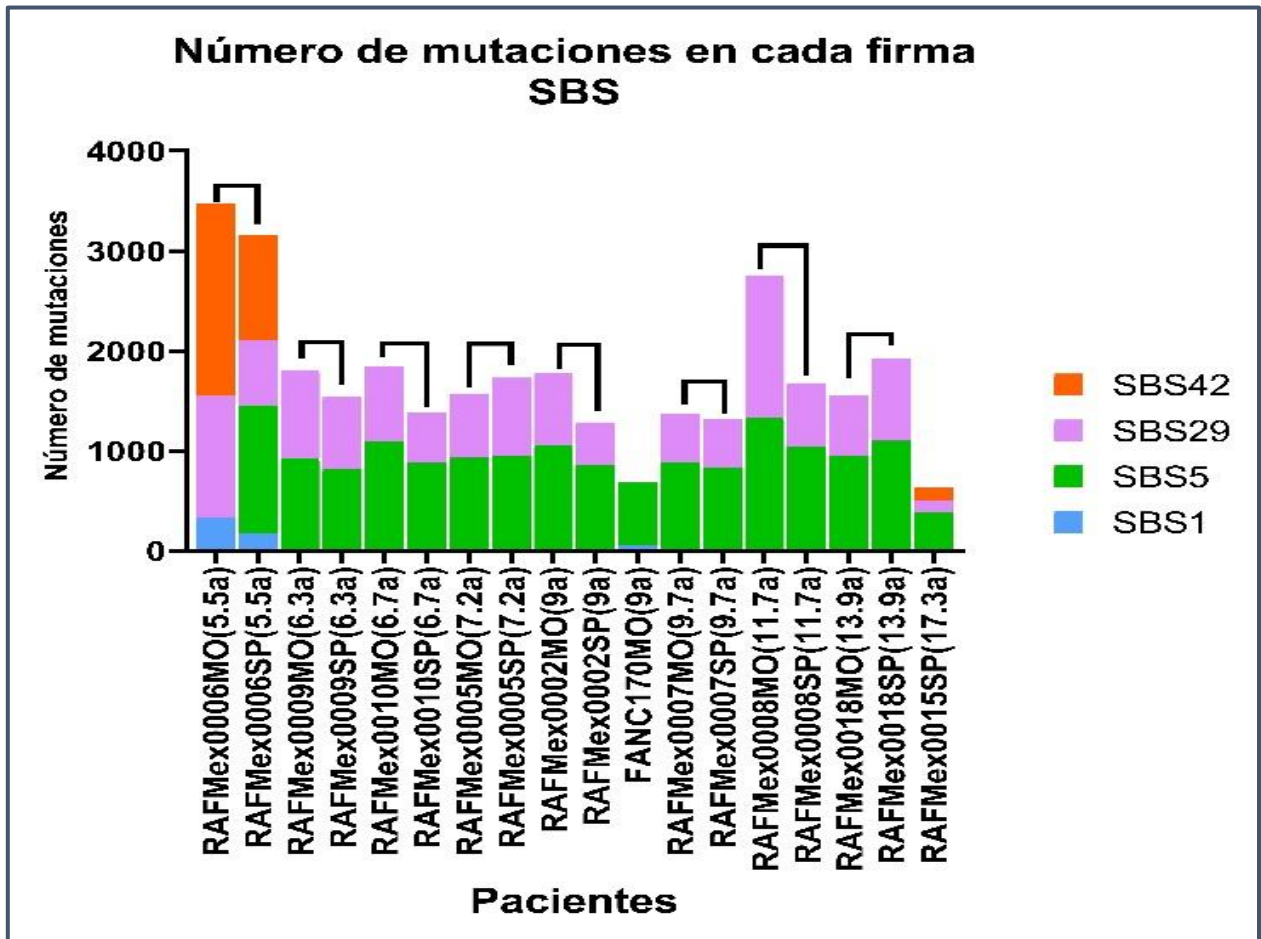


Figura 36. Se muestran el número de mutaciones en cada firma que se encontraron en los diferentes pacientes y sus tejidos. Del lado derecho se muestran las etiologías propuestas para cada firma. Nótese que la única firma compartida por todas las muestras, la SBS42 está catalogada como un artefacto. La firma SBS5 solo está ausente en RAFMex0006 MO

#### Firmas de sustitución de doble base (DBS)

La firma DBS78A se encontró en los pacientes AF estudiados, la cual está compuesta por DBS11 y que al revisar en las bases de datos de COSMIC, aparece como una firma de etiología desconocida hasta el momento. Esta firma se encuentra prácticamente en todos los pacientes estudiados, en un rango 31 a 149 mutaciones.

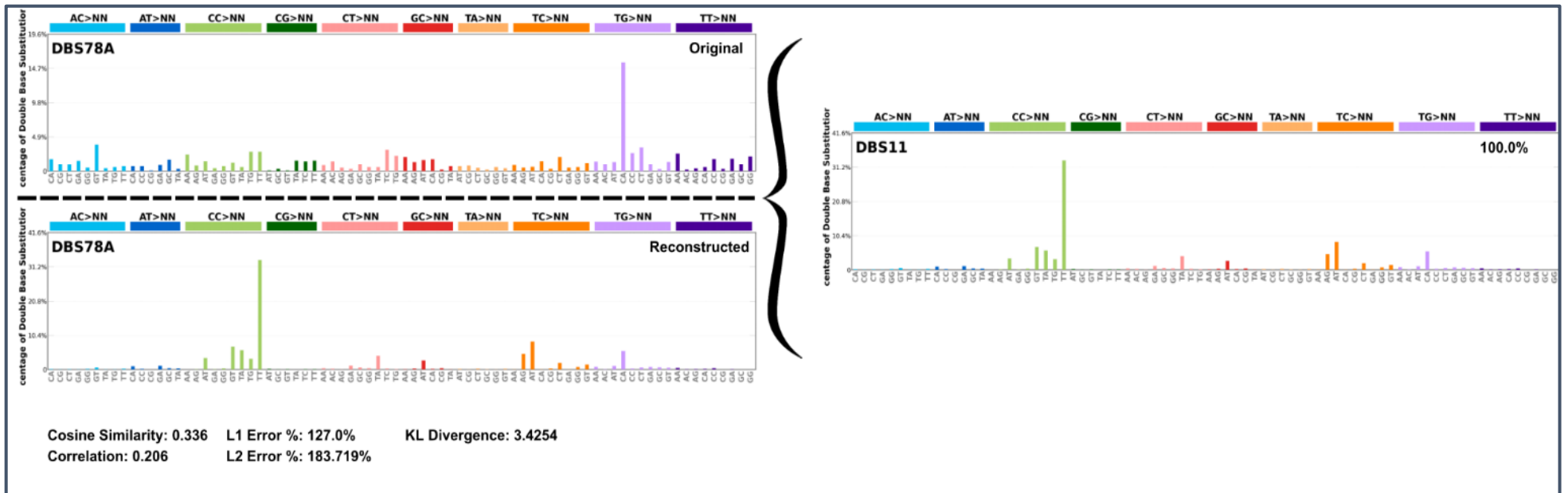


Figura 37. Se muestran la firma mutacional DBS78A, la firma está compuesta por la firma DBS11, la cual no tiene etiología propuesta. Datos obtenidos a partir de nuestros pacientes.

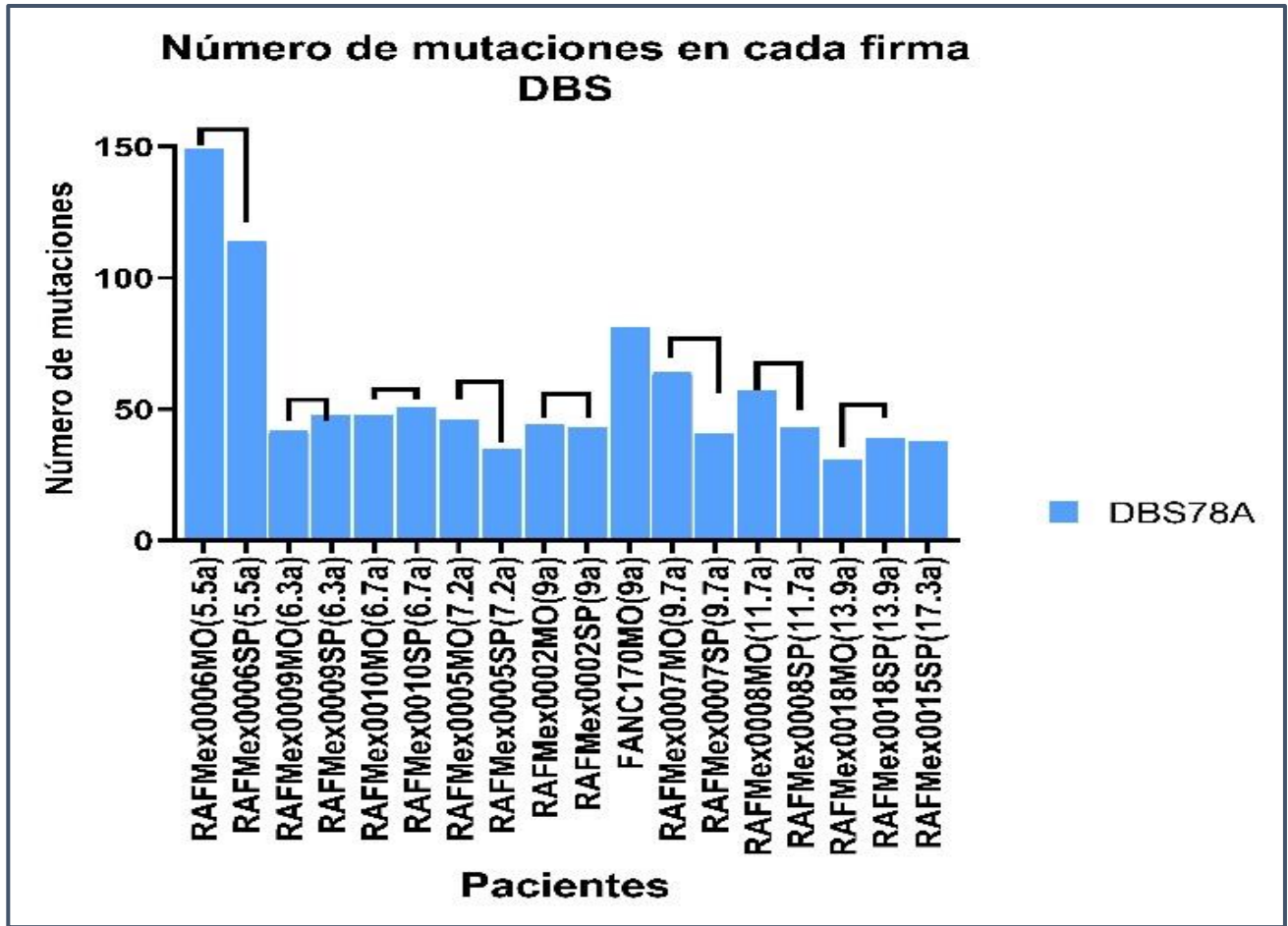


Figura 38. Firma BDS78A, en los diferentes pacientes y sus tejidos, está compuesta por la firma DBS11 todos los pacientes la presentaron y el paciente con mayor número de mutaciones fue el RAFMex0006.

Firmas de inserciones y deleciones (ID)

En cuanto a la firma ID que se encontró en los pacientes AF, fue la ID83A, la cual está compuesta por la firma ID10, también tiene una etiología desconocida. Esta firma también se encontró en todos los pacientes en un rango de 23-245 mutaciones.

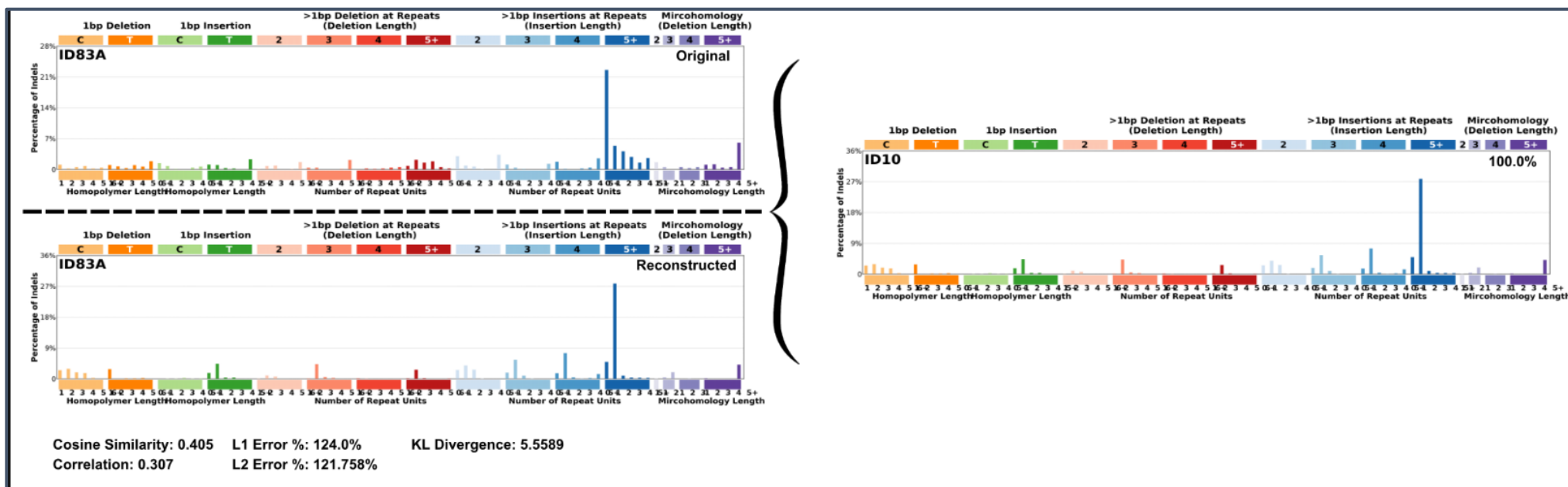


Figura 39. Se muestran la firma mutacional ID83, la firma está compuesta por la firma ID10, la cual no tiene etiología propuesta. Datos obtenidos a partir de nuestros pacientes.

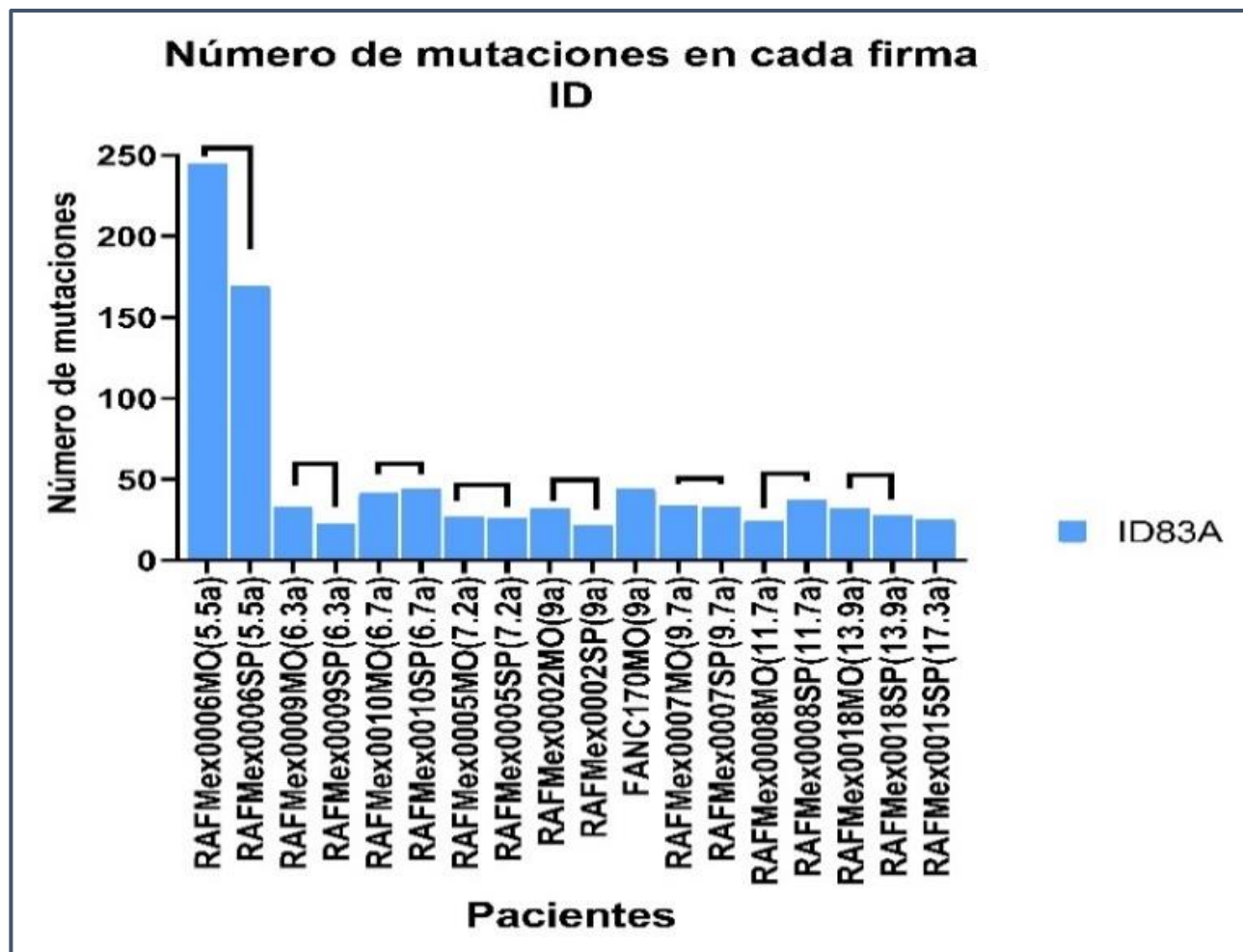


Figura 40. Se observa la distribución del número de mutaciones ID83 en los diferentes pacientes. Se observa que RAFMex0006 mostró el mayor número de mutaciones. Figura 36. Se muestran el número de mutaciones en cada firma que se encontraron en los diferentes pacientes y sus tejidos.

Firmas de inserciones y deleciones (ID)

En cuanto a la firma ID que se encontró en los pacientes AF, fue la ID83A, la cual está compuesta por la firma ID10, también tiene una etiología desconocida. Esta firma también se encontró en todos los pacientes en un rango de 23-245 mutaciones.

Tabla 6. Resumen de la etiología de las firmas mutacionales encontradas en pacientes AF

Firma	Tipo de muestra		Etiología propuesta por Alexandrov et al.	Hipótesis sobre su presencia en AF
	Médula	Sangre		
<b>SBS1</b>	RFMX06	RFMX06/FA NC170	Desaminación espontánea de la 5-metilcitosina (firma parecida a reloj)	Envejecimiento prematuro
<b>SBS5</b>	Todos menos RFMX06	Todos	Envejecimiento/Fumar tabaco/deficiencia de NER (firma parecida a reloj)	Envejecimiento prematuro
<b>SBS29</b>	Todos	Todos menos FANC170	Masticación de tabaco	Nitrosaminas que forman aductos en el ADN, se detectan en saliva y los metabolitos en orina. Presentes en embutidos
<b>SBS42</b>	RFMX06	RFMX06 y RFMX15	Exposición ocupacional a holoalcános	Posiblemente por aldehídos endógenos
<b>SBS46</b>	Todos	Todos	Artefacto	Artefacto
<b>DBS11</b>	Todos	Todos	Desconocida	Desconocida
<b>ID10</b>	Todos	Todos	Desconocida	Desconocida

*Desglose de las firmas mutacionales, según el paciente en el que se encontró, tipo de tejido, la etiología y la hipótesis propuestas sobre su presencia en pacientes AF.*



## Discusión

- Identificar daño cromosómico numérico y estructural mediante el ensayo de cariotipo con bandeado GTG y M-FISH y en muestras de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP) de los pacientes con anemia de Fanconi.

Respecto al daño cromosómico detectado por bandas G en los pacientes, se obtuvieron 5 de 15 resultados con la presencia de clonas, (RAFMex0002, RAFMex0015, RAFMex0026, RAFMex0027 y FANC170) de las cuales 3 se relacionaron con la progresión hacia neoplasia hematológica en los tres meses siguientes al diagnóstico citogenético en médula ósea; estos fueron los casos RAFMex0026 que tuvo una duplicación de 3q, el caso RAFMex0015 mostró una monosomía 7 y un derivado de una translocación aparentemente entre el cromosoma 3 y el 18, que también progresó hacia una neoplasia hematológica y FANC170, que presentó LMA y había recibido su primer quimioterapia al momento de la toma de muestra; en él se detectó la presencia de monosomía 7; estos tres casos mostraron aberraciones que han sido relacionadas en la literatura con la progresión hacia malignización, la duplicación de 3q y monosomía 7 (Behrens et al., 2021).

La monosomía 7 o delección de 7q, es un hallazgo citogenético frecuente en LMA o SMD que ocurren en la población general y también en pacientes con síndromes con predisposición a desarrollar padecimientos mieloides como es la AF, lo cual sugiere la presencia de genes supresores de tumores que se pierden o genes supresores de tumores que presentan haploinsuficiencia cuando hay monosomía 7 o delección de 7q.; recientemente se han logrado identificar genes en los que se ha demostrado relación con leucemia, como son: *CUL1*, *CUX1*, *EZH2*, *KMT2C*, *LUC7L2*, *SAMD9*, *KRIT1*, *RINT1*, *XRCC2* y *NRF1* (Mori et al., 2023).

Respecto a la ganancia de 3q, la literatura indica que esta duplicación está relacionada con la expresión a la alta del gen *EVI1*, un factor de transcripción de dedos de zinc, lo que ocasiona inestabilidad genómica, una interacción alterada con factores de transcripción relacionados con diferenciación y proliferación de células troncales hematopoyéticas y un aumento en la resistencia a la apoptosis, por lo que actúa como un oncogen (Birdwell et al., 2021; Meyer et al., 2011).

El paciente RAFMex0031 desarrolló anemia aplásica y no hubo presencia de aberraciones clonales, pero se aprecia una frecuencia de aberraciones no clonales anormalmente alta, de 1.35/célula.

Los pacientes RAFMex0015, RAFMex0027, FANC170 y RAFMex0031, desafortunadamente fallecieron. El caso RAFMex0027 por otro lado, es el paciente con mayor edad del estudio,

con 22 años, mostró falla medular leve y presencia de clonalidad con una delección intersticial del cromosoma 3 en el brazo corto, dicha alteración se ha relacionado con LMA (Lindquist et al., 2000), estos hallazgos son atípicos ya que se esperaría mayor afectación al estado medular del paciente, sin embargo es mosaico somático para AF, es decir, algunas de sus células sufrieron reversión o mutaciones compensatorias en las células troncales de la MO (Nicoletti et al., 2020), lo cual rescata la función de la vía FA/BRCA y es presumiblemente por esta razón que el paciente se comporta de manera atípica.

Adicionalmente, el caso RAFMex0002, con una probable duplicación de 2p, la cual debe ser corroborada, no muestra progresión de la médula hacia SMD o LMA, se considera una aberración de potencial indeterminado (Behrens et al., 2021).

En cuanto al análisis de correlaciones entre los datos de bandas GTG con los datos clínicos, la frecuencia de aberraciones clonales en MO mostró una correlación positiva con la edad en los pacientes AF. Este dato apoya la hipótesis de que la acumulación de daño cromosómico, en particular la presencia de aberraciones clonales es dependiente de la edad en los pacientes AF. Adicionalmente, dos de los 5 pacientes que mostraron clonalidad tuvieron cáncer. La aparición de estas aberraciones clonales, se han relacionado con la malignización en pacientes AF (Alter, 2014; Behrens et al., 2021), ambas, la aparición de este tipo de aberraciones cromosómicas y la subsecuente progresión hacia cáncer, son características propias de sujetos de edad avanzada (Brosh Jr., 2017; López-Otín et al., 2013, 2023). De hecho, como se ha mencionado este tipo de leucemia, LMA es un tipo de cáncer que se desarrolla principalmente de los 60 años en adelante (Almeida y Ramos, 2016). Y se ha propuesto que ni las mutaciones puntuales ni las indels, sino las ganancias y pérdidas cromosómicas en particular en los cromosomas 1, 3 y 7, justamente como se muestra en los datos obtenidos en este trabajo y presentados en la figura 39, son las que conducen a la malignización en pacientes AF (Behrens et al., 2021; Meyer et al., 2011, 2012).

Es de resaltar que en los pacientes que fallecieron, se encontró la presencia de aberraciones citogenéticas en los cromosomas 3 y 7, en concreto, en FANC170 (detectado por M-FISH) y RAFMex0015, se presentaron monosomías 7 y en RAFMex0026 hubo duplicación de 3q. En el paciente RAFMex0031 no hubo aberraciones clonales detectadas, pero de manera interesante, se observó una frecuencia de aberraciones por célula muy alta, de 1.35.

Es importante resaltar que en la totalidad de los pacientes se encontraron alteraciones estructurales no clonales, adicionalmente a las ya mencionadas del tipo clonal. Este hallazgo es importante ya que en general la literatura refiere las alteraciones clonales, probablemente porque la metodología de búsqueda es generalmente mediante FISH en interfase, perdiendo toda la información que genera el realizar un cariotipo completo. De manera que consideramos que esta correlación positiva entre las aberraciones cromosómicas y la edad

cronológica es un dato que merece una investigación más a fondo, ya que puede ser un parámetro que se relacione con la evolución hacia clonas cromosómicas en el camino hacia la malignización, de hecho algunos autores ya han clasificado estas aberraciones no clonales como aberraciones de potencial indeterminado (Behrens et al., 2021).

- **Determinar el tipo y cantidad de daño genómico, mediante la búsqueda de “firmas mutacionales” en MO y SP.**

Respecto a las firmas mutacionales detectadas en esta serie de pacientes, se encontraron las que podrían ser propias de la anemia de Fanconi: ID10, DBS78, SBS96A y SBS96B. La DBS78 está compuesta por las firmas DBS11 de etiología desconocida; la ID10 es también de etiología desconocida. Las firmas SBS96 A compuesta por la 5, 29 y 5, y la SBS96B compuesta por las 42, 29 y 1. De estas firmas, La SBS1 estuvo presente únicamente en los los pacientes RAFMex006 en ambos tejidos y en FANC170 únicamente en SP; la firma SBS5 estuvo presente en todos los pacientes en SP y en MO fue precisamente en RAFMex006 en el que no se identificó; las SBS1 y SBS5 están asociadas a envejecimiento, si bien la SBS1 solo se presentó en dos pacientes, RAFMex006 de 5.5 años y FANC170 de 9.9 años, llama la atención que no son los pacientes de mayor edad, puesto que esta firma se asocia a la desaminación espontánea de la 5-metil-citosina (Alexandrov et al., 2013, 2020) y debería presentarse en proporciones similares en pacientes de la misma edad puesto que se acumula a tasas constantes; en el caso de FANC170 probablemente este relacionado a la leucemia o la quimioterapia que estaba recibiendo el paciente, vale la pena poner atención a este hecho ya que podría estar indicando una forma de daño en pacientes AF que impacta en la acumulación de la firma SBS1.

La firma SBS5 por su parte se presentó en todos los pacientes a excepción de la muestra de MO de RAFMex0006, quien interesantemente, es el de mayor número de mutaciones en cuanto a cantidad y también muestra 4 de las 5 firmas que se encontraron en los pacientes AF. LA SBS5 también se asocia con envejecimiento, es parecida a reloj, junto con la SBS1, ya que el número de mutaciones encontrado en la mayoría de los tejidos cancerosos y células normales correlaciona con la edad del individuo, sin embargo, las tasas de adquisición de las mutaciones de la SBS5 difieren en los distintos tipos de cáncer y los diversos tipos de células normales. Estas discrepancias no correlacionan claramente con las tasas estimadas de división celular de células troncales en los tejidos ni con las diferencias en las tasas de mutación de la firma SBS1. La SBS5 puede estar contaminada por SBS16, la cual también tiene etiología desconocida, pero se hipotetiza que podría ser ocasionada por los bajos niveles de NER y niveles elevados de daño en el ADN, en las cadenas no transcritas de genes (Alexandrov et al., 2020). Las firmas SBS1 y SBS5 están relacionadas con envejecimiento

(Alexandrov et al., 2020) y en este caso hipotetizamos que podrían estar reflejando envejecimiento prematuro.

La firma SBS29 se encontró en todos los pacientes en MO y en SP en todos menos en FANC170; está reportada en las bases de datos de COSMIC, asociada estadísticamente con masticar tabaco, pero ninguno de los pacientes afirmó tener este hábito. El daño que se genera por masticar tabaco se debe a la presencia y liberación de nitrosaminas (Hecht et al., 2022), las cuales generan daño al ADN (Barnes et al., 2018), por lo que en nuestros pacientes, podría deberse a nitrosaminas que se encuentran en su hábitat familiar; como las presentes en embutidos, que en personas normales podrían no tener un efecto evidente, pero en los pacientes AF si; y aunque no se colectó información sobre los hábitos nutricionales, los embutidos son un alimento de consumo generalizado.

Finalmente la firma SBS42 se encontró únicamente en RAFMex0006 en ambos tejidos y en RAFMex0015 en SP; tiene la etiología de exposición a holoalcános y se ha descrito que una de las consecuencias de exponerse a holoalcános es que se forman aldehídos (Weber et al., 2003), en los pacientes AF, se ha descrito que la formación endógena de aldehídos es una de las principales fuentes de daño en el ADN, ya que constituyen ECiC, lesiones que repara la vía FA/BRCA y por lo tanto los pacientes AF, con deficiencia para reparar estas lesiones, pueden convertirse en mutaciones a nivel de la secuencia de ADN, por reparación propensa a error (Wang et al., 2023).

RAFMex0006 es el paciente que mayor variación en presentación de firmas tuvo, siendo el único que presentó la firma SBS1 junto con FANC170, fue el único que no tuvo la firma SBS5 en MO y es el único que presentó la firma SBS42 en MO y SP (RAMFex0015 también la presentó en este tejido); siendo además e más joven, lo que podría estar relacionado con alguna exposición ambiental que difiere de los demás pacientes. En el caso de FANC170 las variaciones pueden ser atribuidas a la leucemia subyacente y la quimioterapia.

Respecto a las etiologías propuestas por los descubridores de las firmas mutacionales, es importante hacer notar que dichas firmas fueron descritas en tumores y las etiologías fueron descritas con esas bases biológicas, lo que no necesariamente significa que las firmas descritas se deban a la misma etiología. Es decir, en nuestros pacientes, mayoritariamente pediátricos, el daño que genera estas firmas puede ser de origen diferente, pero genera el mismo patrón mutacional. Ya que pacientes participantes en este estudio, no refieren tener exposición a los factores etiológicos de las firmas que encontramos, se hizo una hipótesis para explicar el origen de cada firma encontrada y tomando en cuenta la alteración basal que tienen los pacientes con AF.

Sebert et al. (2023), estudiaron en MO y SP, por 7.6 años a 300 pacientes AF con un promedio de edad de 15 años, encontraron también el conjunto de las firmas SBS1 y SBS5, aunque su

grupo también reportó como una firma importante la SBS3 relacionada a defectos en la reparación del DNA y la SBS16, de etiología desconocida. Ellos no reportaron la firma SBS42 que en nuestros resultados mostró una representación importante. La firma SBS3 en su cohorte se encontró principalmente representada en los pacientes con mutaciones en *BRCA2*; respecto a la SBS29, ellos también la encontraron pero no discuten más a fondo sobre su relevancia, en nuestros datos esta firma se encuentra en casi todos los pacientes en ambos tejidos, a excepción de FANC170, quien ya estaba bajo tratamiento de quimioterapia, por lo que la consideramos una firma relevante; en términos generales, los datos obtenidos en este trabajo coinciden en parte con estos hallazgos (Sebert et al., 2023).

- **Correlacionar la cantidad y tipo de daño genómico con la edad cronológica de los pacientes con AF**

Se obtuvieron resultados que corroboran una relación entre la cantidad y el tipo de daño genómico. En el caso del daño cromosómico se observó que la edad tiene una correlación positiva con la presencia de aberraciones cromosómicas en general y en particular con las alteraciones clonales.

En el caso de las firmas mutacionales se observó una tendencia a la baja conforme aumentaba la edad, aunque no hubo significancia, posiblemente por el pequeño tamaño de muestra. También se observaron correlaciones negativas entre a) el daño cromosómico observado por bandas GTG en MO y el número de mutaciones totales en MO observadas en las firmas mutacionales y b) entre el daño cromosómico observado en SP por M-FISH y el número de mutaciones totales observados en SP por firmas mutacionales.

La literatura indica que, en personas sanas, las mutaciones incrementan conforme aumenta la edad (Alexandrov et al., 2020; Blokzijl et al., 2016; Luquette y Park, 2021), sin embargo, nosotros encontramos una correlación negativa. Esto, es contrario a las nociones expuestas en la literatura científica y a nuestra propia hipótesis, debido a esto, se debe considerar que, estamos evaluando mutaciones en exoma, es decir, solo estamos observando del 1% al 2% del genoma (Meienberg et al., 2016), y las mutaciones típicamente relacionadas con la falla en la reparación por recombinación homóloga, que es deficiente en las células de anemia de Fanconi, se presentan como alteraciones estructurales como deleciones, duplicaciones y rearrreglos estructurales, que se pueden detectar preferencialmente con la secuenciación de genoma completo, esto podría estar generando un sesgo.

Adicionalmente el progreso en la falla medular en pacientes AF, se asocia a que las células comienzan a eliminarse debido a mutaciones y alteraciones cromosómicas letales y solo aquellas con aberraciones cromosómicas gruesas que generan una selección positiva como

la ganancia de 1q, 3q, la pérdida de 7q o la monosomía 7, sobreviven pero con la posibilidad de generar clonas que progresan hacia la malignización (Behrens et al., 2021; Rodríguez et al., 2021; Sebert et al., 2023) ; es decir las mutaciones estarían subrepresentadas porque no confieren potencial proliferativo e incluso resultarían letales en la mayoría de los casos.

Otra posibilidad, es que se ha propuesto que los pacientes AF tienen un fenotipo hipomutador, es decir, un daño que debería producir mutaciones puntuales en células normales, en células AF produce rearrreglos estructurales como deleciones y podría deberse a que no alcanzan a utilizar la síntesis trans-lesión sujeta a errores en la secuencia, porque el daño en el ADN se envía a reparación por las vías NHEJ y MMEJ, que no utilizan esta estrategia, lo que podría explicar estos resultados (Guillouf et al., 1991; Papadopoulo y Moustacchi, 1990).

- **Determinar si la presencia y cantidad de las firmas genómicas de envejecimiento, correlacionan con la cantidad de daño cromosómico numérico y estructural y/o con otras firmas genómicas asociadas a falla en la reparación del ADN en médula ósea (MO) y sangre periférica (SP) de los pacientes con anemia de Fanconi.**

El grado de falla medular tuvo una correlación positiva con la frecuencia de aberraciones por célula, y correlaciones negativas con el número de mutaciones en firmas específicas y mutaciones totales en MO. Este es un hallazgo interesante e inesperado, puesto que la hipótesis planteada en este estudio era que conforme aumentaba la falla medular, el daño en el número de mutaciones incrementaría en los diferentes tejidos estudiados. Se encontró que el grado de falla medular, correlaciona con el daño observado a nivel cromosómico como ab/cel, pero ocurre lo contrario en el número de mutaciones de las firmas tanto SBS5, relacionada con envejecimiento, como con el total de mutaciones encontradas por firmas mutacionales.

La cantidad de mutaciones también mostró una correlación negativa con el daño cromosómico observado como frecuencia de aberraciones por célula y frecuencia de células aberrantes, resaltando que hay una relación inversa entre el aumento de daño cromosómico y daño mutacional. Estos datos indican que el daño del tipo aberraciones cromosómicas tiene un comportamiento como el esperado, que incrementa de acuerdo con la edad cronológica de los pacientes, pero que es opuesto al observado como mutaciones.

Finalmente, cabe resaltar que en general en 6/8 pacientes (que se estudiaron MO y SP), se observó mayor número de mutaciones en MO respecto a la SP, lo cual indica que este tejido acumula más daño. Esto podría deberse a la división continua de las células troncales que originan a todo el linaje hematopoyético, que sobreviven a costa de ir acumulando el daño.

Este resultado está de acuerdo con la observación de Rodríguez et al. (2021), que observaron que las células troncales hematopoyéticas acumulan daño debido a estrés replicativo originado por la sobreexpresión de *MYC*, lo que conduce a acumulación de daño genómico.

## Conclusiones

Los pacientes AF muestran daño cromosómico numérico y estructural en la médula ósea, que correlaciona positivamente con el incremento en la edad cronológica, mientras que las mutaciones detectadas mediante el análisis de firmas mutacionales muestran una correlación negativa con la edad, el grado de falla medular y el daño cromosómico tanto en SP como en MO.

Una posible explicación es que las células troncales hematopoyéticas sobreviven en los pacientes AF debido a que las células que acumulan daño se mueren sin dividirse y por lo tanto las que sobreviven, lo hacen a costa de acumular aberraciones cromosómicas gruesas, de manera que generan una población con enorme cantidad de daño cromosómico que posteriormente puede seleccionarse de manera clonal y progresar hacia la malignidad, ya que las ventajas que confieren estos desbalances son mayores que las que pueden conferir las mutaciones puntuales, por lo que prevalecen en el paciente. Eventualmente estas células pueden originar clonas que resultan en SMD/LMA. El daño cromosómico que se genera es debido a la acumulación de daño al ADN que no es reparado de manera eficiente en los pacientes AF, lo que involucra ruptura y reunión, es decir el origen de las aberraciones cromosómicas gruesas son las rupturas de doble cadena.

Se demostró que todos los pacientes AF menos uno, presentan la firma mutacional asociada a envejecimiento SBS5, lo cual ha sido recientemente comprobado por otros autores (Sebert et al., 2023) pero solo un paciente presentó la firma mutacional SBS1 asociada a envejecimiento, lo cual no era esperado, ya que esta firma está relacionada con la desaminación espontánea de la citosina; este hallazgo requiere mayor estudio para poder llegar a una explicación de los resultados obtenidos en el presente estudio. Las firmas SBS29 y SBS42 que se encontraron en los pacientes, podrían estar asociada al consumo de alimentos con nitrosaminas y el daño por aldehídos endógenos, respectivamente.

De manera general, se encontró en todos los pacientes una combinación de firmas SBS5, SBS29 y SBS42, que fue considerada como una firma AF. Estos resultados son congruentes con el patrón de firmas recientemente encontrado por Sebert et al. (2023), que podrían irse configurando como una firma específica de la AF. Estos hallazgos por supuesto esperan los estudios de un mayor número de pacientes AF para confirmarlo.

En conclusión, estos datos abonan a la hipótesis de que en los pacientes con AF, se presentan datos genéticos de envejecimiento prematuro, conducido por los desbalances

cromosómicos y no por las mutaciones puntuales relacionadas con las firmas SBS5, SBS29 y SBS42.

### Limitaciones de este estudio.

El tamaño de muestra es pequeño, por lo que, aunque las firmas mutacionales que se encontraron coinciden con las recientemente publicadas, se requiere estudiar más pacientes AF para poder confirmarlas como firmas específicas de pacientes AF.

No se completaron todos los ensayos en todos los pacientes, en particular de M-FISH, por lo que es importante complementar la información para tratar de obtener mayor poder estadístico.

Aunque el daño cromosómico que se encontró en MO es posible considerarlo como excesivo y altamente improbable que se presente en células normales, estos resultados deben ser comparados con datos obtenidos de muestras pareadas por edad de sujetos sanos, para poder determinar que hay mayor acumulación de daño a mayor edad cronológica.

### Perspectivas

Para completar este estudio es necesario que se sigan captando pacientes con el fin de aumentar la N, asimismo, hacer seguimiento de cada caso a través del tiempo en los múltiples controles que se deben realizar a los pacientes AF. Esto permitirá poder comprender mejor el comportamiento de la MO desde que los pacientes no tienen falla medular hasta que se desarrolla LMA o SMD.

El aumento en la N también permitirá corroborar las firmas mutacionales que se obtuvieron y posiblemente identificar algún tipo de firma relacionado con exposiciones o mecanismos moleculares de relevancia en pacientes AF.

Corroborar con mayor poder estadístico los marcadores de envejecimiento prematuro en pacientes AF.



## Referencias bibliográficas

- Alexandrov, L. B., Kim, J., Haradhvala, N. J., Huang, M. N., Tian Ng, A. W., Wu, Y., Boot, A., Covington, K. R., Gordenin, D. A., Bergstrom, E. N., Islam, S. M. A., Lopez-Bigas, N., Klimczak, L. J., McPherson, J. R., Morganella, S., Sabarinathan, R., Wheeler, D. A., Mustonen, V., Boutros, P., ... Yu, W. (2020). The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*, 578(7793), 94–101. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1943-3>
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A. L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J. E., Foekens, J. A., ... Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415–421. <https://doi.org/10.1038/nature12477>
- Almeida, A. M., y Ramos, F. (2016). Acute myeloid leukemia in the older adults. *Leukemia Research Reports*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2016.06.001>
- Alter, B. P. (2014). Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 27(3–4), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2014.10.002>
- Alter, B. P., Caruso, J. P., Drachtman, R. A., Uchida, T., Velagaleti, G. V. N., y Elghetany, M. T. (2000). Fanconi anemia: Myelodysplasia as a predictor of outcome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 117(2), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(99\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(99)00159-4)
- Arsham, M. S., Barch, M. J., y Lawce, H. J. (2017). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (M. J. and L. H. J. Arsham, M.S., Barch, Ed.; 4th ed., Vol. 148). John Wiley y Sons.
- Auerbach, A. D. (2015). Diagnosis of Fanconi Anemia by diepoxybutane analysis. *Current Protocols in Human Genetics*, 2015(212), 8.7.1-8.7.17. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0807s85>
- Barnes, J. C., y Smith, W. L. (1978). The VATER association. *Pediatric Radiology*, 126(2), 445–449. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(73\)80024-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(73)80024-1)
- Barnes, J., Zubair, M., John, K., Poirier, M., y Martin, F. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1213–1224. <https://doi.org/10.1042/BST20180519>
- Behrens, Y. L., Göhring, G., Bawadi, R., Cöktü, S., Reimer, C., Hoffmann, B., Sängler, B., Käfer, S., Thol, F., Erlacher, M., Niemeyer, C. M., Baumann, I., Kalb, R., Schindler, D., y Kratz, C. P. (2021). A novel classification of hematologic conditions in patients with Fanconi anemia. *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279332>

- Birdwell, C., Fiskus, W., Kadia, T. M., DiNardo, C. D., Mill, C. P., y Bhalla, K. N. (2021). EVI1 dysregulation: impact on biology and therapy of myeloid malignancies. *Blood Cancer Journal*, 11(3). <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00457-9>
- Bluteau, D., Masliah-Planchon, J., Clairmont, C., Rousseau, A., Ceccaldi, R., D'Enghien, C. D., Bluteau, O., Cucchini, W., Gachet, S., De Latour, R. P., Leblanc, T., Socié, G., Baruchel, A., Stoppa-Lyonnet, D., D'Andrea, A. D., y Soulier, J. (2016). Biallelic inactivation of REV7 is associated with Fanconi anemia. *Journal of Clinical Investigation*, 126(9), 3580–3584. <https://doi.org/10.1172/JCI88010>
- Brosh Jr., RM. (2017). Fanconi Anemia: a DNA Repair Disorder Characterized by Accelerated Decline of the Hematopoietic Stem Cell Compartment and Other Features of Aging. *Ageing research reviews*, 33, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.05.005>
- Che, R., Zhang, J., Han, B., y Fei, P. (2017). Multifaceted Fanconi Anemia Signaling. *Trends in Genetics*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.006>
- Cioc, A., Wagner, J. E., Macmillan, M. L., Todd DeFor, M., y Hirsch, B. (2017). Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome Among a Cohort of 119 Patients With Fanconi Anemia: Morphologic and Cytogenetic Characteristics. *American Journal of Clinical Pathology*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1309/AJCP7W9VMJENZOVG>
- Dong, H., Nebert, D. W., Bruford, E. A., Thompson, D. C., Joenje, H., y Vasiliou, V. (2015). Update of the human and mouse fanconi anemia genes. *Human Genomics*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0054-y>
- Fanconi, G. (1927). Familiare infantile perniziosaartige Anämie (pernizioses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung*, 117(April), 257–280.
- Fiesco-Roa, M., Gómez-Moreno, P., Espinosa-Curiel, R., Rodríguez, A., y Frías, S. (2022). Dymorphology as a Clinical Tool for an Early Diagnosis of Fanconi Anemia. *Acta Pediatrica de Mexico*, 43(2), 129–140. <https://doi.org/10.18233/APM43No2pp129-1402402>
- Fiesco-Roa, M. O. (2019). *Implementación de la metodología para el desarrollo del registro mexicano de anemia de Fanconi*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C. M., Herbig, U., Longhese, M. P., y Di Fagagna, F. D. A. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology*, 14(4), 355–365. <https://doi.org/10.1038/ncb2466>
- Garaycochea, J. I., y Patel, K. J. (2014). Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia? *Blood*, 123(1), 26–34. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-427740>

- García-De-Teresa, B., Rodríguez, A., y Frias, S. (2020). Chromosome instability in fanconi anemia: From breaks to phenotypic consequences. *Genes*, 11(12), 1–35. <https://doi.org/10.3390/genes11121528>
- Giampietro, P. F., Adler-Brecher, B., Verlander, P. C., Pavlakis, S. G., Davis, J. G., y Auerbach, A. D. (1993). The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: A report from the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*, 91(6), 1116–1120.
- Groot, D. De, Spanjaard, A., Hogenbirk, M. A., y Jacobs, H. (2023). *Chromosomal Rearrangements and Chromothripsis : The Alternative End Generation Model*.
- Guillouf, C., Moustacchi, E., y Papadopoulo, D. (1991). *H P R T Gene Expression Differs in Mutants Derived from Normal and Fanconi Anemia Cells : Analysis of Spontaneous and Psoralen-Photoinduced Mutants*. 17(6), 591–599.
- Hecht, S. S., Gupta, P. C., Sturla, S. J., y Wang, Y. (2022). 50 Years of Research on Tobacco-Specific Nitrosamines: A Virtual Collection of Emerging Knowledge of Chemical Toxicology of Tobacco and Nicotine Delivery Systems and Call for Contributions to a Landmark Special Issue. *Chemical Research in Toxicology*, 35(6), 899–900. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00144>
- Inano, S., Sato, K., Katsuki, Y., Kobayashi, W., Tanaka, H., Nakajima, K., Nakada, S., Miyoshi, H., Knies, K., Takaori-Kondo, A., Schindler, D., Ishiai, M., Kurumizaka, H., y Takata, M. (2017). RFD3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. *Molecular Cell*, 66(5), 622-634.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.022>
- Juárez-Figueroa, U., Ayala-Zambrano, C., Reyes, P., y Frías, S. (2018). Origen y consecuencias de la inestabilidad genómica Síndromes de inestabilidad cromosómica. *Mensaje Bioquímico*, 42, 64–80.
- Kim, Y.-A., Leiserson, M. D. M., Moorjani, P., Sharan, R., Wojtowicz, D., y Przytycka, T. M. (2021). Mutational Signatures: From Methods to Mechanisms. *Annual Review of Biomedical Data Science*, 4(1), 189–206. <https://doi.org/10.1146/annurev-biodatasci-122320-120920>
- Landelouci, K., y Sinha, S. (2022). Type-I Interferon Signaling in Fanconi Anemia. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.820273>
- Lepage, C. C., Morden, C. R., Palmer, M. C. L., Nachtigal, M. W., y McManus, K. J. (2019). Detecting chromosome instability in cancer: Approaches to resolve cell-to-cell heterogeneity. *Cancers*, 11(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers11020226>
- Lindquist, R., Forsblom, A., y Gahrton, Å. O. y G. G. (2000). Mutagen exposures and chromosome 3 aberrations in acute myelocytic leukemia. *Leukemia*, 46(March 1999), 112–118.

- Liu, W., Palovcak, A., Li, F., Zafar, A., Yuan, F., y Zhang, Y. (2020). Fanconi anemia pathway as a prospective target for cancer intervention. *Cell y Bioscience*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00401-7>
- Lobitz, S., y Velleuer, E. (2006). Guido Fanconi (1892-1979): A jack of all trades. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 893–898. <https://doi.org/10.1038/nrc2009>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., y Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M., y Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- Martínez T., E. E. (2023). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Universidad Nacional Autonoma de México.
- Mehta, P. A., Harris, R. E., Davies, S. M., Kim, M. O., Mueller, R., Lampkin, B., Mo, J., Myers, K., y Smolarek, T. A. (2010). Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome-acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 203(2), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.Cancergencyto.2010.07.127>
- Meienberg, J., Bruggmann, R., Oexle, K., y Matyas, G. (2016). Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Human Genetics*, 135(3), 359–362. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1631-9>
- Meyer, S., Bristow, C., Wappett, M., Pepper, S., Whetton, A. D., Hanenberg, H. y Tönnies, H. (2003). Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: Gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood*, 101(10), 3872–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3243>
- Meyer, S., Bristow, C., Wappett, M., Pepper, S., Whetton, AD., H., Hanenberg., Neitzel, H., Wlodarski, MW., Ebell, W., y Tönnies, H. (2011). Fanconi anemia (FA)–associated 3q gains in leukemic transformation consistently target EVI1, but do not affect low TERC expression in FA. *Blood*, 22(13), 6047–6050.
- Meyer, S., Neitzel, H., y Tönnies, H. (2012). Chromosomal aberrations associated with clonal evolution and leukemic transformation in fanconi anemia: Clinical and biological implications. *Anemia*. <https://doi.org/10.1155/2012/349837>
- Mikhail, F. M., Heerema, N. A., Rao, K. W., Burnside, R. D., Cherry, A. M., y Cooley, L. D. (2016). Section E6.1-6.4 of the ACMG technical standards and guidelines: Chromosome studies of neoplastic blood and bone marrow-acquired chromosomal abnormalities. *Genetics in Medicine*, 18(6), 635–642. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.50>

- Molina, B., Frías, S., y Ramos, S. (2022). Anemia de Fanconi, Parte 1. Diagnóstico citogenético. *Acta Pediátrica de México*, 43(2), 102. <https://doi.org/10.18233/apm43no2pp102-1282393>
- Moore, J., y Haber, J. (1996). Cell Cycle and Genetic Requirements of Two Pathways of Nonhomologous End-Joining Repair of Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(5), 2164–2173. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.5.2164>
- Mori, M., Kubota, Y., Durmaz, A., Gurnari, C., Goodings, C., Adema, V., Ponvilawan, B., Bahaj, W. S., Kewan, T., LaFramboise, T., Meggendorfer, M., Haferlach, C., Barnard, J., Wlodarski, M., Visconte, V., Haferlach, T., y Maciejewski, J. P. (2023). Genomics of deletion 7 and 7q in myeloid neoplasm: from pathogenic culprits to potential synthetic lethal therapeutic targets. *Leukemia, March*. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-02003-x>
- Muniandy, P. A., Liu, J., Majumdar, A., Liu, S. T., y Seidman, M. M. (2010). DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: Step by step. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45(1). <https://doi.org/10.3109/10409230903501819>
- Nalepa, G., y Wade, C. (2014). Fanconi anemia and the cell cycle: New perspectives on aneuploidy. *F1000Prime Reports*, 6(April), 3–5. <https://doi.org/10.12703/P6-23>
- Nicoletti, E., Rao, G., Bueren, J. A., Río, P., Navarro, S., Surrallés, J., Choi, G., y Schwartz, J. D. (2020). *Mosaicism in Fanconi anemia : concise review and evaluation of published cases with focus on clinical course of blood count normalization*. 913–924.
- Niraj, J., Färkkilä, A., y D’Andrea, A. (2019). The fanconi anemia pathway in cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 3(1), 457–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030617-050422>
- Pannunzio, N., Watanabe, G., y Lieber, M. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10512–10523. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>
- Papadopoulo D, Guillouf C, Mohrenweiser H, Moustacchi E. (1990). *Hypomutability in Fanconi anemia cells is associated with increased deletion frequency at the HPRT locus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Nov;87(21):8383-7. doi: 10.1073/pnas.87.21.8383.
- Phillips, D. H. (2018). Mutational spectra and mutational signatures: Insights into cancer aetiology and mechanisms of DNA damage and repair. *DNA Repair*, 71(August), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.003>
- Polak, P., Kim, J., Braunstein, L. Z., Karlic, R., Haradhavala, N. J., Tiao, G., Rosebrock, D., Livitz, D., Kübler, K., Mouw, K. W., Kamburov, A., Maruvka, Y. E., Leshchiner, I., Lander, E. S., Golub, T. R., Zick, A., Orthwein, A., Lawrence, M. S., Batra, R. N., ... Getz, G. (2017). A

- mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nature Genetics*, 49(10), 1476–1486. <https://doi.org/10.1038/ng.3934>
- Quan, L., y Smith, D. W. (1973). The VATER association. -Vertebral defects, -Anal atresia, -T-Efistula with esophageal atresia, -Radial and -Renal dysplasia: A spectrum of associated defects. *The Journal of Pediatrics*, 82(1), 104–107. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(73\)80024-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(73)80024-1)
- Rochowski, A., Olson, S. B., Alonzo, T. A., Gerbing, R. B., Lange, B. J., y Alter, B. P. (2012). Patients with Fanconi anemia and AML have different cytogenetic clones than de novo cases of AML. *Pediatric Blood and Cancer*, 59(5), 922–924. <https://doi.org/10.1002/pbc.24168>
- Rodríguez, A., y D’Andrea, A. (2017). Fanconi anemia pathway. *Current Biology*, 27(18), R986–R988. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.043>
- Rodríguez, A., Naveja, J. J., Torres, L., Teresa, B. G. De, y Frías, S. (2019). WIP1 Contributes to the Adaptation of Fanconi Anemia Cells to DNA Damage as Determined by the Regulatory Network of the Fanconi Anemia and Checkpoint Recovery Pathways. *Frontiers in Genetics*, 10(May). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00411>
- Rodríguez, A., Zhang, K., Färkkilä, A., Filiatrault, J., Yang, C., Velázquez, M., Furutani, E., Goldman, D. C., García de Teresa, B., Garza-Mayén, G., McQueen, K., Sambel, L. A., Molina, B., Torres, L., González, M., Vadillo, E., Pelayo, R., Fleming, W. H., Grompe, M., ... D’Andrea, A. D. (2021). MYC Promotes Bone Marrow Stem Cell Dysfunction in Fanconi Anemia. *Cell Stem Cell*, 28(1), 33-47. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.004>
- Rogers, C. B., Kram, R. E., Lin, K., Myers, C. L., Sobock, A., Hendrickson, E. A., y Bielinsky, A. K. (2023). Fanconi anemia-associated chromosomal radial formation is dependent on POLθ-mediated alternative end joining. *Cell Reports*, 42(5), 112428. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112428>
- Rosenberg, P. S., Tamary, H., y Alter, B. P. (2011). How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(8), 1877–1883. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34087>
- Sasaki, M. S., y Tonomura, A. (1973). A High Susceptibility of Fanconi’s Anemia to Chromosome Breakage by DNA Cross-linking Agents. *Cancer Research*, 33(8), 1829–1836.
- Schroeder, T., Anschütz, F., y Knopp, A. (1964). Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. *Humangenetik*, 1(2), 194–196. <https://doi.org/10.1007/BF00389636>

- Schuler, D., Kiss, A., y Fábíán, F. (1969). Chromosomal peculiarities and “*in vitro*” examinations in Fanconi’s anaemia. *Human Genetics*, 7(4), 314–322. <https://doi.org/10.1007/BF00283553>
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., y Willis, N. (2019). DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Cell Biology*, 20(11), 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Sebert, M., Gachet, S., Leblanc, T., Rousseau, A., Bluteau, O., Kim, R., Ben Abdelali, R., Sicre de Fontbrune, F., Maillard, L., Fedronie, C., Murigneux, V., Bellenger, L., Naouar, N., Quentin, S., Hernandez, L., Vasquez, N., Da Costa, M., Prata, P. H., Larcher, L., ... Soulier, J. (2023). Clonal hematopoiesis driven by chromosome 1q/MDM4 trisomy defines a canonical route toward leukemia in Fanconi anemia. *Cell stem cell*, 30(2), 153–170. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.01.006>
- Shaw, A. C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A., y Lord, J. M. (2010). Aging of the innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 22(4), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.05.003>
- Siri, S. O., Martino, J., y Gottifredi, V. (2021). Structural Chromosome Instability: Types, Origins, Consequences, and Therapeutic Opportunities. *Cancers*, 13(3056), 22.
- Sroka, I., Frohnmayer, L., Van Ravenhorst, S., y Wirkkula, L. (Eds.). (2020). *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines* (5th Ed). Fanconi Anemia Research Foundation.
- Vundinti, B. R., Korgaonkar, S., y Ghosh, K. (2010). Incidence of malignancy and clonal chromosomal abnormalities in Fanconi anemia. *Indian Journal of Cancer*, 47(4), 397–399. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.73575>
- Wang, A. T., & Smogorzewska, A. (2015). SnapShot: Fanconi anemia and associated proteins. *Cell*, 160(1), 354–354. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.031>
- Wang, M., Brandt, L., Wang, X., Russell, H., Mitchell, E., Kamimae-Lanning, A., Brown, J., Dingler, F., Garaycochea, J., Isobe, T., Kinston, S., Gu, M., Vassiliou, G., Wilson, N., Göttgens, B., y Patel, K. (2023). Genotoxic aldehyde stress prematurely ages hematopoietic stem cells in a p53-driven manner. *Molecular Cell*, 83(14), 2417–2433.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.05.035>
- Weber, L. W. D., Boll, M., y Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2), 105–136. <https://doi.org/10.1080/713611034>

## Anexos

### I.-Tabla 29. Resumen de todos los datos

Los colores denotan el grado de falla medular de los pacientes de la siguiente manera; verde FM leve, amarillo FM moderada, rosado FM grave y naranja SMD o LMA. (SD= Sin dato).

ID paciente	Edad	Sexo	Grado de falla medular (1=SF, 2=Leve,3=moderada,4=grave,5=SM D/LMA)	Frecuencia de células aberrantes	Frecuencia de aberraciones clonales bandas GTG	Frecuencia de aberraciones por célula bandas GTG	Frecuencia de aberraciones clonales M-FISH	Frecuencia de aberración por célula M-FISH	Firmas mutacionales	Número de mutaciones DBS 78 SP	Número de mutaciones DBS 78 MO	Número de mutaciones ID83 SP	Número de mutaciones ID 83 MO	Número de mutaciones SBS9 6A SP	Número de mutaciones SBS9 6A MO	Número de mutaciones SBS9 6B SP	Número de mutaciones SBS9 6B MO	Mutaciones totales SP	Mutaciones totales MO
RAF Mex0029	5.5	M	2	0.55	0	0.9	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
RAF Mex0006	5.5	M	2	0.4	0	0.6	0	0.392	SP:ID83A/DBS78A/SBS 1, 5, 29, 42 y 46. MO igual, pero sin SBS5	114	149	169	245	0	390	315	423	343	501



RAF Mex0009	6.3	F	3	0.255	0	0.3488	0	SD	MO y SP:ID83A/ DBS78A/S BS 5, 29 y 46	48	42	23	33	1813	2191	502	575	2386	2841
RAF Mex0010	6.7	F	3	0.7	0	1.1	0	SD	SP:ID83A/ DBS78A/S BS 5, 29 y 46	51	48	44	42	1432	1823	612	748	2139	2661
RAF Mex0005	7.2	F	2	0.35	0	0.9	0	0.538	MO:ID83 A/DBS78 A/SBS 5 29 y 46	35	46	26	27	2139	2080	579	398	2779	2551
RAF Mex0026	12	F	4	0.75	0.3	1.25	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
RAF Mex0002	8.3	F	1	0.35	0.2	0.35	SD	SD	SD	43	44	22	32	1351	2130	638	518	2054	2724
RAF Mex0011	8.9	F	3	0.55	0	0.65	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	0	0
FANC 170	9	F	5	0.42	0	1.0384	Positivo	1.714	SP:ID83A/ DBS78A/S BS 1,5 y 46	81	SD	44	SD	567	SD	378	SD	1070	0
RAF Mex0007	9.7	F	4	0.45	0	0.95	0	0.885	MO y SP:ID83A/ DBS78A/S	41	64	33	34	1575	1583	465	485	2114	2166

									BS 5, 29 y 46										
RAF Mex0 008	1 1. 7	M	2	0.55	0	0.65	0	0.891 3	MO y SP:ID83A/ DBS78A/S BS 5, 29 y 46	43	57	37	24	181 2	263 4	682	100 3	257 4	371 8
RAF Mex0 018	1 3. 3	F	3	0.15	0	0.15	SD	SD	SD	38	39	28	32	217 0	191 7	612	459	284 8	244 7
RAF Mex0 031	1 3. 8	M	5	0.55	0	1.4	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
RAF Mex0 015	1 7. 3	M	5	1	1	3.75	SD	SD	SP:ID83A/ DBS78A/S BS 5,29,42 y 46	31	SD	25	SD	337	SD	464	SD	857	0
RAF Mex0 027	2 2	M	1	0.55	0.25	0.7	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD

## II.- Cartas de consentimiento y asentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

### Documento De Consentimiento Informado Para Padres o Tutores De Menores Participantes

Nombre Del Investigador Principal. **Sara Frias Vázquez**

Nombre De La Propuesta y Versión Del Documento "**Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi**". V4.

#### PARTE I Información

##### Introducción

Este proyecto está bajo la responsabilidad de la Dra. Sara Frias, quien es Investigadora del Instituto Nacional de Pediatría (INP), y se dedica al estudio de los cromosomas y el genoma de los pacientes con anemia de Fanconi (AF).

En este proyecto se pretende ver si los pacientes con AF envejecen a la misma velocidad que las personas sanas, lo cual puede saberse cuando se estudian algunas marcas en sus cromosomas y en su DNA, que representa su genoma. Creemos que debido a la enfermedad, los pacientes pueden acumular daño en sus cromosomas y que esto puede dar lugar a un envejecimiento prematuro. Es posible también que en diversas partes del cuerpo se acumule diferente cantidad de daño y entonces puede envejecer a diferentes velocidades sus tejidos.

Este estudio se realizará en el INP con la ayuda del Instituto Nacional de Medicina Genómica y nos ayudarán a analizar los datos nuestros colegas de la Universidad de Harvard.

##### Propósito

Con su ayuda, nos proponemos obtener información útil para explicar porqué los pacientes con AF jóvenes, tienen características como la falla medular o leucemia que aparecen preferentemente en individuos de mucho mayor edad.

##### Tipo de Intervención de la Investigación

Para estudiar esto, invitamos a su hijo(a), a participar en este proyecto para lo cual le pedimos que cuando le toque su estudio anual de médula ósea o cuando por alguna otra razón se obtenga médula ósea de su hijo, nos pueda donar una parte de esa muestra, así como saliva y una muestra de sangre periférica, la cantidad que requerimos de cada tipo de muestra es equivalente a la cantidad de líquido de una cuchara sopera (5-10 mililitros). La muestra de médula ósea será remanente de la muestra que rutinariamente se le toma en hematología y la sangre se tomará

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 1



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

por personas con mucha experiencia y realizando limpieza en el brazo con alcohol/isodine, se utilizarán jeringas nuevas y estériles. La saliva se obtendrá raspando levemente en la parte interna de los cachetes con un cepillo suave y haciendo que el paciente escupa en un recipiente nuevo y limpio. En estas muestras estudiaremos los cromosomas y el DNA para ver si han acumulado daño y si han envejecido sus células a velocidad diferente que los individuos sanos. Nuestro propósito es reunir las muestras de por lo menos 12 pacientes con AF.

##### Selección De Participantes

Necesitamos la participación de pacientes AF de diversas edades, que tengan el estudio de fragilidad cromosómica para asegurar que si son AF. También se les harán algunas preguntas pues será necesario que no estén trasplantados o trasfundidos recientemente, porque en estos casos, podríamos estudiar las células del donador y no las del paciente. Los pacientes que no podrían participar en este estudio son aquellos que fumen, o los que tengan un cáncer declarado y los que estén tomando medicamentos para eso, ya que tanto el cáncer como los medicamentos afectan a las células en estudio.

##### Participación Voluntaria

Se le informa también que su decisión de participar o no en este proyecto es completamente libre y que si deciden no participar, esto no tendrá repercusiones en su atención médica rutinaria dentro del INP, ya que su participación es voluntaria.

##### Procedimientos y Protocolo

Las muestras de DNA que no se utilicen, se desecharán cuando finalice el estudio. el día de su cita programada a la Consulta del Servicio Hematología para su toma de muestra rutinaria de médula ósea, se obtendrán también las muestras de sangre y saliva. Se realizará con todos los requisitos de seguridad, material nuevo y guantes y será practicado por personal con amplia experiencia en la toma de la muestra.

Al realizar la extracción de ácidos nucleicos de las células cultivadas a partir de la muestra donada:

a) La muestra será guardada en refrigeración o congelación; solo tendremos acceso los investigadores involucrados directamente al proyecto y se almacenarán identificándolas con un código y no con nombres.

b) Las muestras serán procesadas y guardadas en el Laboratorio de Citogenética del INP para realizar comprobaciones, réplicas o estudios genéticos complementarios para este mismo trabajo. Las muestras sobrantes no utilizadas en este estudio, se eliminarán en cuanto se termine el proyecto.

Cuando se done la muestra para el estudio, puede haber dolor leve o molestia al pinchar el brazo con la aguja, o durante la aplicación de anestesia para la extracción de médula. Pueden presentarse complicaciones mínimas como la

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 2



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

formación de un "moretón" en el sitio de extracción, aunque el riesgo es muy bajo por contar con muy buenas condiciones de limpieza y personal capacitado.

### Beneficios

Con las muestras de médula ósea y sangre, aparte de los estudios hematológicos que se hacen rutinariamente para el seguimiento del paciente, se realizará un análisis cromosómico, que aunque no tendrá un beneficio directo para su hijo(a), si podrá generar conocimiento sobre la enfermedad.

Con las muestras de saliva (al igual que con las otras muestras) se hará el estudio en el DNA, de aquí no se puede obtener información que sirva directamente para ver si hay algún daño cromosómico, pero nos servirá para obtener información sobre el daño que ha acumulado su hijo(a) en el DNA, lo cual puede ser muy útil para comprender porqué se presentan las características de personas adultas mayores en jóvenes con AF.

### Incentivos

La inclusión al estudio no implica compensaciones económicas ni de otra índole, por lo que su aceptación de participación es completamente voluntaria y sin remuneraciones, siendo el único beneficio de su participación, el que con la información que se obtenga de este proyecto, se puede ayudar a comprender mejor la enfermedad llamada Anemia de Fanconi lo que podría ayudar en un futuro a pacientes con la misma enfermedad y a sus familiares, a tener una mejor calidad de vida.

### Confidencialidad

Los datos personales se manejarán codificados, por lo que los nombres correspondientes a las muestras sólo los conocerán los investigadores o el personal de salud que el investigador considere necesario para la atención del participante. Los datos serán guardados codificados y en confidencialidad y la publicación que se genere no incluirá el nombre de los participantes.

### Las muestras de DNA:

1. Se almacenarán hasta la obtención de resultados de todo el proyecto, calculamos 5 años.
2. Se utilizará para el estudio en proceso solamente.
3. La información generada a partir de dichas muestras no será compartida con otros investigadores o patrocinadores.
4. Las muestras se identificarán por medio de código. La descodificación se realizará al momento del análisis de resultados. Solo los participantes en este estudio podrán recibir la información de los estudios de DNA.
5. Usted puede decidir retirar la muestra de su hijo(a) en cualquier momento que lo desee.
6. Los resultados del análisis de DNA se mantendrán confidenciales y si usted no desea conocer los resultados se respetará su decisión.

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 3



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

7. En caso de utilizar material genético para obtener nueva información, se le solicitará firmar una nueva carta de consentimiento informado en los términos que dicha investigación requiera.

### Entrega y divulgación de resultados

Los resultados de las muestras de los pacientes, los conoceremos nosotros que los obtenemos y si usted quiere conocer los resultados, nos lo puede indicar y se los podemos decir y explicar de que se tratan y que pueden significar, en que pueden ayudar o si solo son para conocimiento de la enfermedad.

Los hallazgos de esta investigación serán difundidos más ampliamente, en congresos y publicaciones, cuidando siempre de no mencionar los nombres de los pacientes.

### Derecho a negarse y/o retirarse

Usted es libre de negarse a participar en este proyecto desde un inicio o bien retirarse en el momento que lo desee, manteniendo los derechos que actualmente tiene como paciente del Instituto y de la atención de sus médicos. De la misma manera, el investigador puede retirar al participante del estudio en caso de que no proporcione las muestras requeridas o la información solicitada.

### A quién contactar

Si tiene alguna duda acerca del estudio o sobre la decisión de participar, usted puede contactar a la Dra. Sara Frías, Responsable del proyecto en el Laboratorio de Citogenética del INP al teléfono: 10840900 extensión 1326 y/o Dra. Leda Torres M. Investigador en Ciencias Medicas. Investigador del proyecto, a la extensión 1326 o 1436 en días y horas hábiles o al celular 5529701014 o 045-777-5137406. En caso de que tenga dudas sobre su participación en este estudio, puede comunicarse con el Dr. Alberto Olaya Vargas, Presidente del Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría, al teléfono 55 67 31 02 25 extensión 1581.

### PARTE 2 Formulario de Consentimiento

*He leído la información proporcionada (o me ha sido leída). He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente a que mi hijo(a) participe en esta investigación como paciente y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que afecte en ninguna manera mi cuidado médico.*

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

Firma del participante: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 4



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

[Si es analfabeto nombre y firma del testigo que sabe leer y escribir (si es posible esta persona debe ser seleccionada por el participante y no tener conexión con el equipo de investigación).

Los participantes analfabetos deben incluir su huella dactilar también.]

Nombre del padre: \_\_\_\_\_  
Firma del padre: \_\_\_\_\_  
Nombre de la madre: \_\_\_\_\_  
Firma de la madre: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo 1: \_\_\_\_\_  
Firma del testigo: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Relación con el participante: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo 2: \_\_\_\_\_  
Firma del testigo: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Relación con el participante: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del investigador o quien recoge el consentimiento informado: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de consentimiento informado \_\_\_\_\_ (iniciales del investigador)



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

### “CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES PEDIÁTRICOS MENORES DE 12 AÑOS”

Título del proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi

Investigador Principal: Sara Frias Vázquez



Tu participación no te costará nada ni a ti ni a tus papás. El Dr(a) encargado(a) de este estudio se hará cargo de todos los gastos. La Dra. se llama Sara Frias Vázquez





## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA



Para que decidas si participas o no, te queremos explicar, quienes pueden participar, todo lo que queremos hacer y en qué cosas tú puedes ayudarnos si decides participar.



Hemos decidido invitarte a ti y a otros once niños mas, que sepamos que son pacientes con anemia de Fanconi y que no tengan otra enfermedad grave como cáncer, ni que hayan recibido transfusiones o trasplante de células porque entonces estudiaríamos las células de los que se las donaron.

Si decides participar lo que queremos que hagas es:

### Describir:



1. Que en la próxima visita que tengas para tu estudio de médula ósea,
2. Los doctores que obtengan tu médula nos den un poco de ella,
3. También te pediremos que nos des saliva, después de pasarte un cepillito por dentro de tus cachetes y que nos permitas tomar una muestra de sangre de tu brazo.



4. La toma de muestra de saliva no duele, pero la de sangre, es posible que si sientas algun dolor, que será pasajero y algunas veces se puede poner morado, pero prometemos cuidarte durante la obtención de muestras y hacer todo lo posible para que no tengas ningún problema.
- 5.- Procuraremos que la toma de estas muestras sea una sola vez y no se tenga que repetir.



\* Es muy probable que participar te ayude con tu enfermedad porque algunas veces, cuando hacemos las pruebas de laboratorio en tu médula ósea o en tu sangre, podemos ver si se puede estar desarrollando una enfermedad mas grave en ti y en ese caso, tu médico puede realizar algunos procedimientos para que la enfermedad no avance.  
\* Pero si no vemos nada en tus células, el que tú participes puede que ayude a otros pacientes con anemia de Fanconi, en el futuro.

Tú puedes escoger con toda libertad si quieres participar o si no quieres. Si tienes dudas y no te puedes decidir puedes preguntarles a tus papás o a la persona que tú quieras para que te ayuden a decidir y si tienes cualquier duda o si alguna cosa no entiendes se la puedes preguntar la Dra. Sara Frías Vázquez, quien es la Investigadora responsable de la investigación, para que te explique hasta que tú entiendas.

Si decides participar y durante el estudio tienes alguna duda también puedes preguntarles.

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 7



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

Es importante que sepas que si en cualquier momento ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema, nadie se enojará contigo y te podrán seguir atendiendo.



La información que se obtenga en el estudio es confidencial. Los datos que obtengamos de tu sangre, médula ósea y saliva, nos va a dar información ti, pero nunca diremos tu nombre cuando los vayamos a analizar o a presentar por lo que no le diremos a nadie tus resultados, solo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio. Y tú puedes decidir en cualquier momento que ya no utilicen tu sangre, médula o saliva para este estudio o para otros. Lo que tienes que hacer es decirselo a Dra Sara Frías Vázquez, encargada de este estudio.

El estudio se realiza tomando en cuenta y respetando los Derechos de los Niños y el derecho a la salud de la niñez.

Si aceptas participar por favor marca con una X en el cuadrado de abajo que dice "Si quiero participar" y escribe tu nombre.

Si no quieres participar, por favor marca con una X en el cuadrado de abajo que dice "No quiero participar" y escribe tu nombre.

- Sí quiero participar
- No quiero participar

Nombre y apellidos: ..... Fecha:.....

Nombre, apellidos y firma del testigo 1:

.....

Dirección: .....Fecha:.....

Nombre, apellidos y firma del testigo 2:

.....

Dirección: .....Fecha:.....

Nombre, apellidos y firma de la persona que obtiene el asentimiento:

..... Fecha:.....

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 8



**Documento De Asentimiento Informado Para Niños(as) de 12-18 años**

Nombre Del Investigador Principal **Sara Frias Vázquez.**

Nombre De La Propuesta y Versión Del Documento **Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4.**

Nombre Del niño que toma el Asentimiento. \_\_\_\_\_.

Este proyecto está bajo la responsabilidad de la Dra. Sara Frias, quien es Investigadora del Instituto Nacional de Pediatría (INP), y se dedica al estudio de de unas pequeñas estructuras que están dentro de las células llamadas cromosomas y en especial los estudia en los pacientes con anemia de Fanconi (AF).

En pacientes que como tú padecen de la AF, se ha visto que aunque sean muy jóvenes, tienen enfermedades que en otras personas se presentan cuando ya son adultos mayores, como la anemia muy grave o como el cáncer. Nosotros estudiamos los cromosomas (compuestos por un material que se llama DNA), porque se ha visto en otros pacientes como tú, que sus cromosomas se rompen o cambian su forma y pensamos que, si estos cambios se van acumulando, pueden tener que ver con que ustedes tengan enfermedades propias de adultos mayores aún siendo niños o jóvenes. Queremos estudiar estos cambios en la médula ósea, la sangre y la saliva de 12 pacientes de diferentes edades y que, como tú padecen de AF.

Es por esta razón que te invitamos a participar en este estudio, y queremos que entiendas muy bien de que se trata y si tienes dudas, puedes preguntar a cualquier médico o investigador participante, hasta que se resuelva tu duda. Tu debes decidir libremente si quieres participar o no.

**Propósito:**

**¿Para que se efectúa el estudio?**

Queremos realizar este estudio porque es posible que tus cromosomas y los de otros pacientes AF, puedan tener marcas que no tienen los jóvenes, sino los adultos mayores y si logramos entender cuales son los cambios en los cromosomas y el DNA de un grupo de pacientes con tu enfermedad, podremos saber si se relaciona con la anemia y otros padecimientos que sabemos que se presentan en ustedes.

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 9



**Tipo de Intervención de la Investigación:**

**¿En qué consiste el estudio?**

Lo que nosotros vamos a hacer es que cuando vengas a tu consulta para la toma de médula ósea anual, vamos a pedir un poco de esa muestra y también vamos a pedirte que nos dones un poco de sangre que obtendremos de tu brazo, así como saliva. La cantidad que necesitamos es poca, menos de una cucharada sopera de cada muestra. El estudio lo haremos con compañeros de este Instituto y con otros que están en otras instituciones de salud.

**Selección De Participantes:**

**¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Te pedimos participar en este estudio, porque ya te hicieron tu prueba que nos asegura que si tienes la AF y necesitamos pacientes como tú, pero de diferentes edades y sin que tengan otros padecimientos y sin que hayan recibido transfusiones recientes o trasplantes, porque sólo queremos estudiar tus células y no las de tus donadores.

**Participación Voluntaria**

Queremos que estés seguro(a) de que sí quieres participar, si no quieres hacerlo no hay problema y no cambiará la atención que te den tus médicos en el Instituto, ya que tu participación debe ser libre y voluntaria.

**Beneficios**

Con las muestras de médula ósea y sangre, aparte de los estudios hematológicos que se hacen rutinariamente para el seguimiento del paciente, se realizará un análisis cromosómico, que aunque no tendrá un beneficio directo para tí, si podrá generar conocimiento sobre la enfermedad. Con las muestras de saliva (al igual que con las otras muestras) se hará el estudio en el DNA, de aquí no se puede obtener información que sirva directamente para ver si hay algún daño cromosómico, pero nos servirá para obtener información sobre el daño que se ha acumulado en el DNA, lo cual puede ser muy útil para comprender porqué se presentan las características de personas adultas mayores en jóvenes con AF.

**Procedimientos y Protocolo:**

**¿Cuál es mi participación en este proyecto?**

Para nosotros tu participación es muy importante y si aceptas, sólo será una vez la que nos dones las muestras que mencionamos hace un momento y también necesitaríamos que nos contestes algunas preguntas sobre tus hábitos personales. Todo lo que nos digas será información confidencial y anónima, es

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 10



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

decir que tu nombre no aparecerá en los procedimientos ni en los resultados que obtengamos y será utilizada solo para saber lo referente a los cambios en tus cromosomas y DNA que nos ayuden a saber si están haciéndose viejitos antes de tiempo, lo cual si quieres saberlo te lo podemos decir y si no quieres saberlo, no te lo decimos ni a ti ni a otras personas, porque aunque nosotros sepamos los resultados, no vamos a decir tu nombre.

### ¿Cuáles son los riesgos al participar en el estudio?

Si aceptas participar, aparte de la muestra de médula ósea que te toman para tu estudio de rutina, te tomaremos muestra de sangre de tu brazo, que podría doler un poco pero muy poco porque la persona que te la tomará sabe hacerlo muy bien y lo ha hecho muchas veces, la toma es rápida y con todo muy limpio y seguro; la otra muestra es de saliva y no duele ni causa molestias, solo tallaremos un poco tus cachetes por adentro de la boca con un cepillo suave, y te pediremos que escupas en un recipiente limpio.

### Si surge alguna complicación relacionada con el medicamento, maniobra relacionada al estudio, ¿cómo se me atenderá?

Si tuvieras alguna complicación como dolor o un moretón, puedes acudir al médico que te atiende y pedirle ayuda para que te atiendan con él mismo o en otro departamento, como urgencias, quien te dará algo para el dolor o para la molestia que tengas.

### ¿A quién debo buscar si tengo preguntas?

Si tienes preguntas en el momento de que te expliquen esto o después, puedes buscar a la Dra. Sara Frias en el Laboratorio de Citogenética, en el 6º piso de la Torre de Investigación extensión 1436 o a su celular 5529701014, o a la Dra. Angélica Monsivais en el 3er piso del Hospital, o al Dr. Alberto Olaya Vargas, Presidente del Comité de Ética en Investigación, Teléfono 10840900 extensión 1581 (en caso de tener dudas sobre los derechos del participante).

### ¿Puedo dejar de participar en el estudio en cualquier momento?

Si aunque nos hayas dicho que sí participas ahora, si luego te arrepientes, puedes pedirnos que te retiremos del estudio y no cambiará nada de tus derechos como paciente del instituto ni de atención de tus médicos.

### ¿Quién va a conocer mis datos? ¿Qué se va hacer con ellos? ¿Puedo conocerlos, incluyendo los resultados de laboratorio?

Los resultados de tus muestras los conoceremos nosotros que los obtenemos y si los damos a conocer a otras personas, será sin decir nunca tu nombre. Si tu quieres conocer los resultados de tus estudios y quieres que los conozca tu familia nos lo debes indicar y se los podemos decir y explicar de que se tratan y que

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 11



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

pueden significar, en que te pueden ayudar o si solo son para conocimiento de la enfermedad.

Los hallazgos de esta investigación serán difundidos más ampliamente, en congresos y publicaciones, cuidando siempre de no mencionar los nombres de los pacientes.

### Al firmar a continuación acepto que:

1. He leído este formato de asentimiento
2. he tenido la oportunidad de hacer preguntas y estas han sido contestadas
3. Mi participación en estudio es voluntaria
4. Acepto formar parte del estudio con los procedimientos indicados
5. Sé que puedo negarme a participar y retirarme cuando yo quiera
6. Si no sigo las indicaciones de mi médico, me pueden retirar del estudio, sin que esto afecta la atención médica que necesite.

Nombre del niño participante \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Relación con el voluntario \_\_\_\_\_  
**(No deben ser los padres, familiares del niño o Investigadores del estudio)**  
Dirección \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Relación con el voluntario \_\_\_\_\_  
**(No deben ser los padres, familiares del niño o Investigadores del estudio)**  
Dirección \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Investigador que toma el Asentimiento Fecha \_\_\_\_\_

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 12





## Documento De Consentimiento Informado Para Pacientes de 18 años o mayores

Nombre Del Investigador Principal. **Sara Frias Vázquez**

Nombre De La Propuesta y Versión Del Documento **"Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi" V4.**

### PARTE I Información

#### Introducción

Este proyecto está bajo la responsabilidad de la Dra. Sara Frias, quien es Investigadora del Instituto Nacional de Pediatría (INP), y se dedica al estudio de los cromosomas y el genoma de los pacientes con anemia de Fanconi (AF).

En este proyecto se pretende ver si los pacientes con AF envejecen a la misma velocidad que las personas sanas, lo cual puede saberse cuando se estudian algunas marcas en sus cromosomas y en su DNA, que representa su genoma. Creemos que debido a la enfermedad, los pacientes pueden acumular daño en sus cromosomas y que esto puede dar lugar a un envejecimiento prematuro. Es posible también que en diversas partes del cuerpo se acumule diferente cantidad de daño y entonces puede envejecer a diferentes velocidades sus tejidos.

Este estudio se realizará en el INP con la ayuda del Instituto Nacional de Medicina Genómica y nos ayudarán a analizar los datos nuestros colegas de la Universidad de Harvard.

#### Propósito

Con su ayuda, nos proponemos obtener información útil para explicar porqué los pacientes con AF jóvenes, tienen características como la falla medular o leucemia que aparecen preferentemente en individuos de mucho mayor edad.

#### Tipo de Intervención de la Investigación

Para estudiar esto, lo invitamos a participar en este proyecto para lo cual le pedimos que cuando le toque su estudio anual de médula ósea o cuando por alguna otra razón se obtenga médula ósea, nos pueda donar una parte de esa muestra, así como saliva y una muestra de sangre periférica, la cantidad que requerimos de cada tipo de muestra es equivalente a la cantidad de líquido de menos de una cuchara sopera. La muestra de médula ósea será remanente de la muestra que rutinariamente se le toma en hematología y la sangre se tomará por

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 13



personas con mucha experiencia y realizando limpieza en el brazo con alcohol/isodine, se utilizarán jeringas nuevas y estériles. La saliva se obtendrá raspando levemente en la parte interna de sus cachetes con un cepillo suave y haciendo que usted escupa en un recipiente nuevo y limpio. En estas muestras estudiaremos los cromosomas y el DNA para ver si han acumulado daño y si han envejecido sus células a velocidad diferente que los individuos sanos. Nuestro propósito es reunir las muestras de por lo menos 12 pacientes con AF.

#### Selección De Participantes

Necesitamos la participación de pacientes AF de diversas edades, que tengan el estudio de fragilidad cromosómica para asegurar que si son AF. También se les harán algunas preguntas pues será necesario que no estén trasplantados o trasfundidos recientemente, porque en estos casos, podríamos estudiar las células del donador y no las del paciente. Los pacientes que no podrían participar en este estudio son aquellos que fumen, o los que tengan un cáncer declarado y los que estén tomando medicamentos para eso, ya que tanto el cáncer como los medicamentos afectan a las células en estudio.

#### Participación Voluntaria

Se le informa también que su decisión de participar o no en este proyecto es completamente libre y que si decide no participar, esto no tendrá repercusiones en su atención médica rutinaria, ya que su participación es voluntaria.

#### Procedimientos y Protocolo

Las muestras de DNA que no se utilicen, se desecharán cuando finalice el estudio. el día de su cita programada a la Consulta del Servicio Hematología para su toma de muestra rutinaria de médula ósea, se obtendrán también las muestras de sangre y saliva. Se realizará con todos los requisitos de seguridad, material nuevo y guantes y será practicado por personal con amplia experiencia en la toma de la muestra.

Al realizar la extracción de ácidos nucleicos de las células cultivadas a partir de la muestra donada:

a) La muestra será guardada en refrigeración o congelación; solo tendremos acceso los investigadores involucrados directamente al proyecto y se almacenarán identificándolas con un código y no con nombres.

b) Las muestras serán procesadas y guardadas en el Laboratorio de Citogenética del INP para realizar comprobaciones, réplicas o estudios genéticos complementarios para este mismo trabajo. Las muestras sobrantes no utilizadas en este estudio, se eliminarán en cuanto se termine el proyecto.

Cuando se done la muestra para el estudio, puede haber dolor leve o molestia al pinchar el brazo con la aguja, o durante la aplicación de anestesia para la extracción de médula. Pueden presentarse complicaciones mínimas como la formación de un "moretón" en el sitio de extracción, aunque el riesgo es muy bajo por contar con muy buenas condiciones de limpieza y personal capacitado.

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 14



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

### Beneficios

Con las muestras de médula ósea y sangre, aparte de los estudios hematológicos que se hacen rutinariamente para el seguimiento del paciente, se realizará un análisis cromosómico, que aunque no tendrá un beneficio directo para usted, si podrá generar conocimiento sobre la enfermedad. Con las muestras de saliva (al igual que con las otras muestras) se hará el estudio en el DNA, de aquí no se puede obtener información que sirva directamente para ver si hay algún daño cromosómico, pero nos servirá para obtener información sobre el daño que ha acumulado en el DNA, lo cual puede ser muy útil para comprender porqué se presentan las características de personas adultas mayores en jóvenes con AF.

### Incentivos

La inclusión al estudio no implica compensaciones económicas ni de otra índole, por lo que su aceptación de participación es completamente voluntaria y sin remuneraciones, siendo el único beneficio de su participación, el que con la información que se obtenga de este proyecto, se puede ayudar a comprender mejor la enfermedad llamada Anemia de Fanconi lo que podría ayudar en un futuro a pacientes con la misma enfermedad y a sus familiares, a tener una mejor calidad de vida.

### Confidencialidad

Los datos personales se manejarán codificados, por lo que los nombres correspondientes a las muestras sólo los conocerán los investigadores o el personal de salud que el investigador considere necesario para la atención del participante. Los datos serán guardados codificados y en confidencialidad y la publicación que se genere no incluirá el nombre de los participantes.

Las muestras de DNA:

8. Se almacenarán hasta la obtención de resultados de todo el proyecto, calculamos 5 años.
9. Se utilizará para el estudio en proceso solamente.
10. La información generada a partir de dichas muestras no será compartida con otros investigadores o patrocinadores.
11. Las muestras se identificarán por medio de código. La descodificación se realizará al momento del análisis de resultados. Solo los participantes en este estudio podrán recibir la información de los estudios de DNA.
12. Usted puede decidir retirar su muestra en cualquier momento que lo desee.
13. Los resultados del análisis de DNA se mantendrán confidenciales y si usted no desea conocer los resultados se respetará su decisión.
14. En caso de utilizar material genético para obtener nueva información, se le solicitará firmar una nueva carta de consentimiento informado en los términos que dicha investigación requiera.

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 15



## INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

### Entrega y divulgación de resultados

Los resultados de las muestras de los pacientes, los conoceremos nosotros que los obtenemos y si usted quiere conocer los resultados, nos lo puede indicar y se los podemos decir y explicar de que se tratan y que pueden significar, en que pueden ayudar o si solo son para conocimiento de la enfermedad.

Los hallazgos de esta investigación serán difundidos más ampliamente, en congresos y publicaciones, cuidando siempre de no mencionar los nombres de los pacientes.

### Derecho a negarse y/o retirarse

Usted es libre de negarse a participar en este proyecto desde un inicio o bien retirarse en el momento que lo desee, manteniendo los derechos actualmente tiene como paciente y de la atención de sus médicos. De la misma manera, el investigador puede retirar al participante del estudio en caso de que no proporcione las muestras requeridas o la información solicitada.

### A quién contactar

Si tiene alguna duda acerca del estudio o sobre la decisión de participar, usted puede contactar a la Dra. Sara Frías, Responsable del proyecto en el Laboratorio de Citogenética del INP al teléfono: 10840900 extensión 1326 y/o Dra. Leda Torres M. Investigador en Ciencias Medicas, Investigador del proyecto, a la extensión 1326 o 1436 en días y horas hábiles o al celular 5529701014 o 045-777-5137406. En caso de que tenga dudas sobre su participación en este estudio, puede comunicarse con el Dr. Alberto Olaya Vargas, Presidente del Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría, al teléfono 55 67 31 02 25 extensión 1581.

### PARTE 2 Formulario de Consentimiento

*He leído la información proporcionada (o me ha sido leída). He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente a participar en esta investigación como paciente y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que afecte en ninguna manera mi cuidado médico.*

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

Firma del participante: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

*[Si es analfabeto nombre y firma del testigo que sabe leer y escribir (si es posible esta persona debe ser seleccionada por el participante y no tener conexión con el*

Proyecto Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi V4 17-02-2020 16



**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

*equipo de investigación).  
Los participantes analfabetos deben incluir su huella dactilar también.]*

*He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.*

*Nombre del testigo 1: \_\_\_\_\_  
Firma del testigo: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Relación con el participante: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_*

*Nombre del testigo 2: \_\_\_\_\_  
Firma del testigo: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Relación con el participante: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_*

*Nombre del investigador o quien recoge el consentimiento informado: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_*

*Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de consentimiento informado \_\_\_\_\_ (iniciales del investigador)*

*Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_*

### III.- Aprobación del Proyecto por el comité de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría

11/12/2019

Correo de Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM - Dictamen Final - Comité de Investigación



**Dra. Sara Frías Vázquez** <sarafrias@iibiomedicas.unam.mx>

---

#### Dictamen Final - Comité de Investigación

1 mensaje

---

**ppei.admon@gmail.com** <ppei.admon@gmail.com>

11 de diciembre de 2019, 12:36

Para: sarafrias@biomedicas.unam.mx

Cc: comitedeinvestigacioninp@gmail.com

Estimad@ Investigador SARA FRIAS VAZQUEZ:

Por este medio, se hace de su conocimiento que el protocolo titulado: BÚSQUEDA DE ALTERACIONES GENÓMICAS Y EPIGENÉTICAS RELACIONADAS CON ENVEJECIMIENTO CELULAR EN PACIENTES CON ANEMIA DE FANCONI, ha sido evaluado por el Comité de Investigación.

Dictaminado como:  
APROBADO

Comentarios:  
LA INVESTIGADORA CONTESTÓ LAS OBSERVACIONES

A T E N T A M E N T E

Comité de Investigación