



SECRETARIA DE SALUD

---

---

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

"DESCRIPCION CITOGENETICA DE LAS LINEAS CELULARES  
DE ANEMIA DE FANCONI PERTENECIENTES A LOS GRUPOS  
DE COMPLEMENTACION A (HSC 72), D2 (PD 20) Y UNA  
LINEA NORMAL (6846)"

TRABAJO DE FIN DE CURSO  
Q U E P R E S E N T A  
BIOL. PALOMA DEL CARMEN NERI VIDAURRI  
PARA OBTENER EL DIPLOMA DEL CURSO  
AVANZADO EN CITOGENETICA HUMANA

TUTORA DE TESIS: M. en C. BERTHA MOLINA ALVAREZ



MEXICO, D. F.

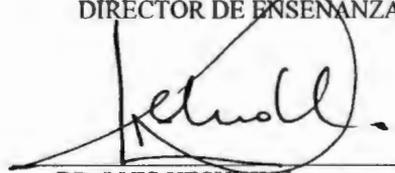
2004

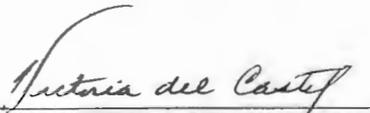
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

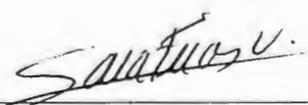
**“Descripción citogenética de las líneas celulares de anemia de Fanconi pertenecientes a los grupos de complementación A (HSC 72), D2 (PD 20) y una línea normal (6846)”**

APROBACIÓN DE TESIS

  
DR. PEDRO SÁNCHEZ MARQUEZ  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

  
DR. LUIS HESHIKI N.  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA  
PRE Y POST GRADO

  
DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ  
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN  
EN GENÉTICA HUMANA

  
DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ  
PROF. TIT. DEL CURSO AVANZADO  
EN CITOGENÉTICA

  
M. EN C. BERTHA MOLINA ALVAREZ  
JEFE DEL LABORATORIO DE CITOGENÉTICA  
HUMANA Y TUTORA DE TESIS

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE CITOGENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA HUMANA EN EL INTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, S.A. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. EN C. BERTHA MOLINA ALVAREZ.

**“DESCRIPCIÓN CITOGENÉTICA DE LAS LÍNEAS CELULARES DE ANEMIA DE FANCONI PERTENECIENTES A LOS GRUPOS DE COMPLEMENTACIÓN A (HSC 72), D2 (PD 20) Y UNA LÍNEA NORMAL (6846)”**

## CONTENIDO

	Página
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
Apéndice 1.....	10
Apéndice 2.....	11
III. Objetivo.....	13
IV. Justificación.....	13
V. Metodología.....	13
VI. Resultados.....	18
VII. Discusión.....	43
VIII. Conclusiones.....	46
IX. Bibliografía.....	47

## DESCRIPCIÓN CITOGENÉTICA DE LAS LÍNEAS CELULARES DE ANEMIA DE FANCONI PERTENECIENTES A LOS GRUPOS DE COMPLEMENTACION A (HSC 72), D2 (PD 20) Y UNA LINEA NORMAL (6846).

### I. RESUMEN.

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada clínicamente por producir pancitopenia, hiperpigmentación de la piel, retraso en el crecimiento, alteraciones esqueléticas y otras malformaciones congénitas. Es una enfermedad que presenta heterogeneidad clínica y citogenética, hasta la fecha se han reportado nueve grupos de complementación. A nivel celular cursa con una alta frecuencia de aberraciones espontáneas e hipersensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales.

Dado que los estudios de AF se realizan en líneas celulares de pacientes que han sido inmortalizadas (líneas linfoblastoides), es de gran importancia conocer la evolución de estas líneas ya que el cariotipo original puede modificarse por las mismas características de inestabilidad cromosómica de las células y las múltiples divisiones celulares de las líneas en cultivo; de tal manera que estos eventos pudieran dar lugar a un cambio en el fenotipo celular original.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el cariotipo de las líneas linfoblastoides de Anemia de Fanconi de los grupos de complementación A (HSC 72), D2 (PD 20) y una línea normal (NL 6846), por medio de bandas cromosómicas GTG e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Para ello, se obtuvieron cromosomas en metafase por medio de la técnica convencional, se realizó la tinción de bandas GTG y se analizaron los cariotipos en 50 metafases por cada línea celular. Adicionalmente, dependiendo de los rearrreglos cromosómicos encontrados por el análisis con bandas, se hicieron múltiples estudios con FISH para dilucidar y determinar certeramente los cariotipos.

El cariotipo inicial de AF-A (HSC 72) mostró 2 clonas celulares:

48,X,del(X)(q21.1),t(9;15)(p10;q10?),+der(9)(pter→q10)+12,+19[36]/48,X,del(X)(q21),+12,+19[14].

El cariotipo inicial de AF-D (PD 20) también mostró 2 clonas celulares:

47,XY,del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),add(4)(p?),inv(7)(p15.2q11.2),-8,der(22)(q?),+mar1,+mar2[25]/idem,inv(6)(?),dup(13)(q?)[25].

Con los hallazgos encontrados se realizó FISH con sondas de tinción completa para los cromosomas 1, 3, 4, 6, 8, 9, 13, 15, 22 y X. Y  $\alpha$ -centromérica para el cromosoma 15. Una vez caracterizados todos los cromosomas se obtuvieron los cariotipos finales para cada línea.

El cariotipo final de la línea linfoblastoide AF-A (HSC 72) fue:

48,X,ish del(X)(q21.1),der(15)t(9;15)(p10;q10?),+der(9)(pter→q10),+12,+19(wcpX+,wcp15+,D15Z+)/48,X,ish del(X)(q21.1),+12,+19(wcpX+)

Y para la línea linfoblastoide AF-D (PD 20) fue:

47,XY.ish del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),der(4)t(4;8;13)(p16;?;?),inv(7)(p15.2q11.23),  
der(8)t(8;22;?)(q22;q12;?),+der(9)(pter-cen-22::?),der(22)t(8;22)(p22;q12)  
(wcp1+,wcp3+,wcp4+,wcp8+,wcp9+,wcp22+)/idem ish inv(6)(p23q13?),dup(13)(q14q22)  
(wcp6+,wcp13+).

La caracterización citogenética se realizó completamente en la línea A (HSC 72) y casi totalmente en la línea D2 (PD 20), ya que debido a que no se contaba con sondas de secuencia única para estudiar los cromosomas alterados no fue posible precisar los puntos de ruptura en 5 cromosomas. Finalmente, podemos corroborar la importancia que tienen tanto el análisis con genética clásica como las técnicas de biología molecular y su complementación para dar un resultado más preciso en el presente estudio.

Realizar los cariotipos de las líneas linfoblastoides es de gran importancia ya que son líneas utilizadas internacionalmente y no están aún descritas y como tales son líneas de referencia para muchos estudios y se tiene que asegurar su estabilidad genética. De tal forma que este estudio se propone como un primer paso para la correlación y control del cariotipo de las líneas linfoblastoides de AF.

## II. INTRODUCCIÓN.

### A) Características clínicas.

La Anemia de Fanconi (AF) fue descrita por primera vez en 1927 por el Dr. Guido Fanconi, profesor de Pediatría y Director del Hospital Infantil de Zurich, quien reportó un caso clínico de tres hermanos que presentaban retraso en el crecimiento, microcefalia, hiperpigmentación de la piel, hiperflexia, hipoplasia genital, anomalías esqueléticas de radio y pulgar y que además desarrollaron anemia aplásica (Duckworth-Rysiecki, *et al*, 1984). Actualmente, se sabe que la AF es una enfermedad autosómica recesiva asociada a malformaciones y a aplasias progresivas de la médula ósea, característica clínica principal que afecta a todos los elementos celulares y da como resultado la aparición de pancitopenia.

Existe una gran variabilidad clínica entre los pacientes de AF, se han observado diferencias en cuanto a la presencia y severidad de las malformaciones congénitas asociadas, así como la edad de aparición y desarrollo de la pancitopenia. Es por ello, que en algunas ocasiones se le considera un estado pre-leucémico porque al menos el 10% de los pacientes desarrollan Leucemia Mieloide Aguda (Berger, *et al*, 1993). La muerte en estos pacientes se presenta entre la edad infantil y la adolescencia por alteraciones de la médula ósea.

La AF se presenta con una prevalencia de 1:26,000 a 1:476,000 en varias poblaciones, en caucásicos se ha estimado que esta enfermedad tiene una frecuencia aproximada para homocigotos de 1:350,000 y para heterocigotos de 1:200 individuos (Gómez, 2003).

Las características clínicas son muy variables en presencia y severidad, entre las más comunes se encuentran:

- ♦ Pancitopenia: se caracteriza por una hipocelularidad o disminución progresiva de las células de la médula ósea, comprende todos los tipos celulares pudiendo manifestarse como anemia aplásica, leucopenia o trombocitopenia. Con frecuencia se ha observado un incremento en el número de macrófagos lo cual indica hemofagocitosis (Alter, 1999).
- ♦ Hiperpigmentación de la piel: se presenta hasta en el 75% de los pacientes, puede ser generalizada o como manchas café oscuro o áreas hiperpigmentadas de tamaño variable localizadas principalmente en el tronco.
- ♦ Malformaciones congénitas: se presentan en el 60% de los casos siendo las más frecuentes las anomalías esqueléticas, afectando principalmente el radio y el pulgar. Otras alteraciones son la microcefalia, la micrognatia y la microftalmia que juntas producen la apariencia de duende, rasgo característico de AF, cambios en los centros de osificación, adelgazamiento de las falanges, maduración esquelética retrasada y osteoporosis (Alter, 1999; Gómez, 2003)

- ◆ Alteraciones renales: tales como riñones malformados, hipoplásicos, pélvicos o agenesia, hidronefrosis y/o cistitis renal congénita. En los varones es frecuente (20%) la hipoplasia genital y la criptorquidia.
- ◆ Bajo peso al nacer: aproximadamente se presenta en el 60% de los pacientes y así como retraso en el crecimiento.
- ◆ Desarrollo de neoplasias: principalmente para la Leucemia Mieloide Aguda, seguida por la Leucemia Monoblástica y la Leucemia Aguda no Linfoblástica. A pesar de que la susceptibilidad a cambios malignos está confinada principalmente al sistema hematopoyético, también se ha descrito cáncer del sistema gastrointestinal y carcinoma hepatocelular. Al menos el 20% de los pacientes desarrollan cáncer, sin embargo la mayoría mueren de otras causas antes de que puedan desarrollar alguna de las neoplasias (Alter, 1999; Berger, *et al*, 1993; Gómez, 2003).

## B) Características citogenéticas.

### 1) Inestabilidad cromosómica.

Debido a que la AF se caracteriza por heredarse de manera autosómica recesiva, presentar una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas y/o inducidas, expresadas como rupturas cromatídicas, cromosómicas y figuras radiales, sensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales, anomalías constitucionales, alta predisposición a desarrollar cáncer y malformaciones congénitas, se considera dentro del grupo de los Síndromes de Inestabilidad Cromosómica, junto con el Síndrome de Bloom, la Ataxia Telangiectasia y el Xeroderma Pigmentoso entre otros (Kupfer and D'Andrea, 1996)

En 1964 Schroeder y colaboradores descubrieron que los linfocitos de AF presentaban un alto número de rupturas cromosómicas espontáneas. Más tarde, en 1973, Sasaki y Tonomura reportaron que esta sensibilidad aumentaba cuando los linfocitos de AF eran expuestos a agentes alquilantes bifuncionales como la mitomicina C (MMC), diepoxibutano (DEB) y mostaza nitrogenada. En la actualidad la MMC y el DEB se utilizan ampliamente para establecer el diagnóstico de la AF dada la hipersensibilidad de éstas células a los clastógenos.

En este aspecto la AF desde el punto de vista citogenético también se considera una enfermedad heterogénea debido a que los pacientes presentan una respuesta celular diferente a la exposición con los agentes clastógenos y mutágenos ya que presentan una sensibilidad diferente en cuanto a la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Gómez, 2003).

## 2) Heterogeneidad genética

Al inicio de su investigación la AF fue una enfermedad de difícil estudio ya que pertenece al grupo de padecimientos en donde los pacientes que la presentan tienen diferentes mutaciones que producen un cuadro clínico similar, es decir, son genéticamente heterogéneos.

Así, en AF, diferentes estudios de complementación por hibridación de células somáticas AF han demostrado la existencia de ésta heterogeneidad genética, es decir, cada uno de los grupos de complementación presentan mutaciones en genes distintos (tabla 1). Hasta la fecha se han clonado seis de los nueve genes responsables de la enfermedad que además de encontrarse en distintas posiciones cromosómicas, las mutaciones en estos genes producen un fenotipo clínico muy similar (Molina, 1998).

## 3) Grupos de complementación.

La heterogeneidad genética se puso de manifiesto a través de los estudios de ligamiento. En 1980 Zakrzewski y Sperling realizaron el primer estudio de hibridación celular con fibroblastos de dos pacientes con diferentes formas fenotípicas de AF y encontraron complementación en el fenotipo celular.

En 1984 el grupo de Duckworth-Rysiecki realizó fusiones celulares con linfocitos de seis pacientes no emparentados con diagnóstico de AF. El resultado de sus experimentos fue la creación de células híbridas; tres de estas líneas celulares continuaron presentando la hipersensibilidad característica a los agentes alquilantes bifuncionales y fueron asignadas a un grupo de complementación designado como AF-A por tener identidad funcional con la línea linfoblastoide de referencia. Las líneas restantes mostraron sensibilidad normal a dichos agentes y se clasificaron como no-A ó AF-B pues presentaron complementación funcional.

Posteriormente más experimentos de construcción de híbridos somáticos entre líneas de referencia y líneas de otros pacientes con AF, demostraron que son varios los genes responsables de la AF. Hasta el momento se han encontrado al menos nueve grupos de complementación: AF-A, AF-B, AF-C, AF-D1, AF-D2, AF-E, AF-F, AF-G y AF-L (Joenje and Patel, 2001; Meetei, *et al*, 2003).

La prevalencia de los diferentes grupos de complementación en un estudio realizado con 245 pacientes de AF mostró que el 70.2% pertenecieron al grupo AF-A, 0.4% al grupo AF-B, 13.9% al grupo AF-C, 1% al grupo AF-D, 2% al grupo AF-E, 2.5% al grupo AF-F, 9.8% al grupo G y hasta la fecha un paciente para AF-L, 0.25% (Faivre, *et al*, 2000; Meetei, *et al*, 2003).

Los grupos de complementación de AF reflejan heterogeneidad en su fenotipo celular. Cada uno de estos grupos presenta mutaciones en diferentes genes localizados en diferentes cromosomas lo cual hace que sus sensibilidades a agentes mutagénicos, sus recuperaciones en la síntesis de DNA semi-conservativa y sus niveles de algunas enzimas involucradas en la reparación del DNA sean diferentes en los nueve grupos, aunque las mutaciones de dichos genes tengan como consecuencia un fenotipo muy similar.

De estos nueve grupos de complementación que se conocen hasta el momento, se han clonado seis genes (tabla 1)

Línea AF	Gen	Localización	Proteína	Citado por:
AF-A	FANCA	16q24.3	1455 aa	(Pronk, <i>et al</i> , 1995)
AF-C	FANCC	9q22.3	558 aa	(Yamashita, <i>et al</i> , 1994)
AF-D2	FANCD2	3p22-26	1451 aa	(Timmers, <i>et al</i> , 2001)
AF-E	FANCE	6p21-22	536 aa	(De Winter, <i>et al</i> , 2000a)
AF-F	FANCF	11p15	374 aa	(De Winter, <i>et al</i> , 2000b)
AF-G	FANCG	9p13		(De Winter, <i>et al</i> , 1998)
AF-L	FANCL			(Meetei, <i>et al</i> , 2003)

Tabla 1. Localización de los genes clonados hasta la fecha de AF.

Y a pesar de que se conocen estos genes no se conocen las funciones que desempeñan sus proteínas en la célula, es decir, no se sabe cuál es el defecto básico de la AF, se han propuesto varias explicaciones basadas en observaciones del fenotipo celular en AF y algunas otras características celulares, tales como:

### C) Defectos básicos sugeridos en AF.

#### a) Reparación.

El hecho de que las células AF presenten aberraciones espontáneas elevadas ha llevado a pensar que el defecto básico de la AF está dado por una deficiencia en la reparación. En 1973 Sasaki y Tonomura sugirieron que el aumento de aberraciones cromosómicas encontradas en células de pacientes con AF podía deberse a un defecto en el mecanismo de reparación de enlaces cruzados producidos por los agentes alquilantes del DNA.

#### b) Ciclo celular.

El ciclo celular en las células AF está alterado ya que se ha encontrado un retraso en el tránsito de la fase G2 de manera espontánea e inducida con MMC; es decir, hay un tránsito muy lento por la fase G2 del ciclo celular lo cual se ve reflejado en que la mayoría de las aberraciones encontradas son de tipo cromatídico. Esto significa que estas células son más lentas y necesitan más tiempo en G2 para reparar el daño post-replicativamente, aunado a que tienen además una reparación deficiente (Dutrillaux, *et al*, 1982).

Estas características llevan a la conclusión de que el defecto en la reparación es a nivel post-replicativo, pues una de las observaciones más importantes de las células AF es que presentan alteraciones en el ciclo celular principalmente en la fase G2/M en donde de hecho detienen el ciclo celular especialmente después de ser tratadas con algún mutágeno (Buchwald and Moustacchi, 1998).

Esta característica de las células AF incluso se utiliza como método diagnóstico para la enfermedad, lo que hace evidente que el defecto en el ciclo celular es una característica tan intrínseca de estas células como la sensibilidad a agentes alquilantes (Seyschab, *et al*, 1995)

#### c) Apoptosis.

Otro fenómeno del ciclo de vida de las células AF que parece estar alterado es la apoptosis. En un estudio realizado por Kruyt y colaboradores en 1996 se encontró que aunque no hay diferencias en la apoptosis espontánea de células de AF comparadas con controles normales, los linfoblastos del grupo AF-C tratados con MMC presentan un nivel mayor de apoptosis y este comportamiento es dosis-dependiente.

En contraste, en otros dos estudios se reportó que los linfoblastos de los grupos AF-A a AF-D presentaron altos niveles de apoptosis espontánea y no se observó ninguna diferencia con el tratamiento a MMC por lo que en este caso las células murieron por necrosis y no por apoptosis (Rosselli, *et al*, 1995; Ridet, *et al*, 1997)

Aunque los resultados encontrados hasta el momento son controversiales, está establecido que sí hay alteraciones en la apoptosis de las células AF. La etiología aún no es clara y pudiera tener orígenes intrínsecos o extrínsecos de la célula, pero es necesario hacer más estudios acerca de éste fenómeno para entender qué origina la apoptosis (Kruyt, *et al*, 1996)

#### d) Hipersensibilidad al Oxígeno (O<sub>2</sub>).

Las células AF presentan hipersensibilidad a niveles altos de O<sub>2</sub> y es muy probable la existencia de una alteración en la reparación del daño inducido por estos radicales de O<sub>2</sub>. Estos radicales causan daño a las células ya que son altamente inestables y reactivos con otras moléculas, lo cual afecta el tránsito de la fase G<sub>2</sub> (Balin, *et al*, 1978). Esta característica llevó a Joenje y colaboradores en 1981 a realizar un estudio del efecto del O<sub>2</sub> en células AF, quienes reportaron que el número de aberraciones cromosómicas se ve aumentado en linfocitos AF expuestos a altas concentraciones de O<sub>2</sub> de una manera dosis-dependiente. También Schindler y Hoehn en 1988, encontraron que el crecimiento de fibroblastos AF en presencia de altas concentraciones de O<sub>2</sub> se ve inhibido y causa la acumulación de células en la fase S y G<sub>2</sub> / M del ciclo celular.

Otra cuestión importante es que muchos de los agentes alquilantes del DNA producen especies reactivas de O<sub>2</sub>, por lo que se ha postulado que un posible defecto que explicaría la sensibilidad de AF a estos agentes sería la incapacidad para procesar adecuadamente este radical libre (Buchwald and Moustacchi, 1998)

A pesar de estas evidencias, la sensibilidad al O<sub>2</sub> se considera como un defecto secundario al defecto básico y no como la base del padecimiento pues no se han encontrado mutaciones en las enzimas que se encargan de proteger a la célula contra el estrés oxidativo, por lo que la sensibilidad al O<sub>2</sub> puede ser una consecuencia secundaria (Saito, *et al*, 1993)

#### e) Factores de crecimiento

Se han encontrado anomalías en algunos factores de crecimiento en AF y se ha postulado que sus alteraciones podrían estar modulando la inestabilidad cromosómica y/o la sensibilidad a agentes alquilantes, sin embargo, el mecanismo preciso no se conoce (Buchwald and Moustacchi, 1998).

Varios investigadores han reportado que hay una baja producción de algunos factores de crecimiento. En 1992 Roselli y colaboradores encontraron que los linfocitos de AF producen la mitad de interleucina 6 (IL6) y cuando crecen en presencia de esta sustancia, la sensibilidad que presentan las células hacia la MMC es parcialmente corregida, al menos en los grupos AF-A, AF-B, AF-C y AF-D, además de reportar altos niveles del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) (Roselli, *et al*, 1992; Roselli, *et al*, 1994)

Otro hallazgo importante es que la existencia de una alta concentración del factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ), provoca un incremento de radicales libres que son capaces de dañar de manera significativa el ADN.

En este aspecto también existe cierta controversia ya que algunos estudios indican que las células AF no responden a la inducción de citocinas, mientras que otros han demostrado que existe una hipersensibilidad a ciertos factores de crecimiento (Rathbun, *et al*, 1997; Kupfer and D'Andrea, 1996)

## Apéndice 1

### Evolución clonal de líneas celulares AF inmortalizadas *in vitro*.

Líneas celulares derivadas de pacientes con AF se utilizan ampliamente en estudios relacionados con la búsqueda del defecto básico de la enfermedad ya que presenta una gran disposición a desarrollar uno o varios tipos de cáncer caracterizados a nivel celular por una alta inestabilidad cromosómica e hipersensibilidad a uno o más agentes alquilantes.

Sin embargo, se sabe que las líneas celulares mantenidas *in vitro* pueden sufrir evolución clonal, es decir, tienen la capacidad de generar nuevas líneas y/o aberraciones cromosómicas, esto es, por una selección natural que las mismas condiciones del cultivo *in vitro* les ofrece (Mrózek and Bloomfield, 1997).

Ahora, si a esto sumamos la alta frecuencia de inestabilidad cromosómica que presentan las células de AF esperaríamos encontrar tasas más altas aún, de alteraciones cromosómicas de cualquier tipo (Mrózek and Bloomfield, 1997). Es por ello que Berger y colaboradores en 1993 consideraron a la AF como un estado pre-leucémico, es decir, el paciente AF puede llegar a desarrollar leucemia por evolución clonal.

En este aspecto desde 1914 Boveri sugirió que alteraciones específicas en ciertos cromosomas permitían en el cambio de un estado normal a uno anormal o neoplásico, acompañado por cambios en el patrón de crecimiento, metabolismo y morfología celular (Mrózek and Bloomfield, 1997).

Es decir, la transformación inicial de una población celular puede empezar por un evento molecular de mutación y/o alteraciones genómicas (translocaciones o deleciones). De tal manera que el proceso inicial de transformación puede ser un evento que no sea detectado citogenéticamente. Subsecuentemente la célula se divide formando una población celular.

Posteriormente a este evento surgen cambios adicionales que son importantes para el futuro desarrollo de la nueva clona celular y progresión. Las células siguen dividiéndose y muchas de ellas adquieren más anomalías cromosómicas eventualmente formando una población celular de clones heterogéneas pero no muy diferentes entre ellas significativamente (Mrózek and Bloomfield, 1997).

De manera que la compilación de alteraciones genéticas durante la evolución y la divergencia de las subsecuentes clonas celulares son las que causan los cambios en el genotipo original de la población celular. Las anomalías que frecuentemente se presentan son deleciones, que pueden estar involucradas con pérdidas de genes supresores de tumores y translocaciones y amplificaciones que están involucrados en la activación de proto-oncogenes (Mrózek and Bloomfield, 1997).

## Apéndice 2.

### Inmortalización de las líneas AF con virus Epstein-Barr.

Comúnmente todas las líneas celulares de AF son inmortalizadas para su estudio y su distribución mundialmente. Uno de los virus utilizados en el Instituto Nacional de Pediatría con este fin es el virus de Epstein-Barr.

El virus Epstein Barr (VEB) es un  $\gamma$ -herpes virus humano linfotropo, cuyos principales blancos son los linfocitos B y las células epiteliales. El VEB es distinto de los demás herpesvirus humanos ya que su genoma de DNA contiene alrededor de 172 Kbp que codifican aproximadamente unas 100 proteínas, la molécula de ADN tiene por ambos extremos un número variable de repeticiones terminales, cada una con una longitud aproximada de 500 pb.

La recombinación entre estas repeticiones terminales origina la formación de una molécula extra-cromosómica cerrada covalentemente (episoma), que es la estructura que el virus adopta en el núcleo de las células infectadas en forma latente (Groux, *et al.* 1997; Voet, 1990)

El virus utiliza para infectar a la célula una de las proteínas de su envoltura, gp350, que se une al receptor celular CD21, que a la vez funciona como ligando para la unión con el factor C3d del complemento, lo cual produce anticuerpos que son expresados en la superficie de los linfocitos B durante la infección. En esta fase las células B permiten la replicación viral con expresión de todos los antígenos virales, la formación de viriones y en último caso la lisis celular.

La mayoría de las células infectadas expresan solamente un número limitado de genes y no permiten en ese momento la replicación viral (Infección latente). En algún momento de esta fase latente alguna de estas células puede entrar en actividad y permitir un ciclo completo replicativo. En esta fase las células infectadas son controladas por las NK y los linfocitos T que proliferan en gran cantidad. *In vivo* este aumento celular es el responsable del aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, bazo e hígado que pueden verse en la fase aguda de la infección. En la fase de convalecencia y latencia son estos últimos los mecanismos más importantes para la vigilancia y control de la enfermedad (Groux, *et al.* 1997; Dolcetti and Masucci, 2003)

Durante la infección el virus se comporta como un mitógeno para las células B, induciendo la producción de IgM, las células B infectadas activan las células T, se produce una infección latente de las células B capaz de causar recidivas y el virus inmortaliza los linfocitos B e induce su proliferación, en ausencia de supresión por parte de las células (Dolcetti and Masucci, 2003) (figura 1).

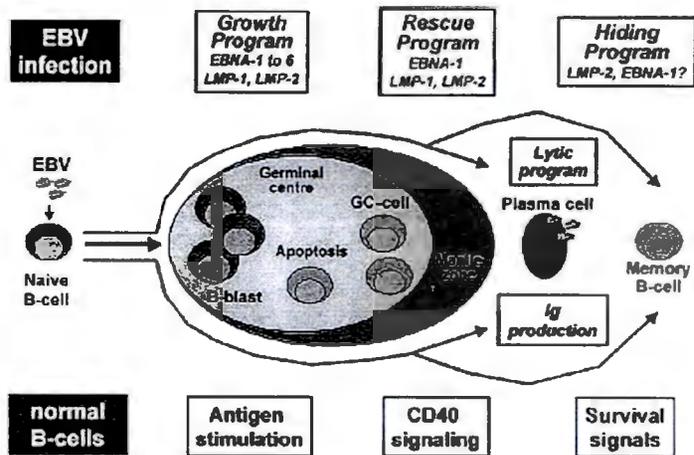


Figura 1. Infección del VEB y la respuesta de los linfocitos B. La expresión viral del VEB por los linfocitos B infectados se divide en 4 programas: "programa de crecimiento" activado por la infección del VEB a los linfocitos B la cual es responsable de la generación y proliferación de inmunoblastos B los cuales a la vez son dependientes de las señalizaciones de CD40. Al captar esta situación la célula entra al "programa de rescate" el cual trata de captar las células infectadas. La evolución a una total diferenciación celular puede permitir la activación de un "programa lítico" permitiendo la proliferación del virus. Alternativamente los virus producidos suprimen la memoria de los linfocitos y entra a un "programa de latencia".

### III. OBJETIVO.

Determinar el cariotipo de las líneas linfoblastoides de Anemia de Fanconi de los grupos de complementación A (HSC 72), D2 (PD 20) y una línea normal (NL 6846), por medio de bandas cromosómicas GTG e hibridación *in situ* con fluorescencia.

### IV. JUSTIFICACIÓN.

Dado que existen alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales en el cariotipo de una misma línea linfoblastoide y que dicha anomalía radica en la inestabilidad cromosómica propia de la AF, es de gran importancia el estudio y caracterización del cariotipo de las líneas linfoblastoides ya que los principales estudios de AF están basados en éstas líneas. Y ya que se conocen al menos 6 genes involucrados en cromosomas diferentes se aporta valiosa información acerca de los cambios cromosómicos de dichas líneas que en consecuencia podrían alterar el fenotipo AF original posiblemente revirtiéndolo.

### V. METODOLOGIA.

#### I) POBLACION DE ESTUDIO.

En este estudio se trabajó con los tipos de complementación AF-A (HSC 72) y AF-D (PD20). Cuyas características clínicas son:

AF-A: Pacientes sin deformidades esqueléticas, se manifiesta a temprana edad, altamente sensibles a mitomicina C, deficiente en la replicación de reparación de rupturas de doble hebra y enlaces cruzados.

AF-D: Pacientes con algunas deformidades esqueléticas, se manifiesta tardíamente y son altamente sensibles a la mitomicina C.

Y una línea linfoblastoide normal (NL 6846) transformada en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría por infección de linfocitos de un individuo normal con el VEB.

Las líneas linfoblastoides de cultivaron en cajas Falcon (NUNC) con medio RPMI (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino previamente inactivado a 56°C durante 30 min (HYCLONE) al 10%, L-glutamina (GIBCO) al 1%, piruvato de sodio (GIBCO) al 1%, aminoácidos no esenciales (GIBCO) al 1% y antibiótico/antimicótico (GIBCO) al 1%. Las líneas celulares se mantuvieron en incubación a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

## II) CULTIVOS CELULARES.

Al inicio del experimento se hicieron viabilidades celulares, para ello se preparó una solución con la suspensión celular y el colorante azul tripano al 0.4% (SIGMA) en una proporción 1:1, se colocaron 10  $\mu$ l en un hemocitómetro, por exclusión de color se procedió a contar las células vivas (sin color) y las células muertas (con color). Sólo se utilizaron los cultivos con viabilidad igual o mayor al 90%. En el mismo hemocitómetro se valoró la densidad celular para cada línea linfoblastoide, con el fin de obtener una densidad de 1,500,000 células en un volumen final de 5 ml de medio RPMI suplementado.

## III) COSECHA.

Después de monitorear la óptima concentración y el tiempo de exposición ideal para obtener el mayor número de células en metafase por campo, los cultivos de las líneas linfoblastoides se expusieron a 2.5  $\mu$ l de colcemida (SIGMA) a una concentración de 10 mg/ml por 1 hr a 37°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular, se agregó 5 ml de solución hipotónica de KCl 0.075 M (MERCK) y se incubaron durante 20 min a 37°C.

Enseguida las células se prefijaron agregando 1 ml de solución Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) previamente refrigerada (MERCK) y se homogenizó el cultivo. Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se fijó en agitación constante con solución Carnoy, se agregó nuevamente fijador y se volvieron a centrifugar, este último paso se repitió 3 veces.

## IV) ELABORACION DE LAS LAMINILLAS.

La elaboración de las laminillas se realizó de dos maneras. Aquellas destinadas al análisis de cromosomas por medio de bandas GTG se elaboraron por medio de goteo del paquete celular concentrado en portaobjetos limpios y desengrasados, se fijaron a la flama y se dejaron secar. Las laminillas para la técnica de FISH se realizaron de la misma manera pero se fijaron sobre una superficie caliente sin flamear.

## V) BANDEO CROMOSÓMICO PARA BANDAS GTG.

Las laminillas se maduraron durante 2 o 3 días a 37°C. Las bandas G se obtuvieron después de digerir parcialmente a los cromosomas con proteólisis suave con tripsina y teñirlas con Giemsa (MERCK) y Wright (MERCK)

## VI) HIBRIDACION *IN SITU* CON FLUORESCENCIA

### VI.1) Maduración de las laminillas.

Las laminillas se trataron con ácido acético al 70% durante 2 min, se colocaron después en 2X SSC 2 min, se deshidrataron con etanol al 70, 85 y 100%, se dejaron 30 min a 37°C en 2X SSC y se volvieron a deshidratar con etanoles nuevos con las concentraciones antes señaladas.

### VI.2) Desnaturalización.

#### Laminillas

Las laminillas se desnaturalizaron en solución al 70% de formamida/2X SSC durante 2 min 15 seg a una temperatura de 70°C, se deshidrataron en alcoholes de 70%, 85%, y 100% por 2 min respectivamente y se dejaron secar a temperatura ambiente.

#### Sondas

La desnaturalización de las sondas utilizadas dependió del tipo de sonda, las cuales se señalan en la siguiente tabla:

Tipo de sonda	Crom.*	Sonda	Hibrisol	Pre alineamiento	Temp. de desnaturalización	Tiempo de desnaturalización
<b>SONDAS ONCOR (ONCOR, 1996) MARCADAS INDIRECTAMENTE</b>						
Centromérica $\alpha$ -satélite	15	1.5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	-----	72°C	5 min
Tinción completa	3, 4, 9, 13 y X	10 $\mu$ l	-----	30 min 37°C	72°C	10 min

\*cromosomas marcados con digoxigenina: 3, 4, 13 y 15

\*cromosomas marcados con biotina: 9

Tipo de sonda	Cromosomas**	Sonda	Buffer de hibridación	Temperatura de desnaturalización	Tiempo de desnaturalización
<b>SONDAS VYSIS (DOWNEY GROVE, IL) MARCADAS DIRECTAMENTE</b>					
Tinción completa	1, 6, 8, 15 y 22	1 $\mu$ l	7 $\mu$ l	73°C	5 min

\*\*cromosomas marcadas con espectro verde: 6 y 5.

\*\*cromosomas marcadas con espectro naranja: 1, 8 y 22.

### VI.3) Hibridación.

Se aplicaron 10 µl de la sonda desnaturalizada a cada laminilla, se colocó encima un cubreobjetos limpio, se selló perfectamente con goma y se incubó a 37°C durante 24 horas en una cámara húmeda.

### VI.4) Lavado post-hibridación.

Una vez transcurrido este tiempo se removió con cuidado la goma y el cubreobjetos se dejó deslizar por sí solo. Las soluciones de lavado utilizadas dependieron igualmente del tipo de sonda, las cuales se señalan en la siguiente tabla:

Tipo de sonda	1ra Solución de lavado	2da solución de lavado	Tiempo de lavado
α-centromérica ONCOR	-----	X SSC 72°C	5 min
Tinción completa ONCOR	-----	X SSC 72°C	5 min
Tinción completa VYSIS	0.3% NP 40 73°C	0.1% NP 40 Temp. Amb.	2 min y 10 seg respectivamente

Posteriormente las laminillas se lavaron en Tween 20 (SIGMA) 3 veces durante 2 minutos a temperatura ambiente.

### VI.5) Amplificación y detección.

Las laminillas se retiraron de la solución de Tween 20. La detección y amplificación se realizó de la siguiente manera para cada tipo de sonda.

Tipo de sonda	Anticuerpo	Incubación	Lavado	Detección
α-centromérica ONCOR	Digoxigenina FITC	20 min 37°C	3 veces 2 min	8 µl Dapi
Tinción completa ONCOR	Digoxigenina FITC / Biotina Rojo Texas	20 min 37°C	3 veces 2 min	8 µl Dapi
Tinción completa VYSIS	-----	-----	-----	8 µl Dapi

Una vez colocado el Dapi se colocó un cubreobjetos de vidrio limpio y se selló con goma.

## VII) ANALISIS CELULAR

Se analizaron 50 células en metafase en un microscopio óptico en campo claro en el objetivo de 100X para el análisis de bandas GTG y 30 células en metafase en un microscopio de fluorescencia Olympus BX49 con una lámpara de vapor de mercurio de arco corto HBO de 100 watts y un filtro BF de 520/610 nm de triple banda: Dapi, FITC, Rojo Texas y filtros adicionales con el objetivo de 100X para el caso del análisis con FISH.

## VI. RESULTADOS.

### A) Línea linfoblastoide AF-A (HSC 72)

En el análisis de 50 metafases con bandas GTG se obtuvo una resolución de 400 bandas y se encontraron 2 clonas celulares.

La primer clona estuvo compuesta por un número modal de 48 cromosomas con complemento sexocromosómico X, una deleción parcial (Xq), una t(9;15), trisomía 12 y trisomía 19 en 36 metafases analizadas.

El cariotipo inicial fue:

48,X,del(X)(q21.1),t(9;15)(p10;q10?),+der(9)(pter→q10)+12,+19 [36] (**figura 1**).

La segunda clona estuvo compuesta también por un número modal de 48 cromosomas con complemento sexocromosómico X, una deleción parcial (Xq), trisomía 12 y trisomía 19 en 14 metafases analizadas.

El cariotipo inicial fue:

48,X,del(X)(q21),+12,+19 [14] (**figura 2**).

Con estos hallazgos se dedujo que la clona identificada como "segunda clona" es el cariotipo original de la línea. Subsecuentemente se originó la clona identificada como "primer clona" con la translocación entre los cromosomas 9 y 15 y que además es muy probablemente que esta translocación esté desbalanceada lo cual da origen al cromosoma der(9). Es importante mencionar que la evolución clonal de la línea tiende a que la translocación se establezca en un tiempo determinado ya que se encontró en un número mayor de metafases.

De acuerdo a esto, se realizó el análisis de FISH con sondas de tinción completa para los cromosomas X, 9, 15 y 15  $\alpha$ -centromérica.

Con la sonda 9 (marcada con rojo) y X (marcada con verde), se observó:

- Tres señales para el cromosoma 9: una señal en el cromosoma 9 normal, una segunda señal indicando el brazo largo del cromosoma 9 translocado con el cromosoma 15 y una última señal en el cromosoma der(9) (**figura 3**).
- Dos señales para el cromosoma X: una señal en el cromosoma X normal y otra señalando el del(X) (**figura 3**).

Con la sonda para el cromosoma 15 (marcado con verde) se encontró:

- En la clona 1 dos señales: una señal en el cromosoma 15 normal y otra en el cromosoma translocado. (**figura 4**).
- En la clona 2 dos señales: correspondientes a los dos cromosomas 15 normales. (**figura 5**).

Para corroborar el origen del centrómero de la translocación con la sonda  $\alpha$ -centromérica 15 (marcada con verde) se encontró:

- En la clona 1 dos señales centroméricas: una señal en el cromosoma 15 normal y otra señal en el cromosoma translocado. Este análisis permitió identificar que el centrómero pertenecía al cromosoma 15 de manera que se trataba un cromosoma der(15) por una t(9;15) (**figura 6**).

En conclusión para la línea linfoblastoide AF-A (HSC 72) se encontraron los siguientes rearrreglos cromosómicos:

- del(X)(q21.1)
- der(15)t(9;15)(p10;q10?)
- der(9)(pter→q10)
- trisomía 12)
- trisomía 19

De este modo el cariotipo final de la línea linfoblastoide AF-A (HSC 72) es:

---

48,X,ish del(X)(q21.1),der(15)t(9;15)(p10;q10?),+der(9)(pter→q10),+12,+19 (wcpX+,wcp15+,D15Z+) (**figura 7**)

48,X,ish del(X)(q21.1),+12,+19(wcpX+) (**figura 8**)

---

#### B) Línea linfoblastoide AF-D2 (PD20)

En el análisis de 50 metafases con bandas GTG se obtuvo una resolución de 400 bandas y se encontraron 2 clonas celulares:

La primer clona estuvo compuesta por un número modal de 47 cromosomas con complemento sexocromosómico XY, deleción (1)(q23q25), duplicación de la región (3)(q22q26), add(4)(p?), una inv(7)(p15.2q11.2), monosomía 8, der(22)(q?) y 2 marcadores cromosómicos en 25 metafases analizadas.

El cariotipo inicial fue:

47,XY,del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),add(4)(p?),inv(7)(p15.2q11.2),-8 , der(22 q?)+mar1,+mar2[25] (**figura 9**).

La segunda clona además de los rrenglos antes mencionados en la clona 1 se encontró una inv(6)(?) y una dup(13)(q?) en 25 metafases analizadas.

El cariotipo inicial fue:

47,XY,del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),add(4)(p?),inv(6)(?),inv(7)(p15.2q11.2),-8 , dup(13)(q?),der(22 q?)+mar1,+mar2[25] (**figura 10**).

Con estos hallazgos podemos deducir que la primer es el cariotipo original de la línea y que por la propia inestabilidad cromosómica originó los diferentes rearrreglos cromosómicos encontrados.

Subsecuentemente se originaron nuevos rearrreglos que involucraron al cromosoma 6 y al cromosoma 13. Y como se encontraron el mismo número de metafases en ambas clonas no se puede confirmar que línea celular tiende a establecerse.

De acuerdo a esto, se realizó el análisis de FISH con las sondas de tinción completa para los cromosomas: 1, 3, 4, 6, 8, 9, 13 y 22 con el fin de corroborar los hallazgos con bandas GTG y determinar el origen de los 2 marcadores cromosómicos.

Con la sonda para el cromosoma 1 (marcada con rojo) se encontró:

- Dos señales: correspondientes a los dos cromosomas 1 y no se encontró material genético insertado en algún otro cromosoma (**figura 11**).

Con las sondas para los cromosomas 3 (marcada con verde) y 4 (marcada con rojo) se encontró:

- Dos señales: correspondientes a los dos cromosomas 3 lo que confirma la duplicación 3q (**figura 12**).
- Dos señales para el cromosoma 4: una señal en el cromosoma 4 normal y la otra en el cromosoma identificado como add(4)(p+) por lo que se refiere a un cromosoma der(4) (**figura 12**).

Con las sondas para los cromosomas 6 (marcado con verde) y 8 (marcado con rojo), se encontraron:

- Dos señales para el cromosoma 6: una señal en un cromosoma 6 normal y la otra en el otro cromosoma 6 invertido el cual no presenta material extra y no está involucrado en otro rearrreglo (**figura 13**).
- Cuatro señales para el cromosoma 8: una señal en un cromosoma 8 normal, otra señal indicando que el mar1 es un derivativo 8 con material extra de origen desconocido. Una más insertada en el der(4) y la última señal en el der(22) que por lo tanto está translocado con el cromosoma 8. (**figura 13**).

Con estos hallazgos se regresó al análisis con bandas GTG en donde se determinó que el cromosoma 6 tenía una inversión pericéntrica de la región comprendida de (p23q13?). Para el cromosoma 8 se encontró que la señal correspondiente al mar1 correspondía a un cromosoma derivativo (8) formado por una translocación de la región 8q22 al cromosoma 22 en q12, que a su vez tiene material genético de origen desconocido.

Para el cromosoma 9 (marcado con verde), se observó:

- Tres señales: 2 correspondientes al par cromosómico 9 normal y el mar 2 que no hibrida completamente con la sonda del cromosoma 9 (**figura 14**).

Al análisis con bandas GTG se corroboró que este marcador corresponde a un cromosoma der(9) que comprende de pter a 9q22 en donde se rompe y une con material genético de origen desconocido.

Para el cromosoma 13 (marcada con rojo) se encontraron:

- Tres señales: una señal en el cromosomas 13 normal, otra señal en el cromosoma der(4) lo que indica una translocación con este cromosoma y el otro cromosoma 13 sólo presentó duplicación del mismo (**figura 15**).

Por último para el cromosoma 22 (marcado con rojo), en cuyo análisis se repitió el estudio para el cromosoma 6 (marcado con verde) se encontró:

- Tres señales para el cromosoma 22: una en el 22 normal, otra señal mostró que el der(8) tiene material del cromosoma 22 en el brazo largo y la última señal que el der(22) esta translocado con un segmento del cromosoma 8 (**figura 16**).

Al análisis con bandas GTG se corroboró que el der(22) esta formado por una translocación con el cromosoma 8 en la región 8q22 a la banda 22q12.

En conclusión para la línea linfoblastoide AF-D2 (PD 20) se encontraron los siguientes rearrreglos cromosómicos:

- del(1)(q23q25)
- dup(3)(q22q26)
- der(4)t(4;8;13)(p16;?;?)
- inv(6)(q23q13)
- inv(7)(p15.2;q11.23)
- mar1= der(8)t(8;22;?)(q22;q12;?)
- mar2= der(9)(pter-cen-22::?)
- dup(13)(q14q22)
- der(22)t(8;22)(p22;q12)

De este modo el cariotipo final del la línea linfoblastoide AF-D2 (PD 20) es de la siguiente manera:

---

47,XY.ish del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),der(4)t(4;8;13)(p16;?;?),  
inv(7)(p15.2q11.23),der(8)t(8;22;?)(q22;q12;?),+der(9)(pter-cen-22::?),  
der(22)t(8;22)(p22;q12)(wcp1+,wcp3+,wcp4+,wcp8+,wcp9+,wcp22+) (**figura 17**)

---

47,XY.ish del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),der(4)t(4;8;13)(p16;?;?),  
dup(13)(q14q22),inv(6)(p23q13?),inv(7)(p15.2q11.23),der(8)t(8;22;?)(q22;q12;?)  
,+der(9)(pter-cen-22::?),der(22)t(8;22)(p22;q12)  
(wcp1+,wcp3+,wcp4+,wcp8+,wcp9+,wcp5+,wcp13+,wcp22+) (**figura 18**)

---

C) línea linfoblastoide NL (6846)

El cariotipo por bandas GTG para la línea linfoblastoide normal mostró en 50 metafases:

Un número modal de 46 cromosomas con complemento sexocromosómico XY.

Los rearrreglos cromosómicos observados en las líneas linfoblastoides AF-A (HSC 72) y AF-D2 (PD20) se ilustran esquemáticamente en las **figuras 19 y 20** respectivamente.





Figura 2. Cariotipo de la línea linfoblastoide AF-A (HSC 72) clona 2.  
48,X,del(X)(q21),+12,+19

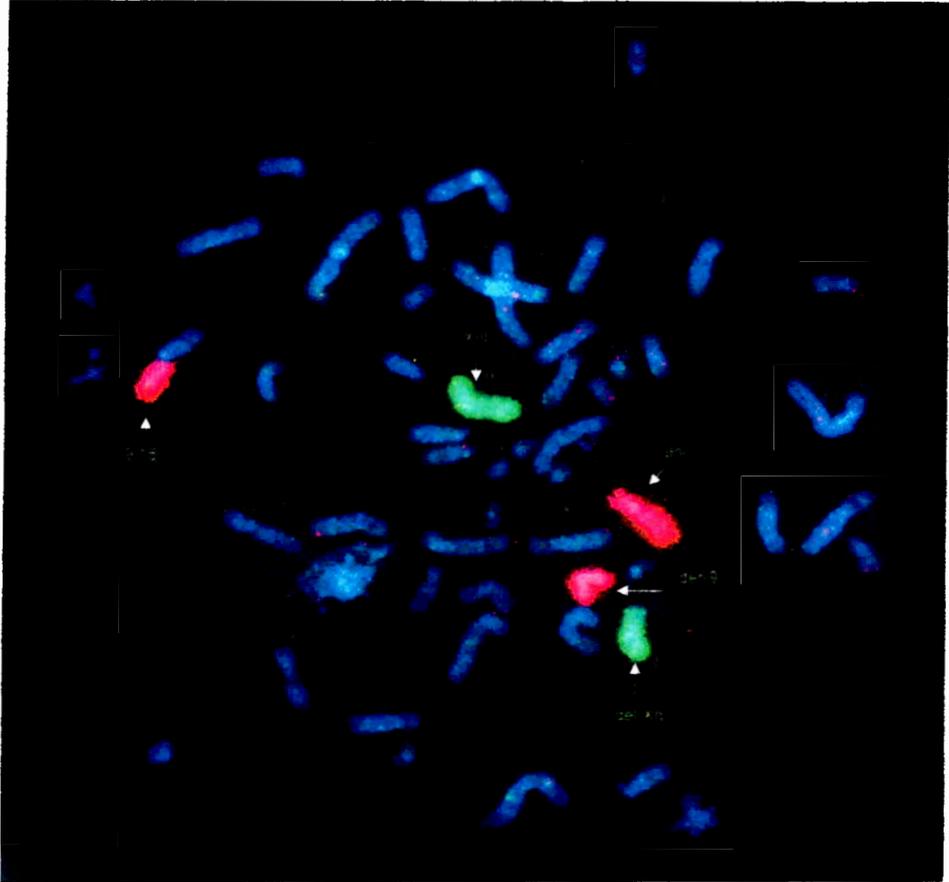


Figura 3. FISH de la línea linfoblástoide AF-A (HSC 72). La tinción completa del cromosoma 9 (rojo) y X (verde) confirmó la existencia de una translocación 9/15 y una deleción parcial del cromosoma X.

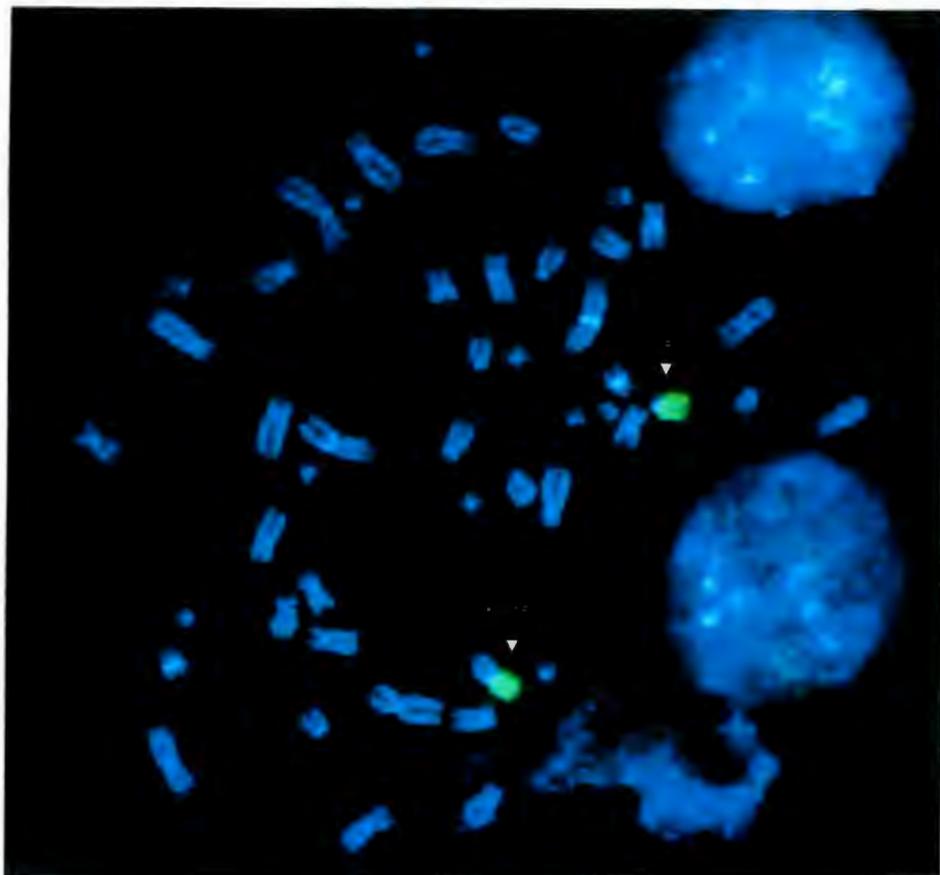


Figura 4. FISH de la leña linfoblastoide AF-A (HSC 72) Clona 1. La sonda de tinción completa para el cromosoma 15 corroboró que efectivamente se trataba de una translocación 9/15.

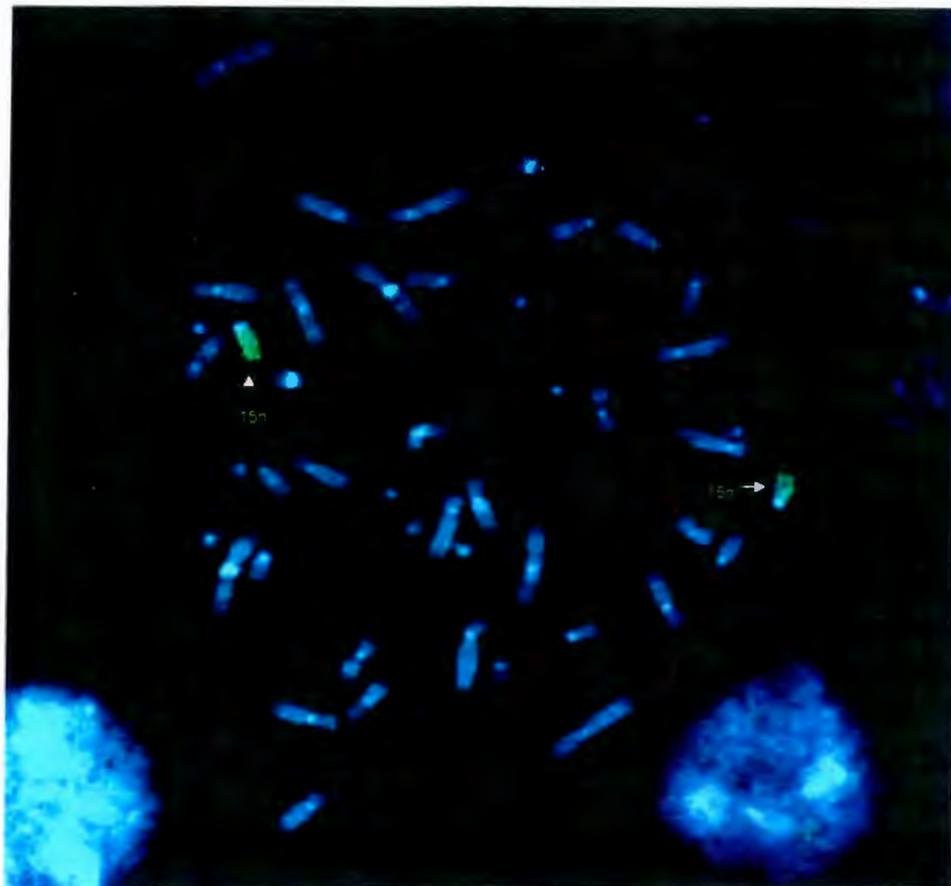


Figura 5. FISH de la línea linfoblastoide AF-A (HSC 72) Clona 2. De igual con la sonda de tinción completa para el cromosoma 15 (verde) se observa el par cromosómico normal 15 en la clona 2.

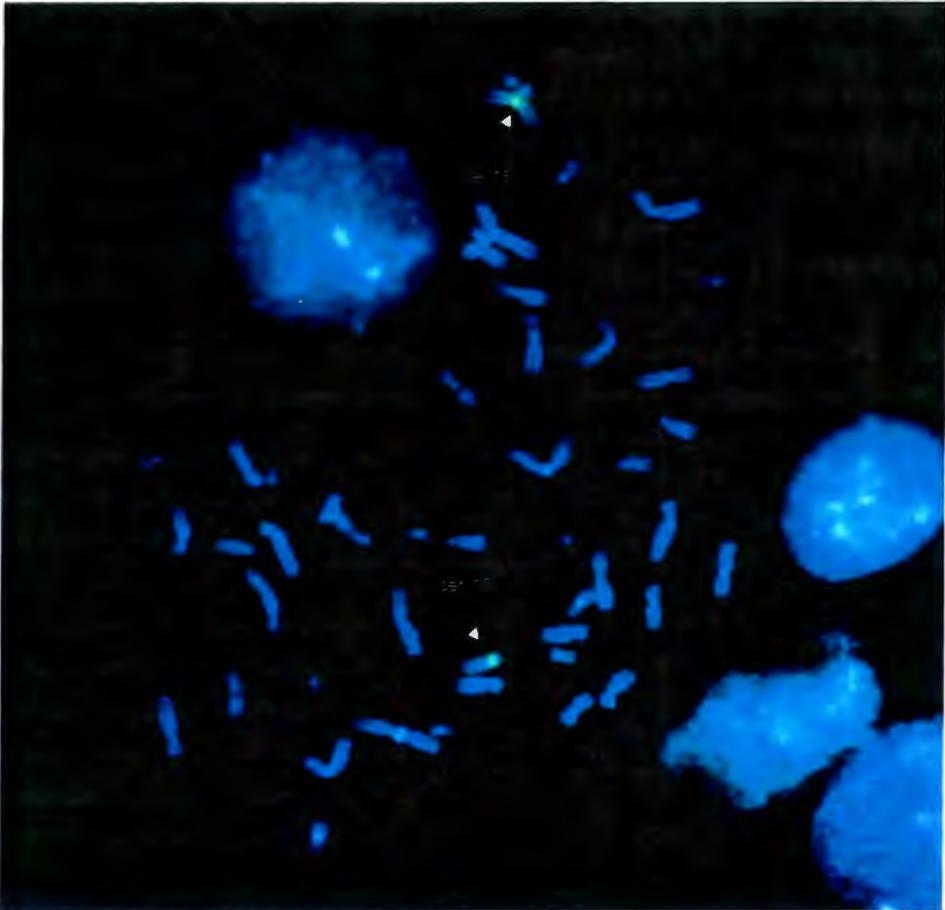


Figura 6. FISH de la línea linfoblástoide AF-A (HSC 72) clona. La sonda para el cromosoma 15  $\alpha$ -satélite (verde) indica que el centrómero de la t(9;15) pertenece al cromosoma 15 por lo que se trata de un der(15).

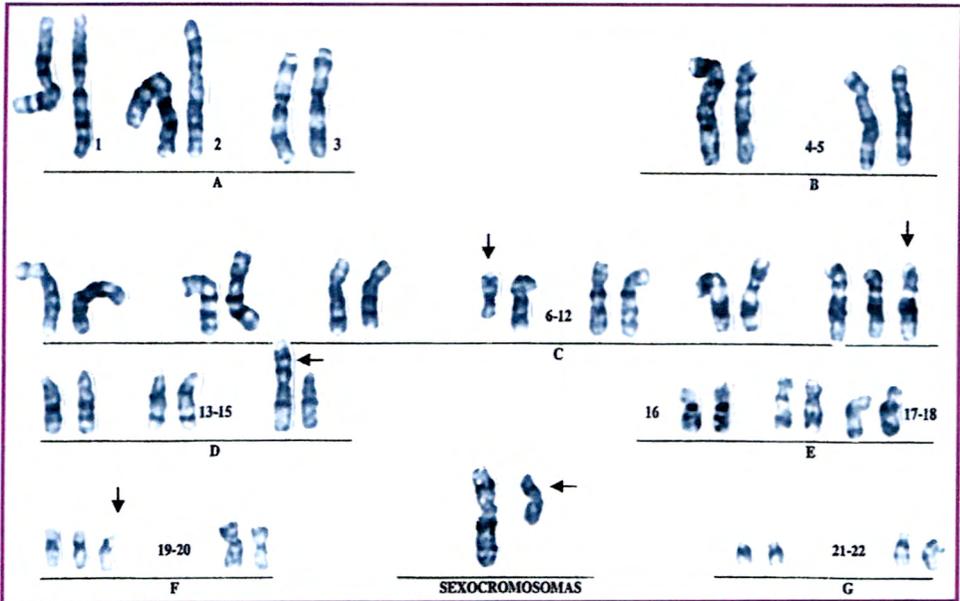


FIGURA 7. Cariotipo final de la línea linfoblástoide AF-A clona 1.

48,X,ish del(X)(q21.1),der(15)t(9;15)(p10;q10?),+der(9)(pter→q10),+12,+19  
(wcpX+,wcp15+,D15Z+)

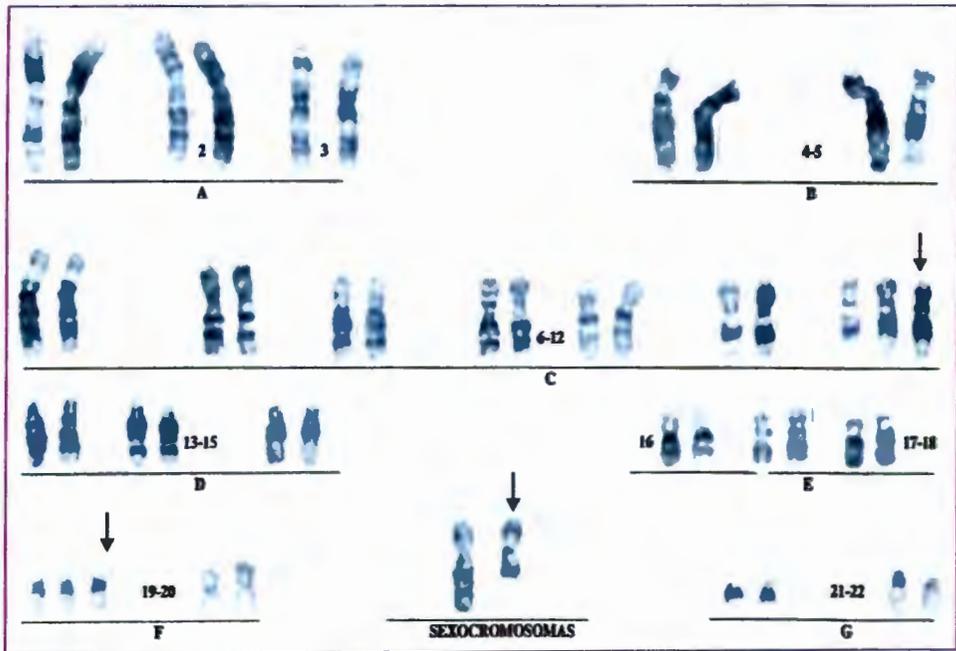


FIGURA 8. Cariotipo final de la línea linfoblástoide AF-A clona 2.  
 48,X,ish del(X)(q21.1),+12,+19(wcpX+)



Figura 9. Cariotipo de la línea linfoblástica AF-D2 (PD 20) clona 1. 47,XY,del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),add(4)(p?),inv(7)(p15.2q11.2),-8,der(22 q?),+mar1,+mar2

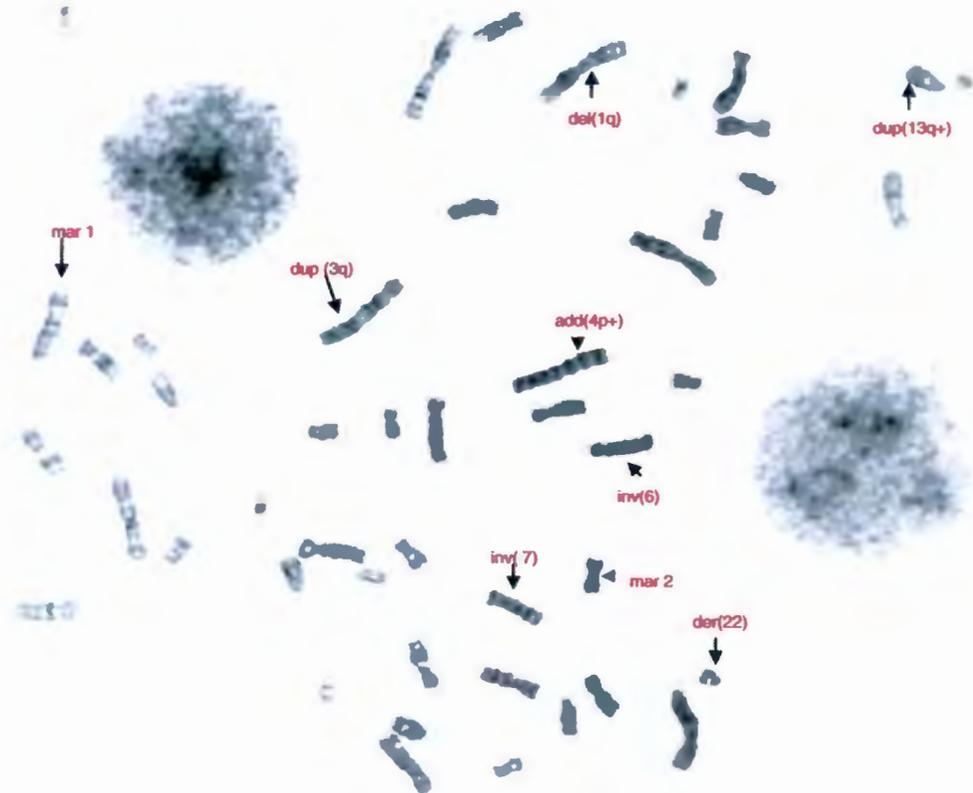
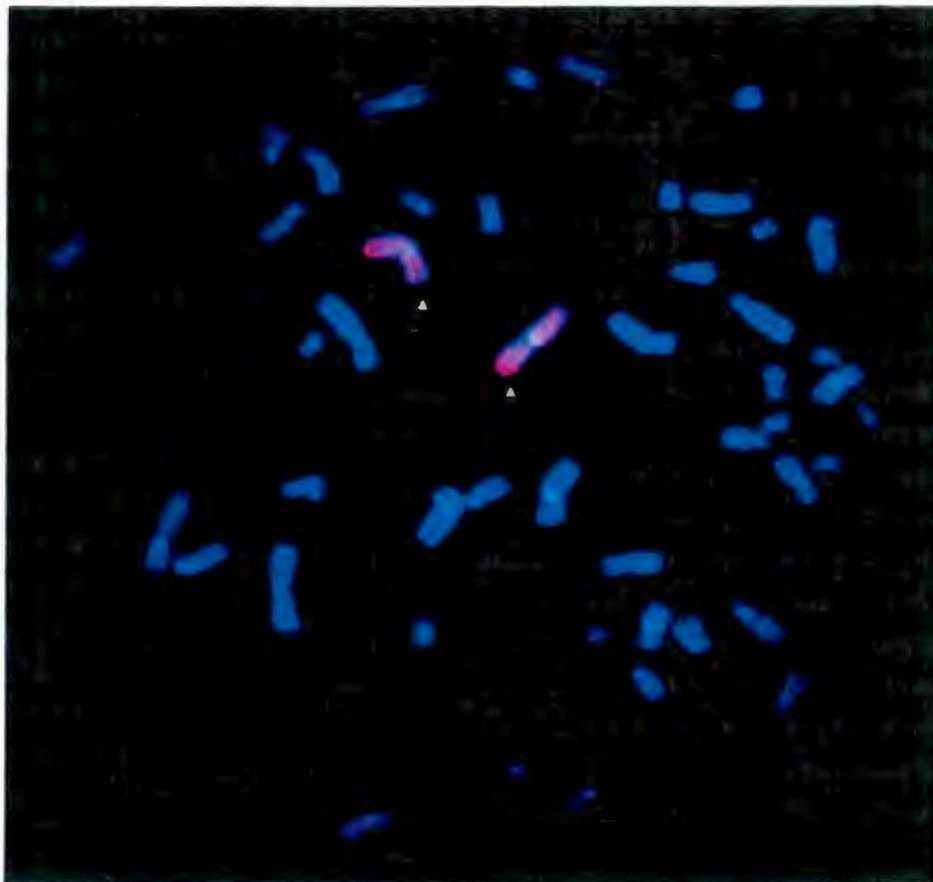


Figura 10. Cariotipo de la línea linfoblastoide AF-D2 (PD 20) clona 2. 47,XY,del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),add(4)(p?),inv(6)(?),inv(7)(p15.2q11.2),-8,dup(13)(q?),der(22 q?),+mar1,+mar2



**Figura 11.** FISH de la línea linfoblastoide AF-D2 (PD 20). La tinción completa del cromosoma 1 confirma que el material deletado no se encontró rearreglado en ningún otro cromosoma.

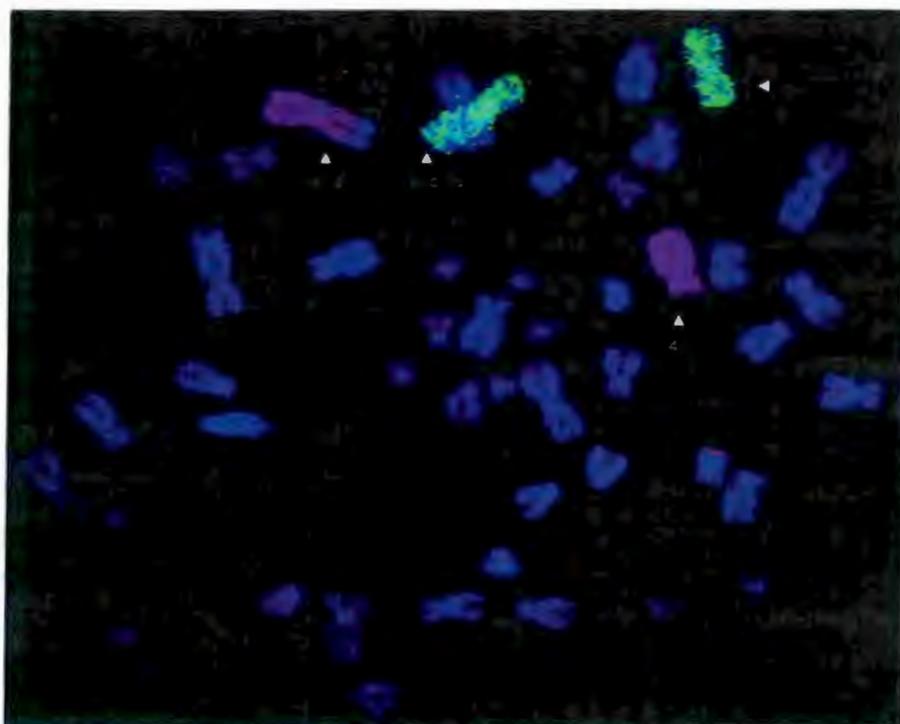


Figura 12. FISH de la línea linfoblastoide AF-D2 (PD 20). La tinción completa para los cromosomas 3 (verde) y 4 (rojo) confirma la duplicación 3q y que efectivamente el cromosoma add(4p+) se trata de un der(4).

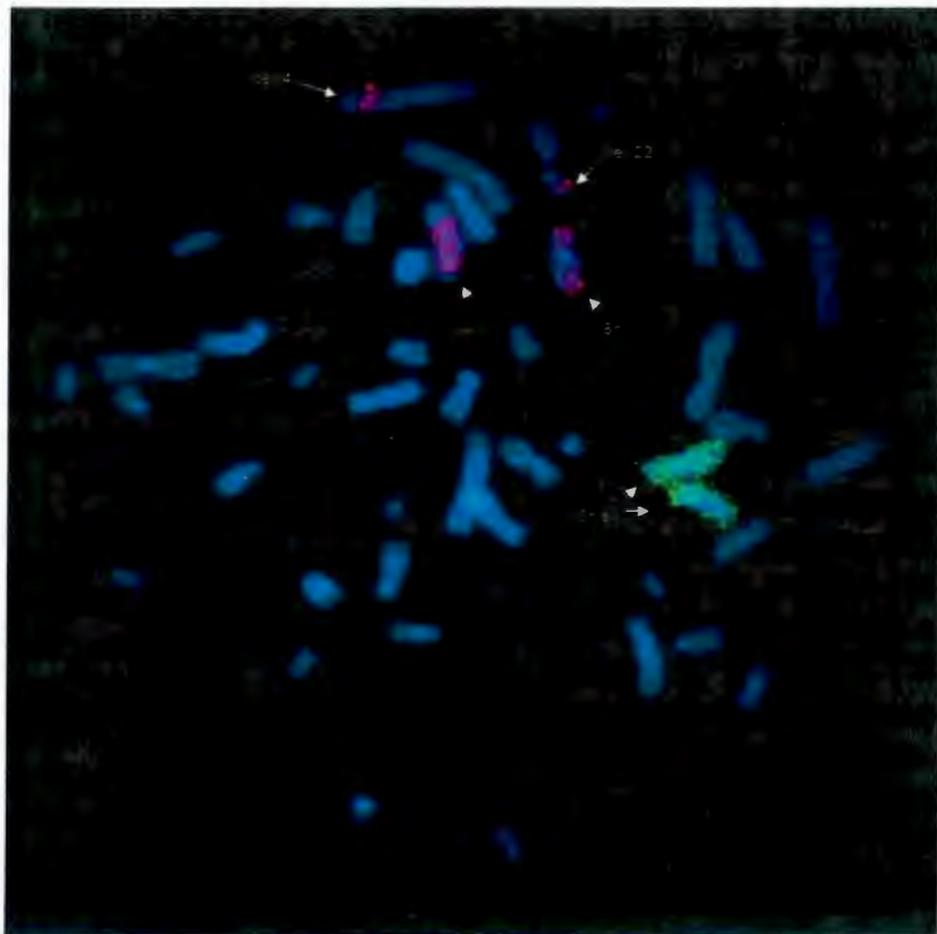


Figura 13. FISH de la línea linfoblastoide AF-D2 (PD 20). La tinción completa para los cromosomas 6 (verde) y 8 (rojo) indican que el mar 1 es un der(8) con material extra de origen desconocidos en pter y qter, el der(4) tiene una inserción de material genético del cromosoma 8 y el der(22) también tiene un rearreglo con el cromosoma 8 en su región distal. El cromosoma 6 invertido no presenta material extra ni esta involucrado en otro rearreglo.

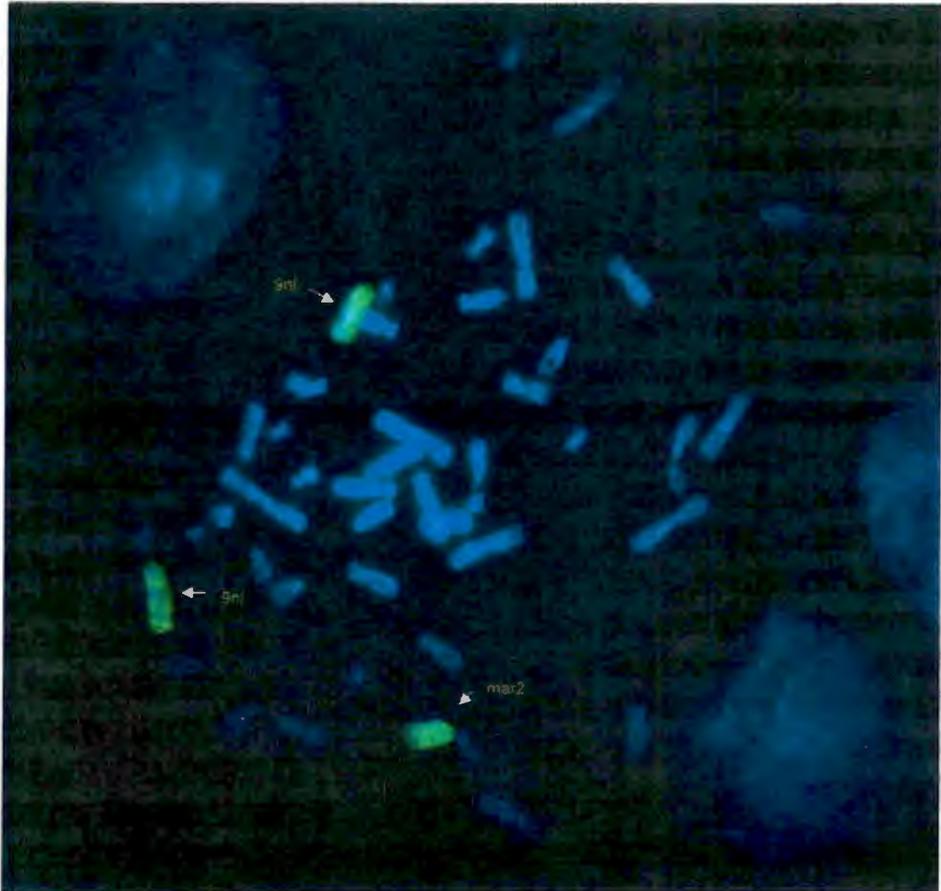


Figura 14. FISH de la línea linfoblástoide AF-D2 (PD 20). La tinción completa para el cromosoma 9 (verde) señala el par cromosómico 9 normal y el marcador 2 que no hibrida completamente para la sonda del cromosoma 9.

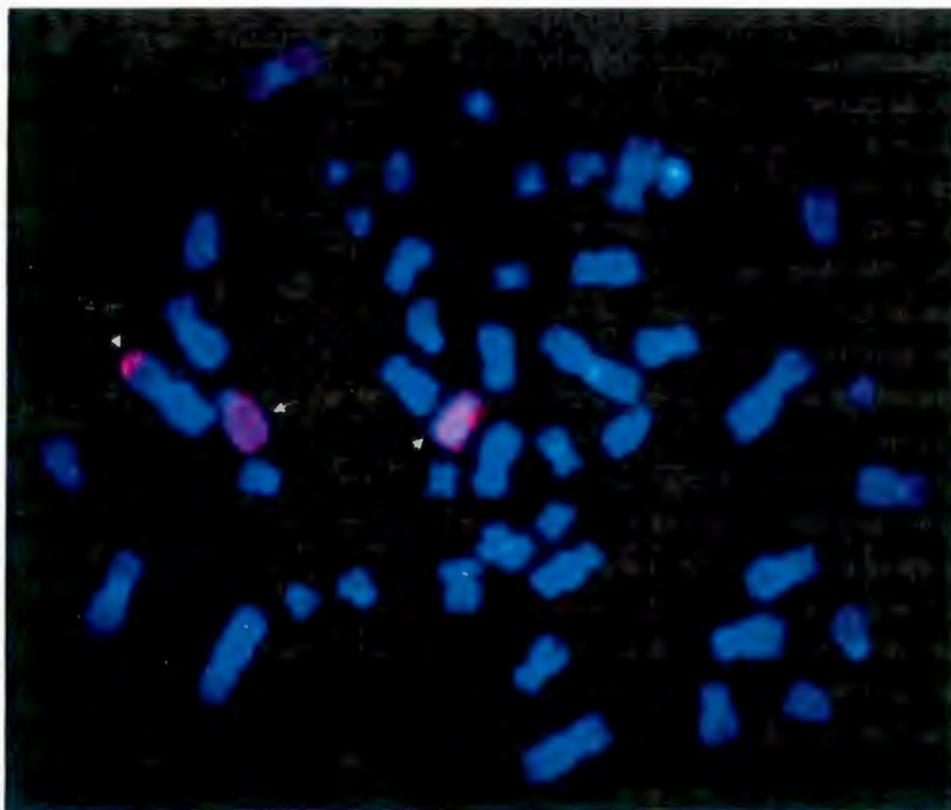


Figura 15. FISH de la línea linfoblastoide AF-D2 (PD 20). La tinción completa para el cromosoma 13 (rojo) muestra que el cromosoma der(4) tiene translocado un segmento del cromosoma 13 y el dup(13) efectivamente solo presenta duplicación del mismo cromosoma.

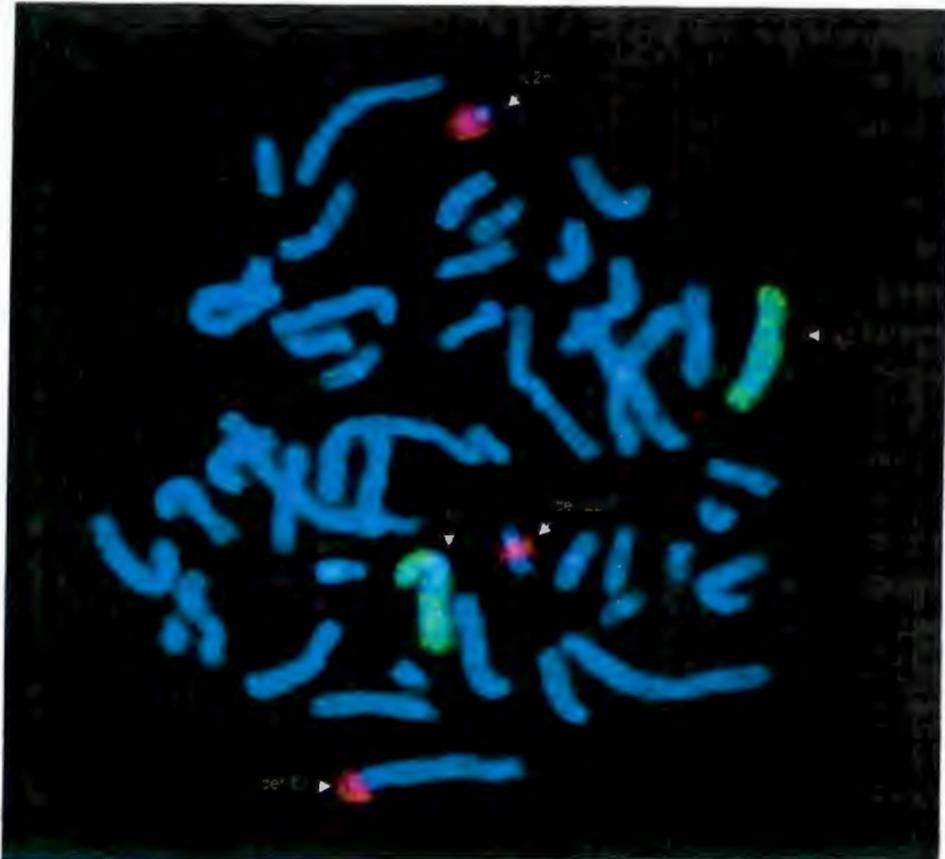


Figura 16. FISH de la línea linfoblastoide AF-D2 (PD 20). La tinción completa para los cromosomas 6 (verde) y 22 (rojo) muestra que el der(8) tiene material extra del cromosoma 22 en el brazo largo y el der(22) a su vez está translocado con el cromosoma 8. Se muestran los cromosomas 6 sin alteraciones.

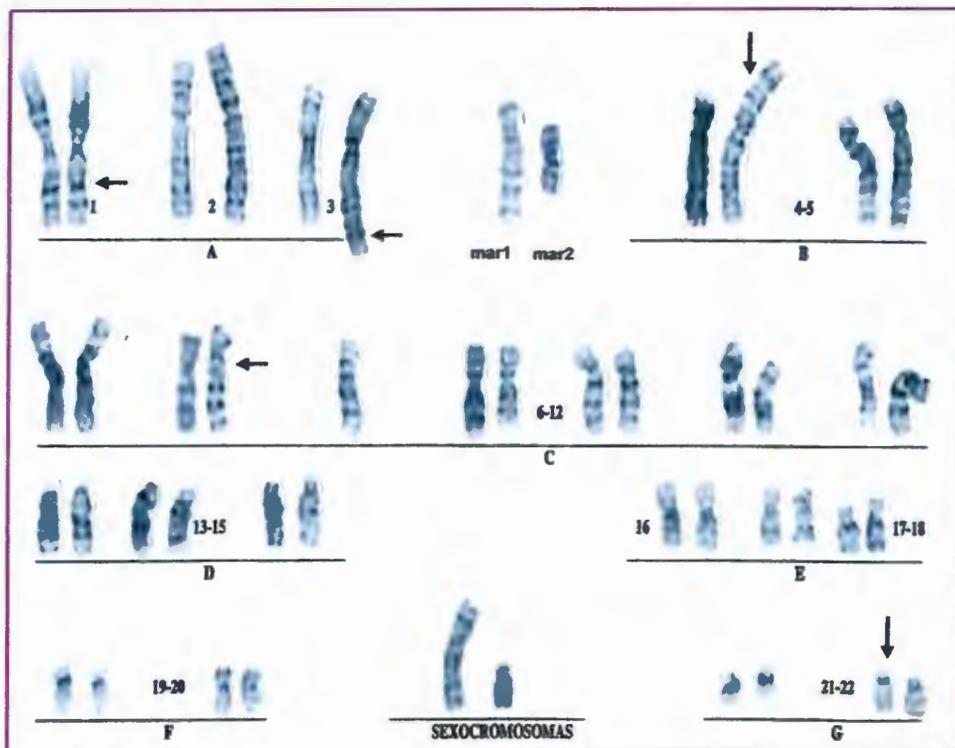


FIGURA 17. Cariotipo final de la línea linfoblastoide AF-D clona 1.  
 47,XY.ish del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),der(4)t(4;8;13)(p16;?;?),  
 inv(7)(p15.2q11.23),der(8)t(8;22;?(q22;q12;?)),+der(9)(pter-cen-22::?),  
 der(22)t(8;22)(p22;q12)(wcp1+,wcp3+,wcp4+,wcp8+,wcp9+,wcp22+)

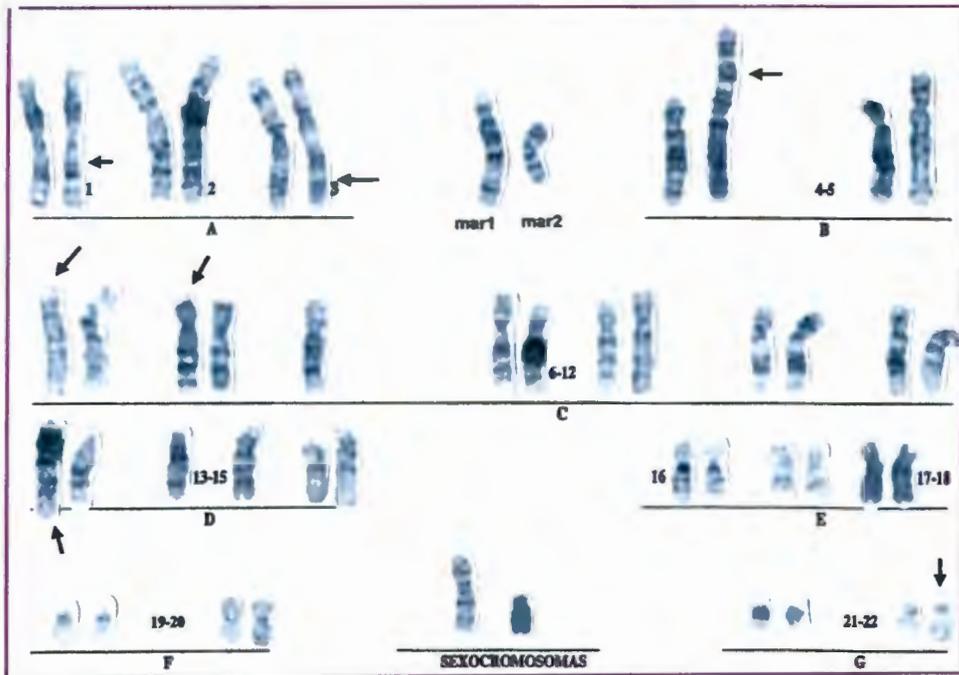


FIGURA 18. Cariotipo final de la línea linfoblástoide AF-D clona 2.

47,XY,ish del(1)(q23q25),dup(3)(q22q26),der(4)t(4;8;13)(p16;?;?),  
 dup(13)(q14q22),inv(6)(p23q13?),inv(7)(p15.2q11.23),der(8)t(8;22;?(q22;q12;?)  
 ,+der(9)(pter-cen-22::?),der(22)t(8;22)(p22;q12)  
 (wcp1+,wcp3+,wcp4+,wcp8+,wcp9+,wcp6+,wcp13+,wcp22+)

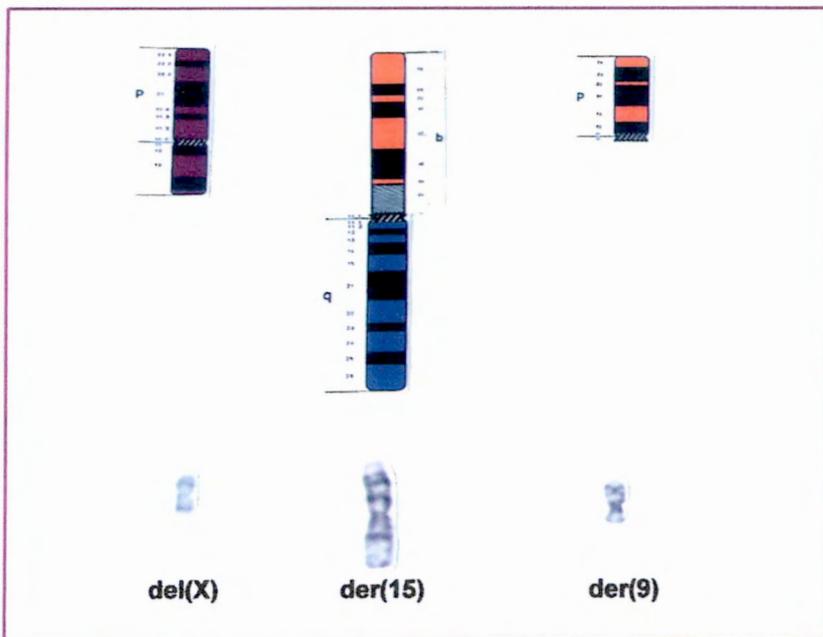


FIGURA 19. Representación esquemática de los diferentes rearrreglos cromosómicos en AF-A

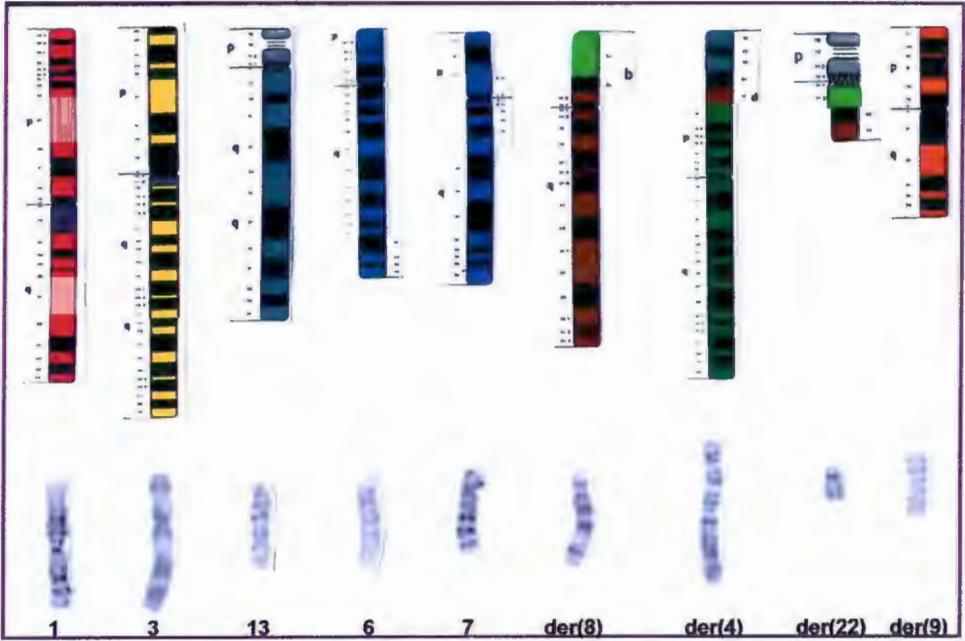


FIGURA 20. Representación esquemática de los diferentes rearrreglos cromosómicos en AF-D2

## VII. DISCUSIÓN

En este estudio se determinó el cariotipo de las líneas linfoblastoides AF-A (HCS 72), AF-D2 (PD 20) y el de una línea normal con el fin de llevar un registro sobre la evolución clonal de las líneas conservadas en el laboratorio de citogenética del Instituto Nacional de Pediatría.

Hace 4 años en el laboratorio se obtuvo el cariotipo por primera vez con bandas GTG de la línea AF-A y se encontró una sola línea celular con un número modal de 48 cromosomas, monosomía de X, trisomía 12, trisomía 19 y un marcador cromosómico (48,X,-X,+12,+19,+mar). Un estudio posterior realizado en el año 2002 igualmente con bandas GTG reportó la presencia de dos clonas celulares, una con un número modal de 48 cromosomas con complemento sexocromosómico X, monosomía X, trisomía 12, trisomía 19 y un marcador al parecer con aspecto de un isocromosoma Xp, en 11 metafases. La segunda clona presentó un número modal de 48 cromosomas con complemento sexocromosómico X, monosomía X, un cromosoma 9p+, trisomía 12, monosomía 15, trisomía 19, el marcador referido en la primer clona más un segundo marcador no descrito.

En este estudio se analizó nuevamente el cariotipo con bandas GTG y se encontró, gracias a ésta técnica complementada con la de FISH la descripción citogenética completa del cariotipo de la línea AF-A (HSC 72). La línea presentó 2 clonas celulares, el marcador reconocido anteriormente como mar1 perteneció a una del(X)(21.1) y el mar2 a un cromosoma der(9) originado por una translocación entre los cromosomas 9/15. Gracias a este estudio y a los hallazgos encontrados anteriormente se determinó que la línea AF-A (HSC 72) originó una segunda clona celular por la aparición de un cromosoma 15 derivativo resultado de una translocación de un cromosoma 9 con un cromosoma 15 y un marcador cromosómico. No se sabe si con el tiempo se originarán otras clonas ó una clona celular nuevamente con estas características ó que ocurran nuevos cambios que originen subsecuentes clonas.

En la línea AF-D2 (PD 20) no se contaban con antecedentes de estudios anteriores pero por los hallazgos encontrados en este estudio se observó un cariotipo más complejo. Esta línea presentó una deleción: en el cromosoma 1q; dos duplicaciones: una en un cromosoma 3q y otra en el cromosoma 13q; cuatro cromosomas derivativos: los cromosomas 4, 8, 9 y 22 y dos inversiones pericéntricas: en los cromosomas 6 y 7.

Una observación importante es que entre las dos líneas analizadas la diferencia en cuanto al número de rearrreglos cromosómicos encontrados no es muy diferente, es más los dos rearrreglos cromosómicos registrados de más en la segunda línea no involucran a otros cromosomas si no que son rearrreglos de los mismos. Ahora, si partimos de la hipótesis de que dichos rearrreglos son el resultado de la inestabilidad cromosómica propia del síndrome producidos al transcurrir el tiempo hubiera sido muy interesante saber el cariotipo original de

esta línea ya que muchos rearrreglos pudieron haberse producido por esta característica. U otra posibilidad sería que las continuas divisiones celulares que sufre la línea mientras se mantienen en cultivo motive a nuevos rearrreglos cromosómicos a originarse, o sea, eventos *in vitro*; de manera que entre más tiempo se mantenga una línea bajo estas condiciones más se van a ir generando cambios estructurales y hasta selección de clonas *in vitro*.

Es por ello que uno de los objetivo a futuro de este estudio es seguir realizando la caracterización de los cariotipos en estas líneas en tiempos determinados, con el fin de observar si la inestabilidad cromosómica propia de las líneas aumenta viéndose reflejada en el nuevo número de rearrreglos u origen de nuevas clonas llegando posiblemente a revertir con estos eventos los fenotipos celulares. Evento muy importante ya que cabe mencionar que estas líneas son distribuidas, estudiadas a nivel mundial y son la base principal de los estudios de Anemia de Fanconi.

En la literatura son muy escasos los trabajos referentes a los cariotipos de las líneas linfoblastoides de AF.

Uno de los primeros reportes realizados en México fue el realizado por el Dr. Lisker en 1974, quien reportó el caso de una niña con AF con un cariotipo de 46,XX,Dq+. Otro investigador en estudiar el tema fue Von Koskull que 1973 propone la región 3q27 como punto de ruptura preferencial en linfocitos cultivados de AF.

Berger, posteriormente en 1980 hace referencia al análisis de cariotipo pero en médula ósea de tres niños AF con estados leucémicos y pre-leucémicos, reportando: una dup(1), una trip(3) y una del(7). Para el segundo paciente, una dup(2) y un brazo corto extra del cromosoma 4. Finalmente en el tercer paciente una monosomía del cromosoma 21 mas un marcador cromosómico. Concluye que en un periodo pre-leucemico largo aunado a anomalías cromosómicas clonales en pacientes con AF es muy posible el desarrollo de leucemia aguda y que todas estas ocurrencias, aunque parezcan raras, son muy comunes en las leucemias que podrían, de algún modo, estar relacionadas a la alta incidencia de rompimientos cromosómicos en AF. Y propone que un posible origen de las duplicaciones encontradas en su estudio pudo ser por un rompimiento seguido por un replicación anormal de parte del cromosoma o por un entrecruzamiento asimétrico dando como resultado un tipo de amplificación cromosómica.

En 1988 Huret describe la evolución del cariotipo en médula ósea de un paciente con AF. En un primer estudio reportó un cariotipo con  $-6,+der(6)t(1;6)$  y dos años después  $-6,+der(1;6),-2,+der(2)t(1;2)$ .

Posteriormente en 1993 vuelve a realizar otro trabajo con la médula ósea de 5 pacientes, partiendo de la idea que las anomalías clonales son más frecuentes en pacientes AF leucémicos. Esta vez encuentra en uno paciente una trip(1) y un marcador, en el segundo una monosomía 7, en el tercero un add(1) y una del(7) y en los dos pacientes restantes una monosomía del cromosoma 5 y 21

respectivamente. Esta vez concluye que la evolución de AF a leucemia mielocítica es del 15% y asoció el desarrollo de la leucemia con anomalías en los cromosomas 1, 7 y rearrreglos en la banda p25 del cromosoma 6.

Estudios posteriores en la misma década solo hacen referencia de casos encontrados y se reportan como casos únicos. Tal es el caso de Kokalj-Vokac quien observó una t(X;15)(q23;q25) durante la investigación del establecimiento de una línea linfoblastoide de una paciente con AF.

Otro caso es el de Maarek que en 1996 estudia a 20 pacientes con AF y encuentra anomalías del cromosoma 7 en nueve pacientes (monosomía, isocromosoma y otros rearrreglos estructurales) y en cuatro, rearrreglos del cromosoma 1.

Con el tiempo, gracias al desarrollo de las técnicas moleculares como el FISH y a la creación de sondas que hibridan en regiones específicas de los cromosomas o en su totalidad, fue más fácil el estudio de los cariotipo complejos observados en las líneas linfoblastoides.

Tal fue el caso de Sakamoto quien en 1995 realizó un estudio con fibroblastos transformados y fibroblastos primarios de pacientes con AF y Ataxia Telangiectasia encontrando que los fibroblastos transformados tienen frecuencias más altas de desarrollar aberraciones cromosómicas que los fibroblastos primarios, con estos hallazgos aplica la técnica de FISH con sondas de cDNA para los cromosomas 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 14, 19, 20 y X. Sus resultados mostraron que los niveles de translocaciones fueron más elevados cuando hibridaba con el cocktail de sondas 1, 14 y 19 que cuando hibridaba con 2, 4 y 8. Este estudio abre una línea de investigación muy importante pues propone que las translocaciones no se dan al azar entre cromosomas y que parece ser que las aberraciones se originan por la misma transformación celular la cual tiene un efecto en el ambiente celular la cual permite altas tasas en cuanto a frecuencia de aberraciones. Es decir, el número de rearrreglos cromosómicos aumentan significativamente después de las células AF, en este caso, han sido inmortalizadas.

Tal hallazgo sugiere realizar el cariotipo de las líneas antes y después de la inmortalización, con el fin de observar la potencialización del daño para cada línea, la cual debe ser diferente en cuanto a nivel de daño y respuesta debido a la heterogeneidad genética característica de la enfermedad con el fin de observar que tanto este cambio puede afectar tanto al genotipo como al fenotipo inicial de la línea.

En el caso de las líneas inmortalizadas con el VEB en el INP no está reportado en la literatura algún efecto adverso en cuanto a las tasas de aberraciones cromosómicas al contrario de lo que se reporta con el virus SV40.

Como se ha podido observar son muy escasos los estudios de los cariotipos de las líneas linfoblastoides y con resultados muy variables. La mayoría de los estudios se realizan en médula ósea y cuando los pacientes ya están en un estado pre-leucémico. Motivo que también apoya este estudio ya que llevando un

seguimiento de los cambios que ocurren en el mantenimiento de una línea linfoblastoide de uno u otro modo se pueden predecir los cambios que puede sufrir la línea original.

Otro aspecto importante de mencionar es que los estudios en los que se han realizado la caracterización del cariotipo de pacientes con AF realizados directa o indirectamente, no se menciona el grupo de complementación al que pertenecen por lo que no se puede hacer una comparación de los datos encontrados. La única observación que se pudo hacer es que en los estudios antes mencionados la mayoría de los autores reportan duplicaciones de regiones específicas de cromosomas, estas duplicaciones en éste caso, pudieron haberse generado por una recombinación desigual por la incrementada inestabilidad cromosómica propia de las líneas linfoblastoides con las continuas divisiones celulares que sufrieron durante su mantenimiento *in vitro*.

Además de que en este estudio no se encontró relación en cuanto a los hallazgos encontrados citogenéticamente con la localización cromosómica de los genes clonados ni para AF-A y AF-D2.

## VIII. CONCLUSIONES

- Este estudio se propone como un paso inicial para una correlación y control de los cambios que ocurren en este tipo de líneas debido a su inestabilidad cromosómica y heterogeneidad genética durante su mantenimiento (transformación, congelación y descongelación).
- Es importancia mantener las características iniciales de la línea ya que pertenecen a un fenotipo particular y cualquier cambio producido en su genotipo puede cambiar este fenotipo cambiando totalmente los resultados esperados.
- Las técnicas de citogenética clásica y molecular permiten caracterizar citogenéticamente las líneas linfoblastoides de forma precisa y confiable.
- El uso de metodologías como SKY y CGH serían de gran utilidad para determinar todos los desbalances cromosómicos no detectados como en la línea AF-D2.
- Este estudio representa un paso muy importante para obtener una adecuada correlación y control del cariotipo de las líneas linfoblastoides de AF a largo plazo.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- ◆ Alter B. (1999). Clinical features and diagnosis of Fanconi's Anemia. In: Schrenzenmeier H. and Bacigalupo A. Aplasic Anaemia. Cambridge University Press. U.K.
- ◆ Balin A, Goodman D, Rasmussen H and Cristofalo V. Oxigen-sensitive stages of the cell cycle of human diploid cells. *J. Cell Biol.* 1978. 78:390-400.
- ◆ Berger R, Le Coniat M, and G Schaison. Chromosome abnormalities in bone marrow of Fanconi Anemia patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993. 65:47-50.
- ◆ Berger R, Bernheim A, Le Coniat M, Vecchione D and G Schaison. Chromosomal studies of leukemic and preleukemic Fanconi's Anemia Patients. *Human Genetics.* 1980. 56:59-62.
- ◆ Buchwald M and E Moustacchi. Is Fanconi anemia caused by a defect in the progressing of DNA damage?. *Mutat Res.* 1998. 408:75-90.
- ◆ Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, Van Weel-Sipman M, Havenga Ch, Morgan N, Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, De Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckman E and CG Mathew. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi Anemia. *Blood.* 2000; 96: 4064-4070
- ◆ De Winter J, Waisfisz Q, Rooimans M, Van Berkel C, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk J, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M and H Joenje. The Fanconi Anemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nature Genet.* 1998. 20:281-283.
- ◆ De Winter J, Léveillé F, Van Berkel C, Rooimans M, Van del Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan N, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater P, Waisfisz Q, Kamatsu K, Arwert F, Pronk J, Mathew C, Digweed M, Buchwald M and H Joenje. Isolation of a cDNA representing the Fanconi Anemia complementation group E gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2000a. 67:1306-1308.
- ◆ De Winter J, Rooimans M, Van del Weel L, Van Berkel C, Alon N, Bosnoyan-Collins L, De Grut J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk J, Arwert F, Mathew C, Scheper R, Hoatlin M, Buchwald M and H Joenje. The Fanconi Anemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nature Genet.* 2000b. 24:15-16.
- ◆ Dolcetti R and M Masucci. Eptein-Barr Virus: induction and control of cell transformation. *J. of Cell. Phys.* 2003. 196:207-218.

- ◆ Duckworth-Rysiecki G, Hulthen M and MR Taylor. Clinical and cytogenetic diversity in Fanconi's Anemia. *Journal of Medical Genetics*. 1984. 21:197-203.
- ◆ Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux A, Buriat D and M Prieur. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi Anemia. *Human Genetics*. 1982. 62: 327-332.
- ◆ Huret J, Tanzer J, Guilhot F, Frocraïn-Herchkovitch C and J Savage. Karyotype evolution in the bone marrow of a patient with Fanconi anemia: breakpoints in clonal anomalies of this disease. *Cytogenet Cell Genet*. 1988; 48 (4): 224-7.
- ◆ ISCN, 1995. An International System for Human Cytogenetics Nomenclature. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 114 pp.
- ◆ Gomez L. 2003. Efecto de la mitomicina-C, la hidroxihurea y el plasma humano normal en la síntesis de ADN de linfocitos de pacientes con Anemia de Fanconi. Tesis de Maestría. Maestro en Ciencias Biología Celular. Facultad de Ciencias. México. 75 pp.
- ◆ Groux H, Cottrez F, Montpellier C, Quatannens B, Coll J, Stehelin D and C Auriault. Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr Virus. *Blood*. 1997. 89:(12). 4521-4530.
- ◆ Joenje H and K Patel. The emerging genetic and molecular basis on Fanconi Anemia. *Nature Reviews Genetics*. 2001. 2: 446-457
- ◆ Kokalj-Vokac N, Saint-Ruf C, Lefrancois D, Viegas-Pequignot E, Lemieux N, Malfoy B and B Dutrillaux. A t(X;15)(q23;q25) with Xq reactivation in a lymphoblastoid cell line from Fanconi Anemia. *Cytogenet Cell Genet*. 1991; 57(1): 11-5.
- ◆ Kruyt F, Dijkmans L, Van Den Berg T and H Joenje. Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood*. 1996. 87:938-948.
- ◆ Kupfer G and D'Andrea, A. 1996. The effect of the Fanconi Anemia polypeptide, FAC, upon p53 induction and G<sub>2</sub> checkpoint regulation. *Blood*. 88: 1019-1025.
- ◆ Maarek O, Jonveaux P, Le Coniat M, Derre J and R Berger. Fanconi Anemia and bone marrow clonal chromosome abnormalities. *Leukemia*. 1996. Nov; 10 (11) : 1700-4.
- ◆ Meetei A, De Winter J, Medhurst A, Wallisch M, Waisfisz Q, Van de Vrugt H, Oostra A, Yan Z, Ling C, Bishop C, Hoatlin M, Joenje H and W Wang. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*. 2003. Oct. 35(2):165-70.

- ◆ Molina B. 1998. Aislamiento del factor de corrección de las aberraciones cromosómicas en Anemia de Fanconi, por medio de fraccionamiento del plasma humano. Tesis de Maestría. Maestro en Ciencias Biología Celular. Facultad de Ciencias. México. 63 pp.
- ◆ Mrózek K and C Bloomfield. 1997. Chapter: Chromosome aberrations. In E. Pediatric Cancer Vol 1. Academic Press Inc. 381-391 pp.
- ◆ Pronk J, Gibson R, Savoia A, Wijker M, Morgan N, Melchionda S, Ford D, Temtamy S, Ortega J, Jensen S, Havenga C, Cohn R, de Ravel T, Roberts I, Westerveld A, Easton D, Joenje H, Mathew G and F Arwert. Localization of the Fanconi Anemia group A gene to chromosome 16q24.3. *Nature Genet.* 1995. 11:338-340.
- ◆ Rathbun K, Faulkner G, Ostroski M, Christianson T, Hughes G, Jones G, Cahn R, Maziarz R, Royle G, Keeble W, Heinrich M, Grompe M, Tower P and G Bagby. Inactivation of the Fanconi anemia group C gene augments interferon- $\gamma$ -induced apoptotic responses in hematopoietic cells. *Blood.* 1997. 90:974-985.
- ◆ Razo G. 1998. Detección del daño espontáneo e inducido al ADN por medio de electroforesis unicelular en células de Anemia de Fanconi y de Ataxia Telangiectasia. Tesis de Licenciatura. Biólogo.
- ◆ Ridet A, Guillof E, Duchaud E, Cundari E, Fiore M, Moustacchi E and F Rosselli. Deregulated Apoptosis is a hallmark of Fanconi anemia syndrome. *Cancer Research.* 1997. 57:1722-1730.
- ◆ Rosselli F, Saceau J, Wietzerbin J y E Moustacchi. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia: I. Involvement of interleukin-6. *Human Genetics.* 1992. 89:42-48.
- ◆ Roselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J and E Moustacchi. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia: II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha. *Blood.* 1994. 83:42-48.
- ◆ Saito H, Hammond A and R Moses. Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells. *Mutat Res.* 1993. 249:127-132.
- ◆ Sakamoto ET, Van Diemen PCM, Darroudi F and AT Natarajan. Spontaneous chromosomal aberrations in Fanconi Anemia, ataxia telangiectasia fibroblast and Bloom's syndrome lymphoblastoid cell lines as detected by conventional

cytogenetic analysis and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. *Mutation Research*. 1995. 334:59-69.

- ◆ Sasaki R and A. Tomomura. A high susceptibility to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi Anemia cells. *Mutat Res*. 1993. 249: 1829-1836.
- ◆ Schindler D and H Heohn. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Human Genetics*. 1998. 43: 429-435.
- ◆ Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S and T Schroeder-Kurth. Comparative evaluation of diepoxibutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood*. 1995. 85:2233-2237.
- ◆ Schroeder T, Anschütz F and A Knopp. Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy. *Human Genetics*. 1964. 1:194-196.
- ◆ Strathdee C and M Buchwald. Molecular and cellular biology of Fanconi Anemia. *The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 1992. 14(2):177-185.
- ◆ Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Raifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea A, Moses R and M Grompe. Positional cloning of a novel Fanconi Anemia gene, FANCD2. *Mol Cell*. 2001. 7:241-248.
- ◆ Voet D and J Voet. 1990. *Biochemistry*. John Wiley & Sons. U.S.A. 1250 pp.
- ◆ Yamashita T, Barber D, Zhu Y, Wu N and A D'Andrea. The Fanconi Anemia polypeptide FACC is localized to the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. 91:6712-6716.
- ◆ Zakrzewski S and K Sperling. Antagonistic effect of cocultivation on MMC induced aberration rate in cells of patient with Fancori's Anemia. *Human Genetic*. 1980. 56:85-88.