

Análisis de roturas cromosómicas en un paciente con sospecha clínica de anemia de Fanconi

Chromosomal breakage analysis in a patient with presumptive diagnosis of Fanconi anemia

Lic. Reinaldo Gutiérrez Gutiérrez^I, Dra. Yohandra Calixto Robert^{II}, DraC. Judith Pupo Balboa^I, Téc. Luanda Maceira Rosales^I, Lic. Denia Tasé Vila^{II}, Lic. Gretel Riverón Forment^I

^I Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^{II} Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez". La Habana, Cuba.

RESUMEN

La anemia de Fanconi (AF) es un síndrome de inestabilidad cromosómica caracterizado por diversos rasgos dismórficos, pancitopenia progresiva y predisposición a neoplasias hematológicas. El ensayo de sensibilidad a la mitomicina C (MMC) proporciona un marcador celular único para el diagnóstico de la enfermedad. Con el objetivo de introducir este ensayo de roturas cromosómicas, se aplicó la técnica en dos muestras procedentes de un paciente con sospecha clínica de AF y un sujeto control. Las muestras de sangre periférica fueron cultivadas según los protocolos establecidos para los estudios citogenéticos. Se prepararon cuatro frascos de cultivo por cada muestra. A uno de ellos se le añadió solo cloruro de sodio (cultivo control) y a los restantes se les añadieron concentraciones crecientes de MMC (50, 150 y 300 nM). Fueron analizadas cincuenta metafases por cada frasco. La exposición de los linfocitos del paciente a todas las concentraciones de MMC provocó diferencias significativas en el número de células con roturas cromosómicas respecto a la misma exposición en el control ($p < 0,005$). Se comprobó el éxito del ensayo teniendo en cuenta que a 300 nM en el control sano solo aparece el 32 % de células con roturas. Es interesante resaltar que en la muestra del paciente a la concentración más elevada, se apreció la presencia de 2 líneas celulares, una con pocas o ninguna rotura (38 %) similar a las que aparecen en las células no-AF; y otra con múltiples roturas (62 %) típicas de las células AF. Esto indicó la presencia de mosaicismo somático en los linfocitos T del paciente. De acuerdo con los resultados obtenidos se confirmó la sospecha

clínica de que se trata de un paciente AF, por la hipersensibilidad a la acción de la MMC que presenta mosaicismo somático en linfocitos T.

Palabras clave: anemia de Fanconi; mitomicina C; rotura cromosómica; mosaicismo somático.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a chromosomal instability syndrome characterized by various dysmorphic features, progressive pancytopenia and predisposition to hematological malignancies. The assay sensitivity to mitomycin C (MMC) provides a unique cell marker for the diagnosis of the disease. In order to introduce this chromosomal breakage test the technique was applied in two samples from a patient with clinical suspicion of AF and a control subject. Peripheral blood samples were cultured by protocols established for cytogenetic studies. Four flasks were prepared for each sample culture. Only sodium chloride was added to one of the flasks (control) and to the remaining flasks increasing concentrations of MMC (50, 150 and 300 nM) were added. Fifty metaphases were analyzed for each bottle. Exposure of lymphocytes from the patient at all concentrations of MMC caused significant differences in the number of cells with chromosome breaks with respect to the same exposure in the control ($p < 0.005$). Assay success was proved considering that in 300 nM in healthy control only 32 % shows cell breakage. It is interesting to remark that in the patient sample with highest concentration, the presence of two cell lines were observed, one with little or no breakage (38 %) similar to those found in no-F cells and other with multiple breaks (62 %), typical of AF cells. These results indicated the presence of somatic mosaicism in patient's T lymphocytes. The results obtained confirmed the clinical suspicion that this is an AF patient, due to the hypersensitivity to the action of MMC and the presence of somatic mosaicism in T lymphocytes.

Keywords: Fanconi anemia, mitomycin C, chromosomal breakage, somatic mosaicism.

INTRODUCCIÓN

La anemia de Fanconi (AF) es un síndrome de inestabilidad cromosómica caracterizado por pacientes con baja estatura, fallos a nivel de la médula ósea y un alto riesgo de desarrollar tumores malignos.¹ Esta enfermedad se produce por mutaciones en uno de los 15 genes de los grupos de complementación de la AF (FANCA al FANCP). Presenta un patrón de herencia autosómico recesivo en todos los subtipos, con excepción del FA-B, que es ligado al cromosoma X.² Las manifestaciones clínicas en la AF son muy variables; algunos de los síntomas pueden solaparse con los observados en otros síndromes.³ Este fenotipo tan variable hace que el diagnóstico exacto sobre la base de las manifestaciones clínicas sea muy difícil en algunos pacientes.⁴ Las células derivadas de pacientes con AF deben presentar, de forma inequívoca, una hipersensibilidad a las roturas cromosómicas inducidas por agentes de entrecruzamiento del ADN, tales como la mitomicina C (MMC), el diepoxibutano (DEB) o el cisplatino.⁵

En el presente trabajo se reporta como el primer caso estudiado en el Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), donde se empleó el estudio de roturas cromosómicas inducidas por MMC, para confirmar la sospecha clínica de AF.

MÉTODOS

El estudio de roturas cromosómicas inducidas por MMC se realizó en cultivos de linfocitos de sangre periférica. Fueron procesadas dos muestras: una de un paciente de 4 años con sospecha clínica de AF, atendido en la consulta de referencia de genética clínica del Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez". La segunda, denominada muestra control, de una niña de la misma edad, aparentemente sana, no relacionada con el caso, con buenos antecedentes de salud. Se llenó un cuestionario para recolectar información relacionada con los hábitos dietéticos y se indagó sobre la exposición a agentes químicos y físicos en el mes anterior al estudio.

Antes de realizar el estudio los padres de ambos niños fueron consultados y dieron su consentimiento informado por escrito para la realización del ensayo.

Ensayo de sensibilidad a la MMC

El ensayo de hipersensibilidad se realizó según lo descrito por Oostra AB y col en 2012.⁶ Se extrajeron 5 mL de sangre venosa en una jeringuilla heparinizada. Los cromosomas extendidos se obtuvieron a partir de linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina, cultivados por 72 horas, según las técnicas estandarizadas en el Laboratorio de Citogenética del CNGM.

Se prepararon cuatro frascos de cultivos por cada muestra. En uno fueron añadidos 50 mL de cloruro de sodio (NaCl) como control del experimento. En el resto de los frascos se añadieron concentraciones crecientes de MMC (50, 150 300, nmol/L) para verificar el efecto de las distintas concentraciones del agente intercalante MMC para inducir aberraciones cromosómicas.

Para determinar el número de aberraciones por célula fueron analizadas al microscopio, como mínimo, 50 metafases por cada frasco de cultivo (los tratados con MMC y sin tratar).

Para la evaluación final todas las aberraciones fueron convertidas en "eventos de roturas", el cual representa el principal tipo de aberración en las células AF. Las roturas de cromátidas (*gaps*) y las roturas cromosómicas, fueron contadas como eventos de roturas simples, mientras que las tri- y las cuatrirradales fueron consideradas como eventos de dos roturas cada uno. Otras figuras de intercambio fueron convertidas en el mínimo de roturas requeridas para su reconstrucción teórica. La cantidad de metafases aberrantes y normales también fueron anotadas para cada cultivo. Posteriormente, los eventos de roturas cromosómicas inducidas por MMC se compararon con el cultivo control; y los eventos de roturas provenientes del cultivo del paciente se compararon con el control sano. La diferencia entre el número de aberraciones encontradas en los cultivos del paciente y del control sano se determinó comparando los porcentajes de metafases aberrantes mediante la prueba de Chi-cuadrado, con un nivel de significación del 95 % según el programa STATISTICA 6.0.

RESULTADOS

En la [figura 1](#) se muestran ejemplos de los tipos de aberraciones observadas en el estudio. Como resultado de la exposición de los cultivos al NaCl, se provocaron como promedio 0.18 roturas cromosómicas por célula en el caso y 0,02 en el control ([Fig. 2](#)). La [figura 3](#) muestra un mayor número de metafases con aberraciones cromosómicas (12 %) en el paciente en comparación con el control sano (2 %).



Rta: rotura; Tra: trirradial; Cra: cuatrirradial; InC: intercambio

Fig. 1. Ejemplos de aberraciones cromosómicas observadas en los linfocitos del paciente con sospecha clínica de anemia de Fanconi, después del tratamiento con mitomicina C.

A partir de los 50 nmol/L de MMC, en los cultivos derivados del paciente se apreció un incremento significativo en los eventos de roturas cromosómicas por célula, de 1,6 en comparación con el 0,16 observado en el control sano ($p < 0,005$), así como en el porcentaje de células con roturas (50 vs 2 %). Este comportamiento se mantiene a la concentración de 150 nmol/L, tanto en las roturas por células (2,6 vs 0,16) como en el porcentaje de células con roturas (60 vs 16 %) ($p < 0,005$). A la concentración máxima de exposición se apreció que el 90 % de las metafases del paciente presentaban roturas cromosómicas, valores que se diferencian de las metafases del control sano, donde solo apareció el 32 % de roturas ($p < 0,005$). Igualmente, a esta concentración se observó un incremento de la media de roturas por célula en el paciente (5,9) en comparación con el 0,32 del control sano. Como se muestra en la [figura 3](#), las células típicas AF, aquellas que presentan múltiples roturas (≥ 5 roturas/célula), comenzaron a aparecer a partir de la exposición de 50 nmol/L de MMC y alcanzaron un máximo a la concentración de 300 nM. Es importante resaltar que a esta última concentración se observó la presencia de dos

líneas celulares: una con múltiples roturas (62 %), típicas de las células AF; y otra con pocas o ninguna rotura (células No-AF). Esto indica la presencia de mosaicismos en linfocitos T.

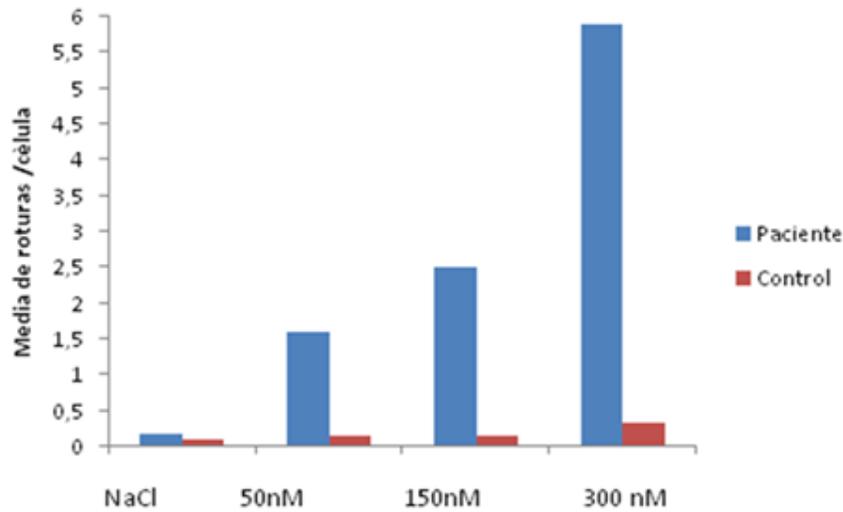


Fig. 2. Promedio del número de roturas por célula observadas en el paciente y el control después del tratamiento con las diferentes concentraciones de mitomicina C (MMC). El tratamiento con MMC a todas las concentraciones permite diferenciar con efectividad entre el paciente y el control.

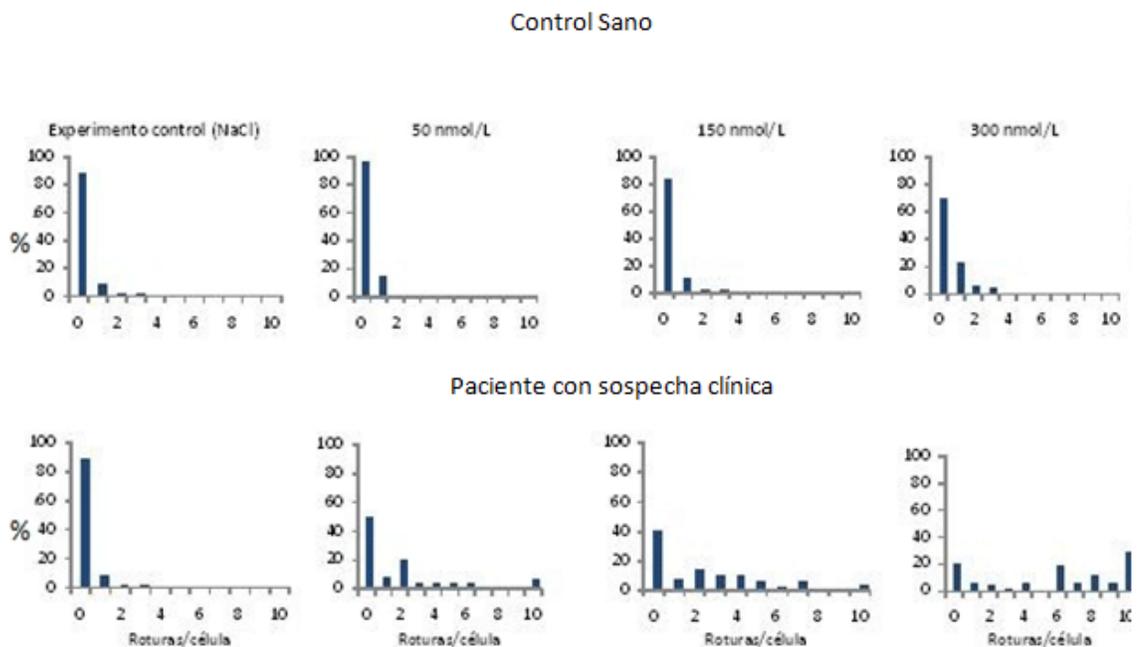


Fig. 3. Porcentaje de células con roturas cromosómicas inducidas por mitomicina C en cultivos de linfocitos T estimulados.

DISCUSIÓN

La frecuencia basal de roturas cromosómicas en el paciente con la sospecha clínica de AF coincide con los datos reportados en el Registro Internacional de la AF (IFAR),⁷ en el cual aparece una frecuencia de $0,25 \pm 0,8$ roturas cromosómicas espontáneas por célula. La amplitud del rango reportado para las roturas cromosómicas espontáneas está dado por el hecho de que las frecuencias de estos eventos, en algunos pacientes con AF, pueden ser similares a las que pueden aparecer en individuos normales, razón por la cual estos valores no pueden ser utilizados con fines diagnósticos. Por ello se recomienda la utilización de ensayos de hipersensibilidad a agentes intercalantes en el ADN, como la MMC.

Se describe que en los ensayos de hipersensibilidad a la MMC, cuando se trata de un paciente con AF se debe apreciar que a partir de la concentración mínima, en este caso 50 nmol/L, comienzan a aparecer las roturas cromosómicas en las células cultivadas, mientras que al ir aumentando la concentración, la mayoría de las células deben ser aberrantes, y encontrarse en la categoría de más de 5 roturas por célula. Por su parte, en los casos normales solo aparecerán estas aberraciones a la concentración máxima empleada, en este caso, 300 nmol/L.⁶

Se pudo comprobar que a la menor concentración empleada, en el caso con la sospecha clínica, ya se apreciaba una proporción de células con roturas cromosómicas; al aumentar los niveles de MMC, la cantidad de roturas por célula se incrementó sustancialmente y fue concentración dependiente. En el caso control solo apareció un porcentaje de células con roturas a la máxima concentración, aspectos que en su conjunto corroboran el éxito de la técnica y la posibilidad de confirmar la sospecha clínica mediante el ensayo empleado.

Es interesante resaltar la presencia en el paciente de una población mixta de linfocitos, células que mostraron hipersensibilidad a la MMC, como es típico de las células AF, y otro porcentaje de células con sensibilidad normal a la MMC, por lo que se consideró que el caso presentaba mosaicismo en los linfocitos T. Este evento se ha reportado en una proporción considerable de pacientes con AF, con una frecuencia estimada entre el 10 y el 30 %.⁸⁻¹⁰ Se ha planteado que este puede producirse como consecuencia de nuevas mutaciones en las células progenitoras hematopoyéticas, que provocan una reversión genética espontánea en el *locus* de la enfermedad. Estas células "revertidas" pueden corregir, al menos parcialmente, la insuficiencia de la médula ósea.⁸⁻¹⁰

En ocasiones, cuando el porcentaje de células "revertidas" ha llegado a un nivel tan alto, se puede producir un diagnóstico falso negativo. Sin embargo, se describe que la mayoría de los casos de AF "mosaico" pueden ser diagnosticados mediante pruebas de sangre periférica, ya que una porción de las células seguirá mostrando la hipersensibilidad a los agentes intercalantes, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Una de las ventajas del protocolo descrito, es que la mayoría de los pacientes con mosaicismo podrán ser diagnosticados correctamente como AF, porque siempre una determinada proporción de linfocitos se encontrarán en la categoría ≥ 5 roturas/célula. En los casos donde no sea posible emplear la sangre periférica, la sensibilidad a la MMC puede ser utilizada en fibroblastos de la piel, células donde no se ha reportado la presencia de mosaicismo.⁶⁻¹⁰

De acuerdo con los resultados obtenidos, se confirmó la sospecha clínica de que se trata de un paciente AF y que, además, presenta mosaicismo somático en linfocitos T. La disponibilidad de los ensayos de hipersensibilidad en casos de sospecha clínica de AF permite realizar el diagnóstico temprano de esta enfermedad, antes de la aparición de alteraciones hematológicas, lo que podría repercutir en las opciones

terapéuticas que puedan emplearse, como el trasplante de médula ósea. Por otra parte, a las familias en riesgo se les puede ofrecer un adecuado asesoramiento genético, teniendo en cuenta el elevado riesgo de recurrencia de este trastorno autosómico recesivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research*. 2009;668:4-10.
2. Lanneaux J, Poidvin A, Soole F, Leclerc G, Grimaud M, Dalle JH. Fanconi anemia in 2012: diagnosis, pediatric follow-up and treatment. *Arch Pediatr*. 2012;19(10):1100-9.
3. Castella M, Pujol R, Callén E, Ramírez MJ, Casado JA, Talavera M, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet*. 2011;48(4):242-50.
4. Porto B, Sousa R, Ponte F, Torgal A, Campilho F, Campos A, et al. Fanconi anemia: cytogenetic diagnosis of 40 cases. *Acta Med Port*. 2011;24(3):405-12.
5. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:467-80.
6. Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. *Anemia*. 2012;2012:238731.
7. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood*. 1989;73:391-6.
8. Gregory JJ Jr, Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2532-7.
9. Pinto F, Leblanc T, Chamousset D, Le Roux G, Brethon B, Cassinat B, et al. Diagnosis of Fanconi anemia in patients with bone marrow failure. *Haematologica*. 2009;94(4):487-95.
10. Hamanoue S, Yagasaki H, Tsuruta T, Oda T, Yabe H, Yabe M, et al. Myeloid lineage-selective growth of revertant cells in Fanconi anaemia. *Br J Haematol*. 2006;132(5):630-5.

Recibido: 18 de diciembre de 2013.

Aceptado: 18 de febrero de 2014.

Lic. *Reinaldo Gutiérrez Gutiérrez*. Centro Nacional de Genética Médica. Dirección: Ave. 146 No. 3102, esq. 31. Playa. La Habana, Cuba. Teléfono: 208-9991-97 ext. 1101. Email: rey@infomed.sld.cu
