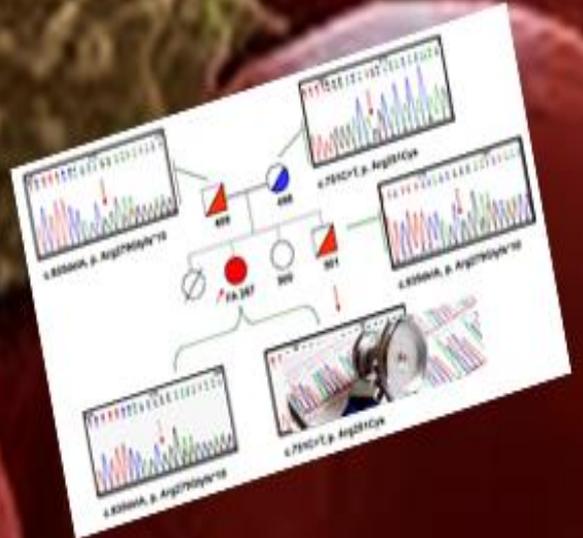


GENÉTICA CLÍNICA DE LA ANEMIA DE FANCONI



Departamento de Genética y Microbiología
 Universitat Autònoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL
JUAN PABLO TRUJILLO QUINTERO
2013



Universitat Autònoma de Barcelona

**Facultad de Biociencias
Departamento de Genética y Microbiología
Unidad de Genética**

Genética Clínica de la anemia de Fanconi

TESIS DOCTORAL

Juan Pablo Trujillo Quintero

2013



Universitat Autònoma de Barcelona

**Facultad de Biociencias
Departamento de Genética y Microbiología
Unidad de Genética**

Genética Clínica de la anemia de Fanconi

Memoria presentada por JUAN PABLO TRUJILLO QUINTERO en el marco de los estudios de doctorado en Genética de la *Universitat Autònoma de Barcelona* para optar al grado de Doctor por la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Director de tesis

Autor

Dr. Jordi Surrallés Calonge
Catedrático de Genética
UAB

Juan Pablo Trujillo Quintero

**A todos los pacientes afectados de una enfermedad rara
y a sus Familias**

**Es verdad que estamos hechos de átomos,
pero también de historias**

Eduardo Galeano

Agradecimientos:

A mi familia, en especial a mi Madre y mi hermano por todo el apoyo incondicional y su anhelo de mi pronto regreso.

A Natalia por estos últimos años, a todo la gente con la que he tenido el gusto de trabajar en el laboratorio y han sido participes de mis aciertos y me han ayudado a superar mis dificultades, en especial a Jordi Minguillón, Roser Pujol y Jose Antonio Casado por todo el soporte técnico científico brindado. A todos estas personas que me han brindado un amistad incondicional en estos últimos años y me han enseñado otras formas de ver el mundo y de vivirlo.

Finalmente quiero agradecerle a Jordi Surrallés por darme la oportunidad de hacerme participe de su grupo de investigación, por permitirme aprender resolviendo casos reales en el área de la Genética clínica, por la orientación científica y académica aportada, y por su guía y supervisión para culminar esta tesis doctoral.

TABLA DE CONTENIDOS



TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HISTORIA DE LA ANEMIA DE FANCONI	3
1.2. BIOLOGIA MOLECULAR DE LA RUTA FA/BRCA	8
1.2.1. La Ruta FA/BRCA	11
1.2.1.1. Proteínas del complejo nuclear AF	11
1.2.1.2. Proteínas del Complejo ID.....	12
1.2.1.3. Proteínas posteriores al complejo ID.....	13
1.2.2. Activación y regulación de la ruta FA/BRCA	15
1.2.3. Función de la ruta FA/BRCA.....	16
1.2.4. Sobre la proteína FANCA.....	20
1.2.5. Sobre las otras proteínas AF.....	22
1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA AF	25
1.3.1. Malformaciones congénitas	26
1.3.2. Alteraciones hematológicas.....	35
1.3.3. Disfunciones endocrinas.....	37
1.3.4. Predisposición a desarrollar tumores sólidos.....	40
1.3.5. Variabilidad del fenotipo clínico en función del grupo de complementación.....	41
1.3.6. Correlación genotipo-fenotipo	42
1.3.6.1. Tipos de mutaciones y longevidad	43
1.3.6.2. Mutaciones idénticas con diferentes fenotipos clínicos	45
1.3.6.3. Características de progeria segmental en pacientes con AF ..	46
1.4. FENOTIPO DE LA CÉLULA AF	49
1.4.1. Fragilidad Cromosómica	50
1.4.2. Hipersensibilidad a los agentes inductores de ICLs.....	52

1.4.3.	Alteraciones del ciclo celular en AF	53
1.4.4.	Sensibilidad al estrés oxidativo	54
1.4.5.	Desregulación de la respuesta inflamatoria y la apoptosis... 56	56
1.4.6.	Formación de Focos en RAD51.....	57
1.4.7.	Fallo en la monoubiquitinación de FANCD2	58
1.4.8.	Daño inducido por aldehídos endógenos	58
1.4.9.	Disfunción telomérica.....	61
1.5.	DIAGNÓSTICO DE LA AF.....	62
1.5.1.	Presunción diagnóstica por el fenotipo clínico.....	63
1.5.2.	Confirmación diagnóstica citogenética.....	63
15.3.	Otras técnicas de ayuda diagnóstica	64
1.5.4.	Subtipaje de pacientes AF por complementación retroviral .	67
1.5.5.	Análisis mutacional de los pacientes AF	68
1.6.	MOSAICISMO POR REVERSIÓN SOMÁTICA EN LOS PACIENTES AF	73
1.6.1.	Diagnóstico de pacientes mosaicos.....	74
1.7.	CARACTERIZACIÓN GENETICA DE LOS PACIENTES AF.....	76
1.7.1.	Grupos de complementación nivel mundial	77
1.7.1.1.	Grupos de complementación en la población española	78
1.7.2.	Espectro y análisis mutacional a nivel mundial	78
1.7.2.1.	Espectro y análisis mutacional en la población española	80
1.8.	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	81
1.8.1.	Síndromes de Inestabilidad Genómica.....	81
1.8.8.1.	Síndrome de Seckel	81
1.8.1.2.	Síndrome de rotura cromosómica de Nijmegen	85
1.8.1.3.	Síndrome de Bloom.....	87
1.8.1.4.	Ataxia telangiectasia.....	90
1.8.1.5.	Otros síndromes de inestabilidad genómica.....	91
1.9.1.	Síndromes de fallo de médula ósea congénitos.....	96
1.9.1.1.	Disqueratosis congenital	97
1.9.1.2.	Anemia de Diamond-Blackfan	100

1.9.1.3.	Síndrome de Shwachman-Diamond.....	103
1.9.2.3.	Otros síndromes de fallo medular congénito	104
1.10.	MANEJO MEDICO DE LOS PACIENTES AF	105
1.10.1.	Manejo Hematológico	106
1.10.1.1.	Seguimiento del paciente	106
1.10.1.2.	Tratamiento con andrógenos	107
1.10.1.3.	Transfusiones sanguíneas.....	108
1.10.1.4.	Tratamiento con citoquinas.....	109
1.10.1.5.	Trasplante de médula ósea	109
1.10.1.6.	Terapias en el futuro: Terapia génica	111
1.10.2.	Manejo de las anomalías de cabeza y cuello	114
1.10.3.	Manejo de las alteraciones esqueléticas y estructurales	114
1.10.4.	Manejo de los problemas gastrointestinales, hepáticos y soporte nutricional.....	116
1.10.5.	Manejo endocrinológico	117
1.10.6.	Manejo de problemas ginecológicos y de fertilidad.....	118
1.10.7.	Consejo genético.....	119
1.10.7.1.	Valoración del riesgo de desarrollar cáncer.	120
1.10.7.2.	Diagnóstico molecular	121
1.10.7.3.	Diagnóstico prenatal y preimplantacional	121
1.10.8.	Soporte psicosocial	126
2.	OBJETIVOS	129
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	132
3.1.	POBLACIÓN Y MUESTRAS.....	134
3.1.1.	Obtención de datos clínicos y muestras biológicas	134
3.1.2.	Obtención de líneas celulares	134
3.1.3.	Extracción de DNA	135

3.2.	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	136
3.2.1.	Ensayo de fragilidad cromosómica	136
3.2.2.	Western blot (WB)	138
3.2.3.	Análisis del bloqueo del ciclo celular en G2/M por citometría	139
3.2.4.	Detección de mutaciones y estudios de segregación	139
3.2.4.1.	MLPA para la detección de grandes deleciones en <i>FANCA</i> .	139
3.2.4.2.	PCR/Secuenciación para detección de mutaciones en <i>FANCA</i>	146
3.2.4.3.	Implementación de la secuenciación masiva del exoma para el estudio de pacientes AF de difícil subtipaje	151
3.2.4.4.	Validación de los datos de la secuenciación masiva	154
3.2.5.	Otros estudios: Supervivencia celular a la MMC.....	156
3.3.	PCR CUANTITATIVA ALELO ESPECIFICA.....	156
3.3.1.	Amplificación y clonación específica de la región mutante	156
3.3.2.	Cuantificación de dosis alélica mediante PCR en tiempo real	158
3.4.	ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X	160
3.4.1.	Búsqueda de marcadores próximos a la isla CpG de <i>FANCB</i>	160
3.4.2.	Cribado de marcadores alelo-específicos de la mutación...	162
3.4.3.	Metodología del análisis del gen <i>FANCB</i> por PCR anidada	162
3.4.4.	Ensayo de caracterización del patrón de inactivación del cromosoma X en el gen <i>FANCB</i>.....	163
3.5.	DATOS CLINICOS DE PACIENTES AF MOSAICOS ESPAÑOLES	165
3.5.1.	Elaboración gráfica de la evolución hematológica de pacientes mosaicos	165

3.6.	RECOPIACIÓN DE DATOS DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL.....	166
3.7.	ANÁLISIS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA POR TERMINAL RESTRICTION FRAGMENTS-SOUTHERN BLOT (TRF- SOUTHERN BLOT)	167
4.	RESULTADOS.....	173
4.1.	DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN MUTACIONAL DE PACIENTES AF ESPAÑOLES	175
4.1.1.	Implementación del WB y de la complementación retroviral para el subtipaje de pacientes AF.....	175
4.1.2.	Implementación de la estrategia del cribado mutacional en <i>FANCA</i>	179
4.1.3.	Incorporación de las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento en el subtipaje de pacientes AF e Identificación de nuevos genes AF	182
4.2.	ESTUDIO MUTACIONAL DE PACIENTES AF NO ESPAÑOLES	197
4.2.1.	Implementación de la estrategia de 4 rondas para <i>FANCA</i> en pacientes AF de América Latina y otros pacientes AF	197
4.2.2.	Implementación de la estrategia de 4 rondas para <i>FANCA</i> en pacientes AF de otros países	205
4.2.3.	Implementación del WB para el subtipaje de pacientes Serbios	207
4.3.	ANÁLISIS DEL FENOTIPO CELULAR EN PACIENTES CON UN ENSAYO DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA NEGATIVA PARA AF	209
4.3.1.	Análisis del fenotipo clínico-celular de pacientes deficientes en <i>FAN1</i> en el contexto del fenotipo AF	209

4.3.2.	Identificación de pacientes “Fanconi-like”	215
4.4.	ANÁLISIS CLÍNICO DE UNA COHORTE DE PACIENTES AF ESPAÑOLES CON MOSAICISMO POR REVERSIÓN MUTACIONAL.....	218
4.4.1.	Pacientes AF mosaicos con mejoría de todos los linajes celulares hematológicos de manera estable en el tiempo ...	222
4.4.2.	Pacientes AF mosaicos con mejoría de uno o dos de los linajes hematológicos.....	231
4.4.3.	Pacientes AF mosaicos con progresivo deterioro de todos sus linajes hematopoyéticos	235
4.4.4.	Pacientes AF mosaicos con mejoría de todos los linajes celulares hematológicos pero con súbita recaída hematológica.....	237
4.4.5.	Pacientes AF mosaicos con mejoría de todos los linajes celulares hematológicos pero con un ensayo de fragilidad cromosómica en rango no mosaico	241
4.5.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL DGP CON TIPIFICACIÓN HLA	249
4.5.1.	Eficacia del diagnóstico genético preimplantacional en familias AF	250
5.	DISCUSIÓN.....	254
5.1.	ESTADO ACTUAL DEL DIAGNÓSTICO DE LA AF.....	256
5.1.1.	Población AF española.....	256
5.1.2.	Población AF de algunos países americanos.....	261
5.1.3.	Población AF de otros países.....	263
5.1.4.	Estudios de secuenciación de alto rendimiento en el subtipaje y caracterización mutacional de los pacientes AF.....	264

5.2.	CORRELACIÓN DEL FENOTIPO CLÍNICO Y CELULAR DE LOS PACIENTES FANCONI-LIKE Y OTROS FENOTIPOS CELULARES SOLAPANTES.....	267
5.3.	FENOTIPOS HEMATOLÓGICOS EN LOS PACIENTES AF CON MOSAICISMO POR REVERSIÓN MUTACIONAL SOMÁTICA A NIVEL HEMATOPOYÉTICO.....	268
5.4.	LA IMPLEMENTACIÓN DEL DGP CON TIPIFICACIÓN HLA EN FAMILIAS CON PACIENTES AF.....	272
5.5.	UNA APROXIMACIÓN AL CONSEJO GENÉTICO DE LOS PACIENTES CON AF.....	274
6.	CONCLUSIONES	279
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	284
8.	ANEXOS.....	315

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADB	Anemia de Diamond-Blackfan
AF	Anemia de Fanconi
AT	Ataxia telangiectasia
ATL	Ataxia telangiectasia <i>like</i>
BER	<i>del inglés</i> , Reparación por escisión de bases
BRCA	<i>del inglés</i> , Susceptibilidad al cáncer de mama
CA	Células aberrantes
CCE	Carcinoma de células escamosas
CFI	<i>del inglés</i> , Índice de fragilidad cromosómica
CU	Cordón umbilical
DEB	Diepoxibutano
DC	Disqueratosis congénita
DGP	Diagnóstico genético preimplantacional
DNA	<i>del inglés</i> , Ácido desoxirribonucleico
DSB	<i>del inglés</i> , Rupturas de doble cadena
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped
EMA	<i>del inglés</i> , Agencia Europea del Medicamentos
FAAP	<i>del inglés</i> , Proteína asociada al complejo nuclear AF
FANCD2-Ub	Monoubiquitinación de FANCD2
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FISH	<i>del inglés</i> , Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
G-CSF	<i>del inglés</i> , Factor de estimulación de colonias de granulocitos
GM-CSF	<i>del inglés</i> , Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos
HU	Hidroxiurea
HLA	<i>del inglés</i> , Antígeno leucocitario humano
ICH	Intercambios de cromátidas hermanas
ICL	<i>del inglés</i> , Enlace cruzado de DNA
Hb F	Hemoglobina fetal
LMA	Leucemia mieloide aguda
MLPA	<i>del inglés</i> , Amplificación múltiple dependiente de sonda de ligación

MMC	Mitomicina C
MMR	Reparación de apareamiento erróneo
MO	Médula ósea
mRNA	<i>del inglés</i> , Ácido ribonucleico mensajero
NBS	<i>del inglés</i> , Síndrome de ruptura cromosómica de Nijmegen
NHEJ	<i>del inglés</i> , Unión de extremos no homólogos
NER	<i>del inglés</i> , Reparación por escisión de nucleótidos
NIC	Nefritis intersticial cariomegálica
OD	<i>del inglés</i> , Densidad óptica
PCNA-Ub	Monoubiquitinación de PCNA
PCR	<i>del inglés</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
RDD	Respuesta al daño de DNA
Rf	<i>del inglés</i> , Movilidad relativa
RI	Radiación ionizante
RRH	Reparación por recombinación homóloga
ROS	Radicales libres de oxígeno
SB	Síndrome de Bloom
SDS	Síndrome de Shwachman-Diamond
SFMOC	Síndrome de fallo de la médula ósea congénita
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNP	<i>del inglés</i> , Polimorfismo de un solo nucleótido
SNV	<i>del inglés</i> , Variantes de significado incierto
SP	Sangre periférica
SR	Síndrome de Roberts
SRV	Síndrome de rupturas cromosómicas de Varsovia
SS	Síndrome de Seckel
SSB	<i>del inglés</i> , Reparación de rupturas de simple cadena
TLS	<i>del inglés</i> , Síntesis de DNA translesión
TPH	Trasplante progenitores hematopoyéticos
TRF	<i>del inglés</i> , Fragmentos de restricción terminal
UV	Luz ultravioleta
VCM	Volumen corpuscular medio
VPH	Virus del papiloma humano
WB	Western blot

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HISTORIA DE LA ANEMIA DE FANCONI

En 1927 un pediatra de origen Suizo, Guido Fanconi, describió una familia en la cual tres de sus hijos masculinos en edades entre 5 y 7 años presentaban una pancitopenia asociada a malformaciones congénitas (ver figura 1) (Auerbach, 2009; Lobitz & Velleuer, 2006). Basado en estas observaciones y en otros casos, Fanconi estableció en 1927 los criterios diagnósticos de esta patología a la que denominó anemia "Perniciode" Infantil familiar. Estos criterios incluían la pancitopenia, alteraciones esqueléticas, baja estatura, anomalías urogenitales, hiperpigmentación y ocurrencia familiar (ver figura 2) (Lobitz & Velleuer, 2006).

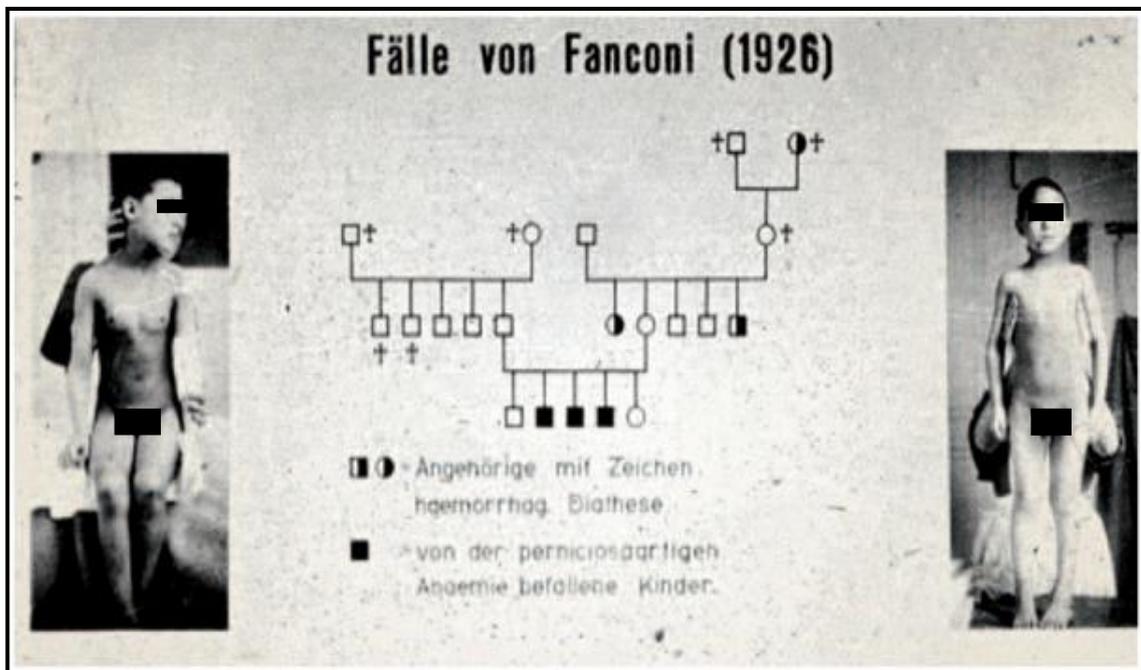


Figura 1. Pacientes por el Dr. Guido Fanconi. Se trataban de pacientes con anemia atípica, (Lobitz & Velleuer, 2006).

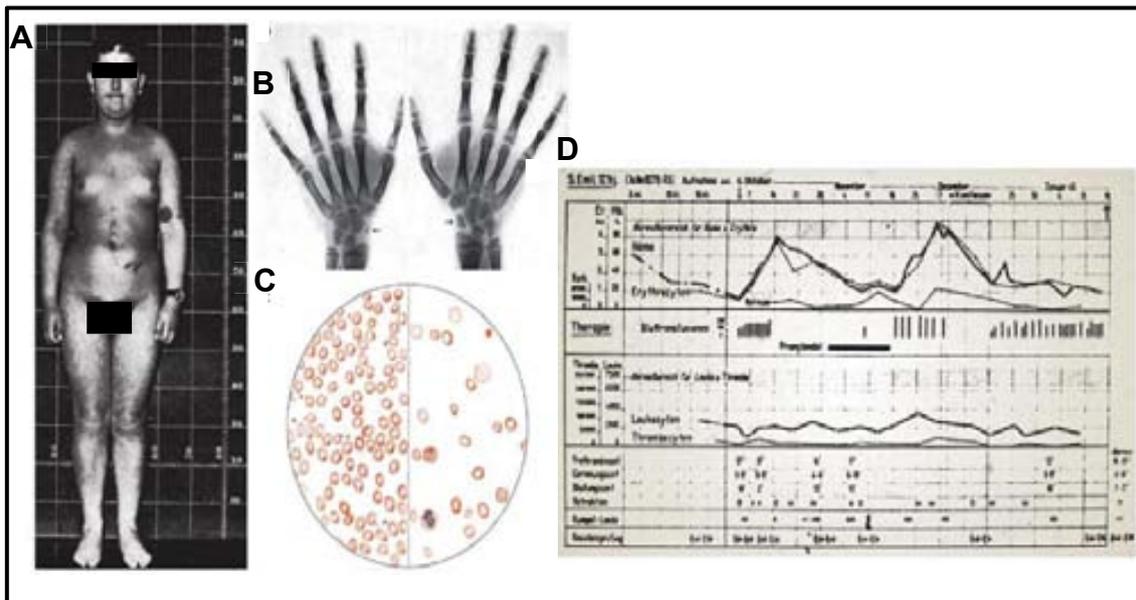


Figura 2. Paciente con AF descrito por el Dr. Guido Fanconi. (A) Paciente de 11 años y 6 meses, esplenectomizado por una panmielocitopatía crónica. (B) Rayos X de las manos del paciente evidencian una hipoplasia del escafoides. (C) Dos imágenes de eritrocitos, una de extensión normal (izquierda) y otra con una marcada hipocelularidad (derecha). (D) Hemograma de un reporte original hospitalario hecho por el Dr. Fanconi entre 1945 y 1946 que muestra una pancitopenia. Estas imágenes fueron tomadas del artículo publicado por Lobitz & Velleuer en el 2006.

En 1931 se sugirió que el término "anemia de Fanconi" (AF) se utilizara para los pacientes con anemia aplásica familiar y malformaciones congénitas, sin embargo por varias décadas recibo diversos nombres entre los cuales estuvieron: anemia aplásica constitucional, pancitopenia congénita, anemia aplásica asociada a malformaciones congénitas, pancitopenia de Fanconi, panmielopatía de Fanconi. Ha sido en las dos últimas décadas cuando ya se tiene más claridad sobre la enfermedad y sobre su correcto diagnóstico cuando se ha establecido la denominación de "anemia de Fanconi" de manera generalizada, como una forma de reconocimiento al trabajo hecho en este campo por el pediatra Guido Fanconi (Auerbach, 2009).

Debido a la relevancia que tuvieron los criterios propuestos por el Dr. Fanconi en la práctica clínica para este síndrome, estos se convirtieron en la base del diagnóstico por varias décadas. Sin embargo, en 1982 estudios descriptivos llevados a cabo sobre el espectro de anomalías físicas en pacientes AF permitieron concluir que no todos los pacientes AF presentaban anomalías físicas, siendo el fenotipo hematológico el único signo clínico en algunos pacientes. A este subgrupo de pacientes que parecían ser "Fanconi-like" se

habían previamente descritos como el síndrome de Estren-Dameshek, en honor a los investigadores clínicos que estudiaron clínicamente este grupo de pacientes dentro de esta patología (Auerbach, 2009). Por lo tanto, estas observaciones clínicas dejaban ver la necesidad de ampliar los criterios de diagnóstico de tal manera que incluyeran a pacientes que a pesar de no presentar malformaciones físicas, terminaban presentando fallo de médula ósea.

Casi 3 décadas después de la descripción y publicación de los primeros casos de AF, entre 1964 y 1965, se describió por primera vez la presencia de aberraciones cromosomas espontáneas en sangre de pacientes afectados con aquella panmielopatía familiar hoy conocida como AF (Auerbach, 2009; Lobitz & Velleuer, 2006). Este hecho fue fundamental, ya que marcó el comienzo del uso de marcadores celulares citogenéticos como herramienta de apoyo en esta patología. Tanto el conocimiento de la asociación de la fragilidad cromosómica de estas células AF, así como la necesidad de tener un marcador que permitiese identificar a los pacientes sin malformaciones clínicas llevaron a los investigadores a buscar un ensayo citogenético que permitiese confirmar la sospecha clínica de esta enfermedad, sobre todo en los casos no concordantes. Sin embargo, tuvieron que pasar casi dos décadas más para reconocerse y demostrarse la hipersensibilidad de las células AF al efecto clastogénico de agentes inductores de enlaces cruzados en el DNA, así como su reproducibilidad, con el objetivo de su implementación como herramienta diagnóstica en esta patología (Auerbach et al., 1989). Es así como en 1981, Auerbach y colaboradores, primero lograron establecer la asociación entre síntomas clínicos y la fragilidad cromosómica, y posteriormente, demostraron la inducción de fragilidad cromosómica de estas células por exposición a estos agentes (Auerbach et al., 1989). Posteriormente, la amplia experiencia de ensayos de fragilidad cromosómica de células AF con diepoxibutano (DEB) y mitomicina C (MMC) les permitió demostrar dicha sensibilidad y confirmar la reproducibilidad de los resultados. Finalmente, estos trabajos culminaron con la estandarización de un ensayo de fragilidad cromosómica con DEB para las células de estos pacientes (Auerbach, 2003a, 2009). Actualmente se reconoce la importancia de este ensayo a nivel clínico, ya que ha permitido identificar casos pre-anémicos, así como pacientes con anemias aplásicas, con

leucemias o tumores sólidos en quienes no había anomalías físicas y se desconocía la etiología de su enfermedad. Desde entonces se ha ampliado su aplicación en la práctica clínica tanto para el diagnóstico prenatal como postnatal. Hoy por hoy, este ensayo se ha convertido en herramienta fundamental para hacer la confirmación del diagnóstico de esta enfermedad en pacientes con un diagnóstico presuntivo de AF y en algunos casos llegar al diagnóstico de la enfermedad aún en su estado silente.

Con la implementación del estudio de fragilidad cromosómica en células fetales, obtenidas por amniocentesis o de vellosidades coriónicas o de muestras de sangre umbilical percutánea, se ha logrado incorporar este ensayo como herramienta de diagnóstico prenatal. Ello ha permitido realizar un mejor consejo genético para la familia y la identificación presintomática de hermanos afectados. Adicionalmente, con el desarrollo de la tecnología del diagnóstico genético preimplantacional (DGP), de embarazos cuyos fetos sean sanos y antígeno leucocitario humano (ALH) compatibles, con el objeto de ser donantes de progenitores hematopoyéticos para un hermano afectado, abrió una esperanzadora opción para aquellos pacientes que era imposible encontrar un donante ALH compatible para el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Cabe recalcar como antecedente a este aspecto, que el primer TPH de cordón umbilical (CU) realizado en seres humanos fue hecho en un paciente AF en 1988 por la Dra. Gluckman, quien había previamente criopreservado las células progenitoras de sangre de CU de un hermano que tenía un ensayo prenatal negativo para AF (Auerbach, 2009; Gluckman et al., 1989). El éxito de este trasplante, que hasta el año 2009 seguía vivo y clínicamente sano, sirvió de estímulo para progresivos TPH de CU a partir de hermanos seleccionados por PGD y ALH idénticos a su hermano afecto, siendo nuevamente un paciente AF el primero en beneficiarse de esta tecnología (Verlinsky et al., 2001). Este último avance, ha generado una tendencia a la creación de “hermanos medicamento” para las patológicas hereditarias con afectación hematológica, con toda la discusión ético-legal que esta tecnología ha traído (Auerbach, 2009).

Adicionalmente, en materia de tratamiento el trasplante de progenitores hematopoyético, ya sean de médula ósea (MO), de sangre periférica (SP) o de CU es hasta el momento la única opción que se tiene para curar la afección

hematológica en estos pacientes. Por lo tanto, el TPH se ha hecho rutinario en estos pacientes en estas dos últimas décadas y gracias a la experiencia acumulada se ha venido mejorando los protocolos con el fin de adaptarlos a las particularidades de estos pacientes, orientados a obtener mejores resultados. Partiendo de que el paciente AF presenta un síndrome de inestabilidad cromosómica, se ha reducido las dosis de acondicionamiento para este procedimiento y ello ha mostrado una reducción de su toxicidad, una tasa superior de trasplante efectivo y una reducción de enfermedad de injerto contra huésped (EICH), llevando todo en conjunto a una mayor supervivencia (MacMillan & Wagner, 2010).

Por otra parte, con la identificación de pacientes AF con mosaicismo somático hematológico, debido a que una célula madre ha corregido el defecto genético del gen afecto y es capaz de repoblar la MO y generar una hematopoyesis normal, da un gran soporte esperanzador a la implementación de la terapia génica en esta patología (Gregory et al., 2001; Mankad et al., 2006; Soulier et al., 2005; Lo Ten Foe et al., 1997a). Adicionalmente a estas observaciones, el éxito de corrección de genes en varias inmunodeficiencias congénitas por terapia génica aumentó el optimismo hacia esta tecnología. Sin embargo, sus resultados dejan ver que esta opción no está libre de efectos secundarios. En este aspecto ya han empezado a trabajar los investigadores, los cuales han creado un grupo internacional de trabajo en terapia génica para AF. Con el fin de disminuir el riesgo se han realizado dos reuniones de este grupo en el cual han revisado desde el vector a utilizar hasta los criterios más óptimos para la selección de los pacientes con miras a realizar un ensayo de terapia génica más segura y eficaz en AF, y con una propuesta hacia el futuro de crear un Consorcio de Terapia génica internacional para enfermedades monogénicas (Tolar et al., 2011; Tremblay et al., 2013). Este trabajo lo viene liderando el grupo de División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT, Madrid, cuyo grupo ha logrado la designación de medicamento huérfano para su vector lentiviral contra la anemia de Fanconi del subtipo FA-A por parte de Comisión Europea, siguiendo la recomendación de la Agencia Europea del Medicamentos (EMA). Esta designación establece la justificación científica para el desarrollo del medicamento y/o la indicación terapéutica huérfana, aunque no garantiza su uso en la condición designada y no implica

necesariamente la concesión de la autorización de comercialización. Sin embargo, este logro ha dado un mayor estímulo a continuar con este liderazgo que a nivel mundial ha alcanzado. De lograr este proyecto resultados positivos sería la primera terapia génica eficaz en AF y a la vez hecha de manera segura.

En paralelo al avance en el tratamiento, se ha venido tenido un mejor conocimiento de la ruta FA/BRCA y ello ha permitido identificar genes implicados en cánceres hereditarios y/o familiares de gran relevancia en la medicina como es el cáncer de mama, ovario y próstata. Hasta el momento se han identificado 16 genes AF, de los cuales 4 han sido claramente identificados como genes de susceptibilidad a cáncer. Debido a que hay aún pacientes sin tener identificadas mutaciones en homocigosis en estos genes ya descritos, se anticipa el descubrimiento de al menos dos nuevos genes AF. La relevancia de estos nuevos genes será aún mayor si se identifican como genes de predisposición a cáncer hereditario y/o familiar.

Finalmente, podemos concluir que gracias a los avances hechos en materia de comprensión de esta patología, su compleja ruta de reparación del DNA y las características clínicas que presenta, han hecho que esta enfermedad se convierta en el paradigma de estudio de las enfermedades genéticas y de predisposición a cáncer hasta ahora estudiadas.

1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA RUTA FA/BRCA

El mantenimiento de la estabilidad genómica es de vital importancia para la supervivencia y la transmisión íntegra de la información genética, y su inestabilidad predispone a largo plazo a fatales consecuencias como el cáncer o la muerte celular.

Para el mantenimiento de la integridad genómica, el DNA debe ser protegido del daño inducido por agentes ambientales o generado espontáneamente durante el metabolismo del DNA. Por lo tanto para contrarrestar o reparar este daño, la célula ha desarrollado mecanismos específicos para diferentes tipos de daño. Estos mecanismos están enfocados en la señalización y reparación del daño, así como en la detección del ciclo celular hasta que el daño haya sido reparado, o a la inducción de apoptosis cuando este daño es irreversible

(Ciccia & Elledge, 2010). Dentro de estos mecanismos están: a) el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) que actúa sobre las bases de DNA mal apareadas, reemplazándolas por las bases correctas; b) el sistema de reparación por escisión de bases (BER) que va a reparar pequeñas alteraciones químicas de único nucleótido de DNA; c) el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) que va a reparar lesiones más complejas como dímeros de pirimidina por medio de la escisión de fragmentos más largos hasta un límite de 30 pb que contiene las bases dañadas; d) el sistema de reparación por recombinación homóloga (RRH) que restaura la secuencia de DNA en casos de rupturas de doble cadena (DSB) utilizando las cromátides hermanas como moldes para la reparación; e) el sistema de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) que promueve potencialmente la reparación inadecuada de las DSBs; f) el sistema de reparación de rupturas de cadena simple (SSBR), el cual repara este tipo de daño; g) la ruta FA/BRCA que juegan un papel importante en la reparación de los enlaces cruzados de DNA (ICLs) en la fase S del ciclo celular (Ciccia & Elledge, 2010).

En cuanto a los ICLs, es un tipo de daño difícil de reparar, ya que afecta ambas cadenas de la doble hélice de DNA y por tanto no hay molde intacto. En este aspecto, se ha visto que los eucariotas superiores han desarrollado una vía especializada para tratar con este tipo de daño, la cual es conocido actualmente como ruta FA/BRCA (Moldovan & D'Andrea, 2009). Esta ruta posee una serie de proteínas, denominadas proteínas AF. El papel preciso de esta ruta en la reparación ICL sigue siendo difícil de aclarar, aunque el continuo aumento de evidencias sugiere que las proteínas AF están implicadas en diferentes etapas de la detección, reconocimiento y procesamiento de ICLs, así como en la señalización de estas lesiones (Kim & D'Andrea, 2012; Kottemann & Smogorzewska, 2013).

Hasta el momento se han identificado 16 genes cuya mutación bialélica genera AF y cuyos nombres han sido derivados de sus correspondientes grupos de complementación: *FANCA*, *-B*, *-C*, *-D1* [*BRCA2*], *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I*, *-J* [*BRIP1/BACH1*], *-L*, *-M*, *-N* [*PALB2*], *-O* [*RAD51C*], *-P* [*SLX4*] y *-Q* [*XPF/ERCC4*], (tal como se muestra en la tabla 1).

Grupo de complementación	Gen responsable	Localización cromosómica	Número de exones	Tamaño (bp)	Referencias
A	<i>FANCA</i>	16q24.3	43	5451	(FA/Breast Cancer consortium 1996; Lo Ten Foe et al. 1996)
B	<i>FANCB</i>	Xp22.31	10	3008	(Meetei et al. 2004)
C	<i>FANCC</i>	9q22.3	15	4585	(Strathdee et al. 1992)
D1	<i>FANCD1</i>	13q12.13	28	10984	(Howlett et al. 2002)
D2	<i>FANCD2</i>	3p25.3	43	5219	(Timmers et al. 2001)
E	<i>FANCE</i>	6p21-22	10	2554	(de Winter et al. 2000)
F	<i>FANCF</i>	11p15	1	3309	(de Winter et al. 2000)
G	<i>FANCG</i>	9p13	14	2631	(de Winter et al. 1998)
I	<i>FANCI</i>	15q25-26	38	4743	(Dorsman et al. 2007; Smogorzewska et al. 2007)
J	<i>FANCI</i>	17q22-24	20	6048	(Levitus et al. 2005; Levrán et al. 2005)
L	<i>FANCL</i>	2p16.1	14	1698	(Meetei et al. 2003)
M	<i>FANCM</i>	14q21.3	23	7111	(Meetei et al. 2005)
N	<i>FANCN</i>	16p12.2	13	4003	(Reid et al. 2007; Xia et al. 2007)
O	<i>FANCO</i>	17q25.1	9	1322	(Vaz et al, 2010)
P	<i>FANCP</i>	16p13.3	15	7307	(Kim et al, 2011; Stoepker et al, 2011)
Q	<i>FANCO</i>	16q24.3	11	6758	(Bogliolo et al., 2013)

Tabla 1. Los 16 genes AF identificados hasta el momento. Mutaciones bialélicas en cualquiera de estos genes genera un fenotipo clínico de AF y fragilidad cromosómica en sus células cuando son expuestas a agentes generadores de ICLs. Todos los pacientes AF, excepto los que presentan mutaciones en FANCO presentan fallo de médula ósea.

La disfunción de alguno de los productos proteicos de estos genes deriva en hipersensibilidad a agentes generadores de ICLs, fallo de médula ósea y predisposición al cáncer. La existencia de pacientes sin mutaciones bialélicas en ninguno de los anteriores genes mencionados sugieren de al menos otro gen aún no identificado (Garner & Smogorzewska, 2011; Kim & D’Andrea, 2012; Kottemann & Smogorzewska, 2013; Trujillo et al., 2012). Se sabe que estas proteínas son activadas durante la fase S normal, periodo en el cual participa de la reparación de las horquillas de replicación bloqueadas (Smogorzewska et al., 2007; Taniguchi & D’Andrea, 2006).

También está claro que la ruta FA/BRCA está tan íntimamente ligada con la respuesta al daño del DNA, que actúa tanto en colaboración como en antagonismo con otras rutas clásicas de reparación, con el fin de mantener la estabilidad y supervivencia celular después de la exposición a agentes genotóxicos (Kim & D’Andrea, 2012; Kottemann & Smogorzewska, 2013). Un claro ejemplo que podemos resaltar es la interacción de componentes de la ruta MMR con FANCI (Hiom, 2010a)

1.2.1. La Ruta FA/BRCA

Diferentes estudios han coincidido sobre la estructuración y funcionamiento general de la ruta, sin embargo hay pasos y mecanismos dentro de la misma que aún están por aclararse. Hoy día se sabe que la ruta consta de al menos tres complejos claramente definidos, los cuales son indispensables e imprescindibles para su activación y correcto funcionamiento de la misma. Estas proteínas se activan formando complejos que a su vez van a activar las siguientes proteínas del siguiente complejo hasta llegar a su objetivo final de reparación del daño en el DNA. Las proteínas que actúan en el primer complejo parecen tener como función principal la activación de la ruta y señalización del sitio del daño. El complejo central, estaría encargado de la traducción de la señal a un grupo de proteínas, las cuales actuarían en la reparación directa del daño. De cada uno de estos complejos hablaremos a continuación. La esquematización de la ruta FA/BRCA está ilustrada en la figura 3.

1.2.1.1. Proteínas del complejo nuclear AF

Es un complejo formado por 8 proteínas AF (FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L y -M), cuya activación y asociación, es requerida para la monoubiquitinación de FANCD2 (FANCD2-Ub) y FANCI por medio de la actividad ubiquitina ligasa E3 de FANCL. Dicho proceso se da normalmente durante la fase S o posterior a un estrés genotóxico por ICLs (Gregory et al., 2003; Taniguchi et al., 2002). Adicionalmente a estas 8 proteínas se han identificado otras proteínas, que forman parte activa del complejo nuclear AF y que son indispensables para la activación del siguiente complejo, pero que no han sido identificadas mutadas en ningún paciente. Estas proteínas también son conocidas como proteínas asociadas al complejo nuclear AF (FAAPs) y entre las más conocidas están FAAP20, FAAP24 y FAAP100 (Ali et al., 2009; Huang et al., 2010; Ling et al., 2007; Yan et al., 2012).

La proteína FANCM es la responsable de iniciar el proceso de la activación del complejo. Esta proteína forma un complejo multidimérico con MHF1/2 y FAAP24, la cual reconoce el daño y va a unirse al sitio de la lesión, enviando una señal al punto de control celular de ATR (Ali et al., 2009; Huang et al.,

2010; Singh et al., 2010). Cabe destacar en este punto que las proteínas MHF1/2 son críticas para la formación de este complejo con FANCM ya que poseen dominios de unión a histona que le da al complejo la afinidad de unión al DNA. Posteriormente a la unión del complejo FANCM-FAAP24-MHF1/2, ATR junto con la cinasa CHK1 fosforilan múltiples proteínas entre las que se encuentran FANCA, FANCG, FANCM, FANCD1, FANCD2 y FANCI. De esta manera se activa el complejo nuclear AF, el cual termina localizándose en la cromatina en el sitio de daño junto a FANCM (Ali et al., 2009; Huang et al., 2010; Singh et al., 2010).

1.2.1.2. Proteínas del Complejo ID

Una vez realizado el proceso de reclutamiento del complejo nuclear AF en la cromatina y ubicado sobre el sitio del daño, el dominio RING (ubiquitina ligasa E3) contenido en la subunidad FANCL junto con la enzima E2 UBE2T conjugan la monoubiquitinación de FANCD2 y FANCI, respectivamente, lo cual también ocurre en la fase S del ciclo celular (Alpi et al., 2008; Machida et al., 2006).

Aún no está claro como el complejo ID localiza en la cromatina antes de la monoubiquitinación, pero parece ser que la monoubiquitinación del complejo ID no es fundamental para este proceso (Garner & Smogorzewska, 2011). De todas maneras, se sabe que para que se pueda dar la relocalización del complejo ID en la cromatina se requiere de la presencia de BRCA1 y la fosforilación de H2AX, indicando la importancia que juegan estas dos proteínas dentro de la ruta FA/BRCA tanto para el mantenimiento de la horquilla de replicación como para la estabilidad cromosómica (Bogliolo et al., 2007; Garcia-Higuera et al., 2001).

Adicionalmente, no sólo la monoubiquitinación es esencial en la ruta, sino que la desubiquitinación también lo es. Por lo tanto, una vez cumplida la función el complejo ID es inactivado por medio del proceso de desubiquitinación. Dicho proceso es llevado a cabo por la enzima desubiquitinasa USP1 por medio de un complejo con la proteína UAF1, esta última proteína parece regular su activación y estabilización (Cohn et al., 2007; Garner & Smogorzewska, 2011).

1.2.1.3. Proteínas posteriores al complejo ID

Una vez realizada la monoubiquitinación del complejo ID se activan otras proteínas cuya función es la reparación del daño a diferentes niveles. Hasta el momento se han identificado 6 proteínas que actúan posterior a la activación del complejo ID, estas proteínas son FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1/BACH1), FANCF (PALB2), FANCG (RAD51C), FANCL (SLX4) y FANCL (XPF/ERCC4). Este último complejo de proteínas son requeridas para el reconocimiento y reparación del daño del ADN, aunque sus funciones no están aún del todo claramente definidas (Bogliolo et al., 2013; Garner & Smogorzewska, 2011; Kim & D'Andrea, 2012; Kottemann & Smogorzewska, 2013).

De estas proteínas que actúan en esta etapa final de la ruta, se sabe que FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP1/BACH1, FANCF/PALB2 y FANCG/RAD51C, son codificados por genes de predisposición al cáncer, necesarios para la RRH (D'Andrea, 2010; Levy-Lahad, 2010; Vuorela et al., 2011). Mientras que SLX4 interacciona con múltiples nucleasas de reparación entre las que están XPF, MUS81 y SLX1, los cuales están implicados en el paso de incisión de la reparación de ICLs en el sitio del daño del DNA (Kim et al., 2013; Svendsen et al., 2009).

FANCD1/BRCA2 y FANCF/PALB2 trabajan tardíamente en la ruta reparando las rupturas de doble cadena por medio de RRH. FANCI/BRIP1 parece estar implicada en múltiples complejos, y entre los que se tiene claro está su relocalización a nivel del sitio del daño en la cromatina junto a BRCA1, su interacción con BRCA1 y TopBP1 en la reparación de rupturas de doble cadena y con MLH1 en la reparación de ICLs. Sorprendentemente, la interacción de FANCI con BRCA1 no es requerida para la reparación de ICLs, mientras que la reparación de rupturas de doble cadena son dependientes de dicha interacción (Ali et al., 2009; Hiom, 2010b).

Por otra parte, la función de reparación de ICLs por parte de FANCI es dependiente de MLH1 y está claro que FANCI está físicamente ligado al complejo MutL α (un heterodímero de MLH1 y PMS2). *In vivo*, el dominio helicasa de FANCI se une directamente a MLH1, en donde PMS2 contribuye a

esa interacción. Sin embargo, aún no queda claro cómo se da esta cooperación con FANCD2-Ub del sitio del daño (Ali et al., 2009; Peng et al., 2007).

En cuanto a FANCO/RAD51C facilita la actividad de RAD51 y la resolución de uniones de *Holliday*, intermediarios del paso final de la RRH (Liu et al., 2002, 2004).

Otra nucleasa descrita recientemente, la nucleasa asociada a Fanconi, FAN1 posee un dominio UBZ4 esencial para el recubrimiento dependiente de FANCD2-Ub del sitio del daño (Kratz et al., 2010; Liu et al., 2010; MacKay et al., 2010; Shereda et al., 2010; Smogorzewska et al., 2010). Adicionalmente se ha visto que aunque es una proteína que juega un papel en la reparación de ICLs, su ausencia no genera un fenotipo AF y las células deficientes de esta proteína solo presentan una sensibilidad intermedia a agentes generadores de ICLs, como la MMC (Kottemann & Smogorzewska, 2013; Trujillo et al., 2012). Ello estaría indicando que esta nucleasa podría estar jugando un papel redundante en la reparación de ICLs dentro de la ruta FA/BRCA.

En la figura 3 se esquematiza los diferentes complejos de la ruta, así como el proceso de activación de la misma.

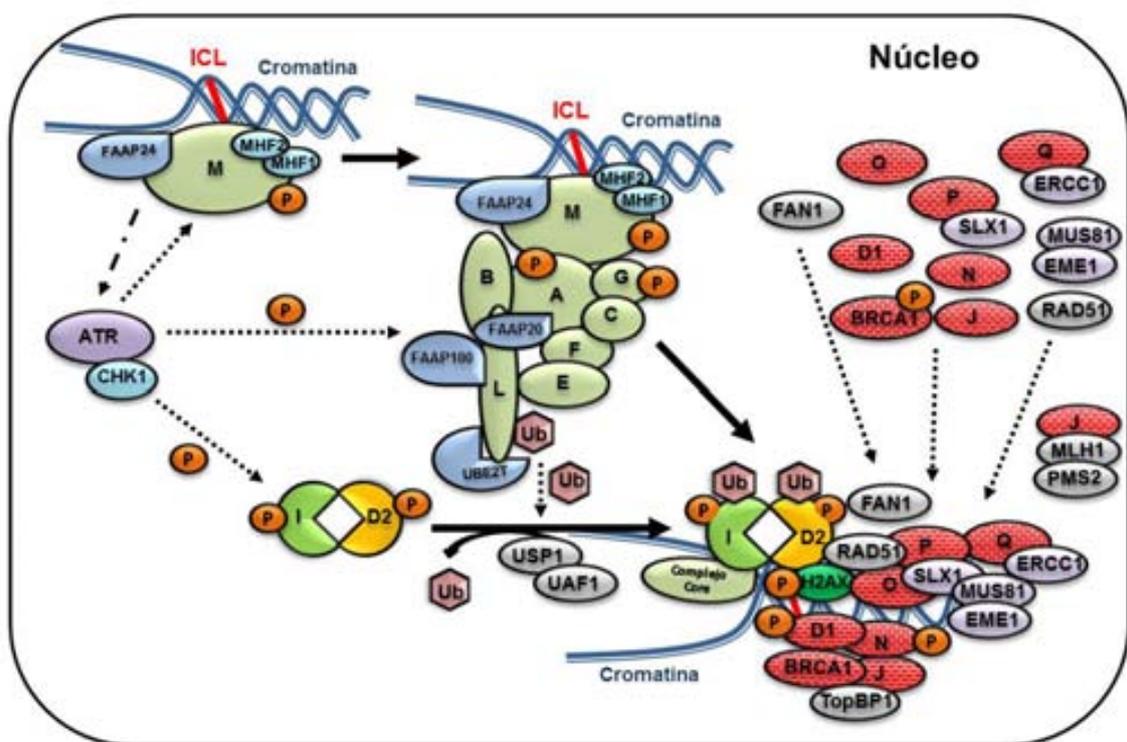


Figura 3. Ruta FA/BRCA. Regulación de la ruta de reparación FA/BRCA por medio de la interacción de los tres complejos clásicos de proteínas, en una común vía de reparación de ICLs en fase S del ciclo celular.

1.2.2. Activación y regulación de la ruta FA/BRCA

La respuesta al daño de DNA (RDD) es una vía de transducción de señal que se activa con estrés replicativo o daño en el DNA, y su objetivo es poner en marcha una cascada de respuestas para proteger la célula y minimizar el daño en el organismo. La RDD es primariamente mediada por proteínas de la familia de cinasas fosfatidilinositol 3-cinasa, entre las cuales están ATM y ATR. ATM se activa por agentes que inducen daño en el DNA de tipo DSBs, como es la radiación ionizante (RI). Por otra parte, ATR en un complejo con su socia ATRIP, es activada después del recubrimiento por parte de RPA de regiones de cadena simple generadas por horquillas de replicación bloqueadas y DSBs (Ciccía & Elledge, 2010).

ATM y ATR inicialmente fosforilan proteínas mediadoras, las cuales pueden amplificar la RDD al actuar como reclutadores de sustratos para ATM/ATR. Las proteínas efectoras de RDD son fosforiladas por ATM/ATR o por las cinasas CHK1 y CHK2 así como por otras cinasas (Ciccía & Elledge, 2010).

Hoy por hoy sabemos que la ruta FA/BRCA se activa durante la fase S del ciclo celular en respuesta a horquillas de replicación bloqueadas. En respuesta a la presencia de zonas de DNA de cadena sencilla en las horquillas de replicación bloqueadas por ICLs, el complejo ATR-CHK1 es activado por señales de reconocimiento post-traduccionales generados después de que el complejo FANCM-FAAP24-MHF1/2 se localice en el sitio del daño, estabilizando a su vez la horquilla de replicación. Posteriormente el complejo ATR-CHK1 fosforila un amplio número de sustratos de la ruta (entre los que están FANCA, FANCG, FANCM, FANCD1, FANCD2 y FANCI), desencadenando entre otros procesos, el reclutamiento del complejo nuclear AF en el sitio del daño junto al complejo FANCM-FAAP24-MHF1/2 y permitiendo desencadenar el proceso de reparación del daño en el DNA (Ciccía & Elledge, 2010; Huang et al., 2010).

Dado que la ruta FA/BRCA se activa no sólo por agentes inductores de ICLs, sino también por otros agentes que producen daño en el DNA tales como la luz ultravioleta (UV), la RI y la hidroxurea (HU), y espontáneamente bajo estrés replicativo, lo más probable es que esta ruta esté involucrada en la reparación dependiente de replicación en muchos otros tipos de lesiones. Sin embargo, a diferencia de los ICLs, muchos de estos daños son también reparados por

otras vías y la ausencia funcional de proteínas AF no afecta significativamente la tasa de supervivencia celular en respuesta a lesiones inducidas por UV o RI (Kottemann & Smogorzewska, 2013; Moldovan & D'Andrea, 2009).

En resumen, la ruta FA/BRCA posee el mayor y más eficiente mecanismo para reparar ICLs eficientemente, y ello se ve reflejado por la alta hipersensibilidad de las células de pacientes AF a agentes inductores de ICLs (Deans & West, 2011; Moldovan & D'Andrea, 2009).

Diferentes trabajos publicados identificaron una nueva subunidad del complejo nuclear AF, FAAP20, la cual interactúa con FANCA a través de su región N-terminal, manteniendo la integridad del complejo y de esta manera permitiendo la FANCD2-Ub. Esta proteína contiene un dominio UBZ4, el cual regula la localización de REV1 monoubiquitinado en el sitio del daño del DNA (Kim et al., 2012; Yan et al., 2012). Por lo tanto, el complejo nuclear AF estaría controlando tanto el paso de incisión de la reparación de ICLs por FANCD2-Ub, así como el paso del TLS por medio del recubrimiento por REV1 monoubiquitinado en el sitio del daño (Kim et al., 2012; Yan et al., 2012).

1.2.3. Función de la ruta FA/BRCA

Dentro de las funciones que tiene la ruta FA/BRCA está la coordinación y regulación de diferentes actividades de reparación para diferentes vías de reparación clásicas, entre las cuales se encuentran las vías de reparación de incisión de nucleótidos, de TLS, de RH. Estas vías actúan en su respectivo orden para la reparación de ICLs (Moldovan & D'Andrea, 2009). Adicionalmente, los resultados de diversos estudios han mostrado que la ruta FA/BRCA tiene una función importante en la regulación negativa de la vía de reparación de NHEJ (Adamo et al., 2010; Pace et al., 2010; Patel et al., 2011).

Regulación de la reparación por el paso de incisión de nucleótidos de la ruta FA/BRCA

En cuanto a la regulación de la reparación por incisión de nucleótidos de los ICLs, la proteína FANCP/SLX4 resulta ser esencial. FANCP funciona como modulador y cofactor para tres nucleasas SLX1, MUS81-EME1 y XPF-ERCC1,

siendo esta última la más importante para la resistencia a ICLs, dirigiendo el proceso enzimático sobre el sitio del daño (Kim et al., 2013). Una reciente publicación en la que se identificó dos pacientes AF con mutaciones en XPF/FANCD2 deja en evidencia el importante papel que cumple XPF-ERCC1 en la reparación de ICLs en el DNA (Bogliolo et al., 2013).

Por otra parte se ha visto que para la reparación de ICLs es esencial la interacción del dominio UBZ4 de FANCP con FANCD2 monoubiquitinado (FANCD2-Ub) (Yamamoto et al., 2011). En recientes publicaciones sobre FANCD2 se evidenció que esta proteína podía ser reclutada por FANCD2-Ub en el sitio del daño por medio de la interacción con su dominio UBZ4 (Kratz et al., 2010; Liu et al., 2010; MacKay et al., 2010; Smogorzewska et al., 2010).

Regulación del paso de TLS de la ruta FA/BRCA

Una vez desenganchado el ICL de una de las cadenas del DNA se activa la TLS. La TLS es uno de los mecanismos celulares para la toleración del daño del DNA y reparación post-replicación, con tendencia a generar errores. La TLS a través de la actividad de polimerasas tolerantes de error, permite a las células su replicación a partir de cadenas sencillas de DNA con lesiones sin corregir (Lehmann et al., 2007). La TLS usa DNA polimerasas especializadas de baja fidelidad para sobrepasar directamente la lesión, ya que carecen de actividad correctora 3'-5' y contienen un sitio activo sin restricciones que puede acomodar a las bases distorsionadas y sus malos apareamientos (Sale et al., 2012). Estas polimerasas TLS están recubiertas y reguladas por una modificación post-transcripcional de PCNA. PCNA es una polimerasa con factor de procesividad que recubre el DNA y funciona como una plataforma móvil para la síntesis de DNA (Hoegge et al., 2002; Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004). Tras la detención de replicación, el complejo ligasa ubiquitina E2-E3 asociado a RAD6-RAD18 interacciona con RPA unido a DNA de cadena sencilla y PCNA ubiquitinado (PCNA-Ub), reclutando así una TLS polimerasa en el sitio de la lesión del DNA.

Otra proteína a resaltar es USP1, la cual es una enzima DUB que regula el nivel de FANCD2-Ub (Nijman et al., 2005). USP1 se asocia con UAF1 y estimula su actividad enzimática (Cohn et al., 2007). El agotamiento de USP1 o

UAF1 causa hiperacumulación tanto FANCD2-Ub y PCNA. Por lo tanto, USP1 controla el estado de monoubiquitinación de estas dos importantes proteínas que trabajan en la ruta FA/BRCA y TLS (Howlett et al., 2009; Oestergaard et al., 2007). Ello sugiere que ambas rutas están coordinadas por la acción concertada de la ubiquitinación y deubiquitinación de FANCD2 y PCNA.

Regulación del paso de la RRH de la ruta FA/BRCA

Después de la incisión de la región que flanquea de la ICL en una de las cadenas de DNA, se crea un DSB como un producto intermedio del proceso de reparación del ICL. En este punto se activa la RRH, la cual utiliza la cadena de DNA homóloga restaurada por TLS como molde para reparar la otra cadena de DNA. Muchos factores de la ruta FA/BRA están implicados en la promoción directa e indirecta de la RRH. Interesantemente, la mayoría de las proteínas que interactúan posterior a la activación del complejo ID están implicadas en RH, entre estas proteínas están FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP1/BACH1, FANCD2/PALB2 y FANCD3/RAD51C.

BRCA1 tiene un papel importante en el proceso de RRH en la reparación de ICLs, ya que promueve el recubrimiento de la cromatina por FANCD2-Ub en una etapa temprana (Bogliolo et al., 2007) y de RAD51 en una etapa posterior de la reparación del ICLs (Lu et al., 2005). La función principal de BRCA2 en la RRH es regular la localización de RAD51 en la cromatina, promoviendo el recubrimiento de DNA en cadenas sencillas recubiertas por RPA. RAD51 es la recombinasa que se une al DNA de cadena sencilla para iniciar la invasión de la cadena sencilla sobre la cadena doble de DNA durante el proceso de recombinación.

Se ha descrito que PALB2 interacciona con BRCA2 regulando su localización nuclear y su estabilidad (Xia et al., 2006). A su vez, BRCA1 es un regulador de BRCA2 en respuesta al daño y PALB2 sería el puente entre estas dos proteínas (Zhang et al., 2009).

FANCI/BRIP1 depende de BRCA1 para formar focos en el sitio del daño y dicha interacción depende de la previa fosforilación de FANCI en la serina 990 que se produce en fase S y G2 del ciclo celular (Yu et al., 2003). FANCI contiene un dominio helicasa DEAH, de forma que es capaz de desenrollar la

doble cadena de ADN moviéndose a lo largo de la hebra gracias a su capacidad de hidrolizar ATP (Cantor et al., 2001; Hiom, 2010b). FANCD1 también interacciona directamente con las proteínas del complejo MutLα de MMR, MLH1 y PMS2; aunque la implicación de las proteínas de MMR en la ruta de reparación de ICLs no es clara (Ali et al., 2009).

Finalmente, mutaciones en homocigosis en el gen *XRCC2*, un gen de susceptibilidad a cáncer de mama, han sido identificados en un paciente AF Saudi (Shamseldin et al., 2012). Aunque de este estudio no se puede concluir que este gen sea un nuevo gen AF.

La figura 4 esquematiza los diferentes pasos implicados en la reparación de los ICLs por medio de la ruta FA/BRCA.

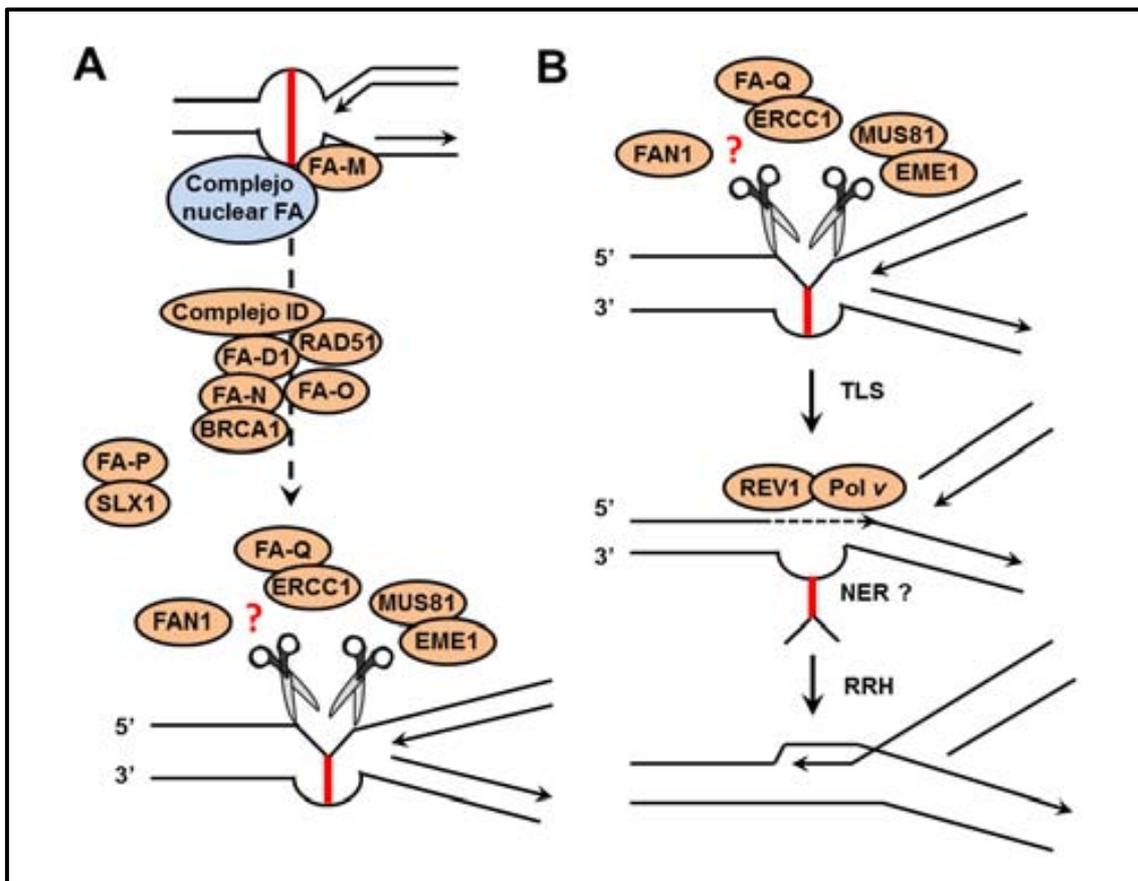


Figura 4. Reparación de ICLs por la ruta FA/BRCA. (A) El reconocimiento y localización en el sitio del daño por FANCD1/FANCD2 (durante la fase S) y su posterior activación del complejo nuclear FA permite activar la ruta por la FANCD2-Ub lo cual activa proteínas por debajo del complejo ID. **(B)** El proceso de reparación de los ICLs se da por diferentes pasos de reparación de la ruta FA/BRCA.

Relación entre la ruta FA/BRCA y la ruta NHEJ

La ruta FA/BRCA no solo promueve la RH, sino también suprime la NHEJ, otro mecanismo de reparación de rupturas de doble cadena. Estudios llevados a cabo en paralelo por Adamo y colaboradores y Pace y colaboradores demostraron en trabajos paralelos publicados como el fenotipo AF podía ser rescatado por inhibición de la vía NHEJ (Adamo et al., 2010; Pace et al., 2010). En la figura 5 se esquematiza los efectos de los ICLs a nivel celular con una ruta FA/BRCA defectuosa.

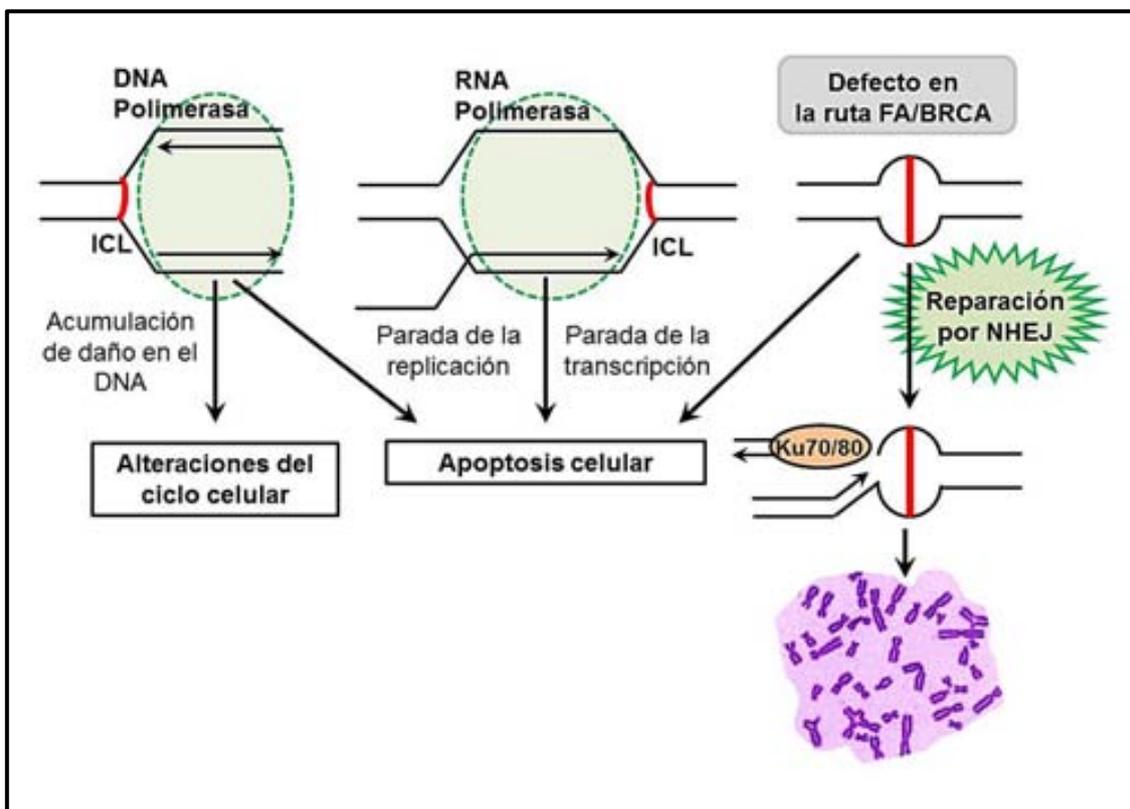


Figura 5. Efectos de los ICLs a nivel celular con la ruta FA/BRCA defectuosa. Ante la ausencia de la actividad reparadora de la ruta FA/BRCA, el daño generado en el DNA por los ICLs puede ser reparado por NHEJ generando rupturas cromatídicas o figuras radiales a nivel cromosómico.

1.2.4. Sobre la proteína FANCA

Esta proteína es el producto de un gen de 5451pb, constituido por 43 exones, que está ubicado en la región 16q24.3. FANCA pesa alrededor de 163 kDa y está constituida por 1455 aa, que se encuentran conservados hasta

vertebrados inferiores. Los diferentes dominios y zonas susceptibles de fosforilación se muestran en la figura 6B.

A pesar de que FANCA no presenta secuencias de homología que se pueden asignar a una función molecular, se han descrito diversas interacciones con otras proteínas (ver figura 6A). En este sentido, FANCA tiene un dominio de unión a FANCG que se solapa con la región NLS (Waisfisz et al., 1999), una región de interacción con la proteína FAAP20 entre los residuos 1095 y 1200 (Yan et al., 2012) y una región para la interacción con BRCA1 a través de la parte central de la proteína entre los residuos 740 y 1083 (Folias et al., 2002).

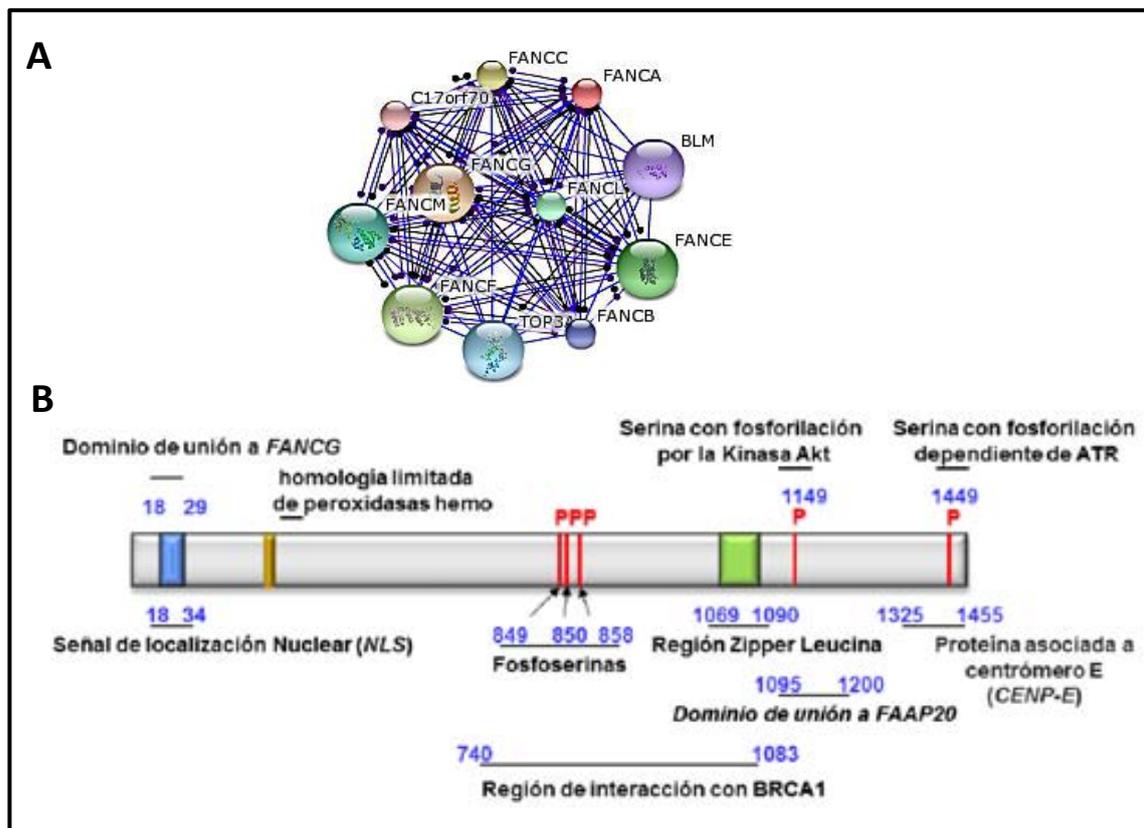


Figura 6. Proteína FANCA. (A) Esquema tomado de la página web: <http://string-db.org/>. (B) Estructura tomada de la página web: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/FA11D102.html>. Tomado en Julio de 2013.

A través de diferentes complejos FANCA puede interactuar con otras proteínas tales como la alfa espectrina II, el complejo SWI / SNF o la helicasa BLM y otras proteínas asociadas a este complejo (McMahon et al, 1999; Otsuki et al, 2001; Meetei et al., 2003). FANCA se fosforila normalmente por ATR-CHK1 en la serina 1449 en un proceso que se requiere para la formación del complejo

nuclear AF (Collins et al., 2009). Adicionalmente, FANCA posee una secuencia de consenso para la cinasa Akt cerca de la serina 1149 y su fosforilación puede actuar como un regulador negativo (Otsuki et al., 2002).

Esta proteína tiene localización citoplasmática y nuclear. A nivel citoplasmático FANCA forma un complejo con FANCG, a través de su región N-términal (que incluye la señal de localización nuclear). También se une a ella FANCC y la fosforilación de FANCA podría estar induciendo su translocación en el núcleo (García-Higuera et al., 2000; Kruyt et al., 1999). Este subcomplejo translocado en el núcleo va unirse con otras proteínas AF que están presentes allí como FANCE y FANCF y así va formando el complejo nuclear AF (de Winter et al., 2000; Kee y D'Andrea, 2010). La demás parte del proceso ya fue comentado anteriormente. Solo queda por decir, que mutaciones bialélicas en FANCA no permiten la monoubiquitinación del complejo ID y genera inactivación de la ruta FA/BRCA.

Por otra parte, una reciente publicación indica que la inactivación de la ruta FA/BRCA es completa tanto en los pacientes que expresan formas alteradas de la proteína FANCA (debido a mutaciones de cambio de sentido), como los que no expresan la proteína (debido a mutaciones truncadoras) (Castella et al., 2011a). Así mismo ninguna de las formas de FANCA mutadas conserva la capacidad de entrar o de permanecer en el núcleo de una forma similar a la proteína WT, por lo cual sugieren los autores que dichos resultados podrían explicar la patogenicidad de estas mutaciones no truncadoras (Castella et al., 2011a).

1.2.5. Sobre las otras proteínas AF

La existencia de las 16 proteínas AF y otras proteínas asociadas dan una idea global de la complejidad molecular de esta vía de reparación. En la tabla 2 se presentan las proteínas AF identificadas hasta este momento, con sus respectivas características moleculares.

Gen	Proteína (kDa)	Proteína (aa)	Dominios conocidos	Localización subcelular	Conservación	Referencias
FANCA	163	1455	NLS	Núcleo y citoplasma	Vertebrados inferiores	(Lo Ten Foe <i>et al.</i> 1996)
FANCB	95	859	NLS	Núcleo y citoplasma	Vertebrados inferiores	(Meetei <i>et al.</i> 2004a)
FANCC	63	558	Sin dominios conocidos	Núcleo y citoplasma	Vertebrados inferiores	(Youssofian 1994)
FANCD1 / BRCA2	380	3418	Repeticiones BRC OB1, OB2 y OB3	Núcleo, citoplasma	Vertebrados inferiores	(Jensen <i>et al.</i> 1996; Baer y Lee 1998)
FANCD2	155	1471	Sin dominios conocidos	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Timmers <i>et al.</i> 2001; Castillo <i>et al.</i> 2003)
FANCE	60	536	NLS	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Pace <i>et al.</i> 2002)
FANCF	42	374	Sin dominios conocidos	Núcleo	Vertebrados inferiores	(de Winter <i>et al.</i> 2000c)
FANCG	68	622	Repeticiones Tetratricopeptido (TPRs)	Núcleo y citoplasma	Vertebrados inferiores	(Blom <i>et al.</i> 2004)
FANCI	150	1328	Sin dominios conocidos	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Smogorzewska <i>et al.</i> 2007)
FANCI / BRIP1	130	1249	Dominio ATPasa, dominio helicasa DEAH, NLS, Dominio FeS, dominio de interacción con BRCA1 y MLH1.	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Cantor <i>et al.</i> 2001)
FANCL	52	375	Dominios WD40, dedo de Zn tipo PHD	Núcleo, membrana nuclear y citoplasma	Invertebrados	(Meetei <i>et al.</i> 2004b)
FANCM	250	2048	Dominio ATPasa/Helicasa y dominio endonucleasa ERCC4-like	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Meetei <i>et al.</i> 2005)
FANCN/PALB2	131	1186	Dominios WD40	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Xia <i>et al.</i> 2006)
FANCO/RAD51C	42	376	Dominio ATPasa, NLS.	Núcleo, región perinuclear, citoplasma y mitocondria.	Vertebrados inferiores	(Vaz <i>et al.</i> 2010)
FANCP/SLX4	200	1834	Dominio endonucleasa 5', dominio UBZ4	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Kim <i>et al.</i> 2011; stoepker <i>et al.</i> 2011)
FANQQ/XPF	104	916	Dominio endonucleasa	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Bogliolo <i>et al.</i> , 2013)

Tabla 2. Propiedades de cada una de las proteínas AF. Tamaño, dominios conocidos, localización y conservación evolutiva de cada una de las proteínas.

En cuanto a las proteínas asociadas a la ruta FA/BRCA, están implicadas en diferentes funciones unas forman parte del complejo nuclear AF y son necesarias para su activación, y otras proteínas son requeridas para el funcionamiento de la ruta posterior a su activación como son BRCA1 y H2AX. En la tabla 3 se presentan las diferentes proteínas asociadas a la ruta, y/o que son relevantes para la misma.

Proteína	Proteína (kDa)	Dominios conocidos	Localización subcelular	Gen	Localización	Referencias
BRCA1	208	Dominio dedo de Zinc tipo RING, Dominio BRCT	Núcleo	<i>BRCA1</i>	17q21	(García-Higuera et al. 2001)
PCNA	36	No conocidos	Núcleo	<i>PCNA</i>	20pter-p12	(Howlett et al., 2009)
H2AX	17	Dominio [ST]-Q	Núcleo	<i>H2AX</i>	11q23.3	(Bogliolo et al., 2007)
RAD51	37	No conocidos	Núcleo, citoplasma, región perinuclear y matrix mitocondrial	<i>RAD51</i>	15q15.1	(Hussain et al. 2004)
FAN1	114	Dominio UBZ4	Núcleo	<i>FAN1</i>	15q13.2-q13.3	(Kratz et al, 2010; Liu et al, 2010; MacKay et al, 2010; Smogorzewska et al, 2010)
FAAP24	24	Dominio endonucleasa a ERCC4-like	Núcleo	<i>C19orf40</i>	19q13.11	(Ciccia et al. 2007)
FAAP100	100	Cremallera de leucina	Núcleo y citoplasma	<i>C17orf70</i>	17q25.3	(Ling et al. 2007)
FAAP20	93	Anillo en dedo de ZINC tipo UBZ	Núcleo	<i>C1orf86</i>	1p36.33	1200 (Ali et al., 2012)
HES1	30	Dominio Orange y dominio bHLH	Núcleo	<i>HES1</i>	3q29	(Tremblay et al. 2008)

Tabla 3. Proteínas identificadas con función relevante dentro de la ruta FA/BRCA. Proteínas asociadas al complejo AF (FAAPs), proteínas implicadas en el proceso de reparación de ICLs.

Vale la pena resalta FANCI/ BRIP1 (Proteína de interacción con BRCA1), ya que una parte del trabajo hablara de pacientes que presentan mutaciones en el gen que codifica para esta proteína. Este gen es un miembro de la familia RecQ helicasa DEAH. Cabe destacar, que al igual que FANCA, puede interactuar con otras proteínas a través de diferentes complejos (ver figura 7). En la figura 7 se esquematizan los diferentes dominios que posee, entre los cuales se resalta sus dominio de interacción de interacción con BRCA1 y MLH1. FANCI/BRIP1 interactúa con el dominio BRCT de BRCA1. Este complejo es importante en la función de la reparación de rupturas de doble cadena. También interactúa directamente con las proteínas del complejo de reparación MMR MutL α (MLH1 y PMS2), aunque el mecanismo implicado en la reparación de ICLs no está aún claro (Ali et al., 2009; Hiom, 2010b).

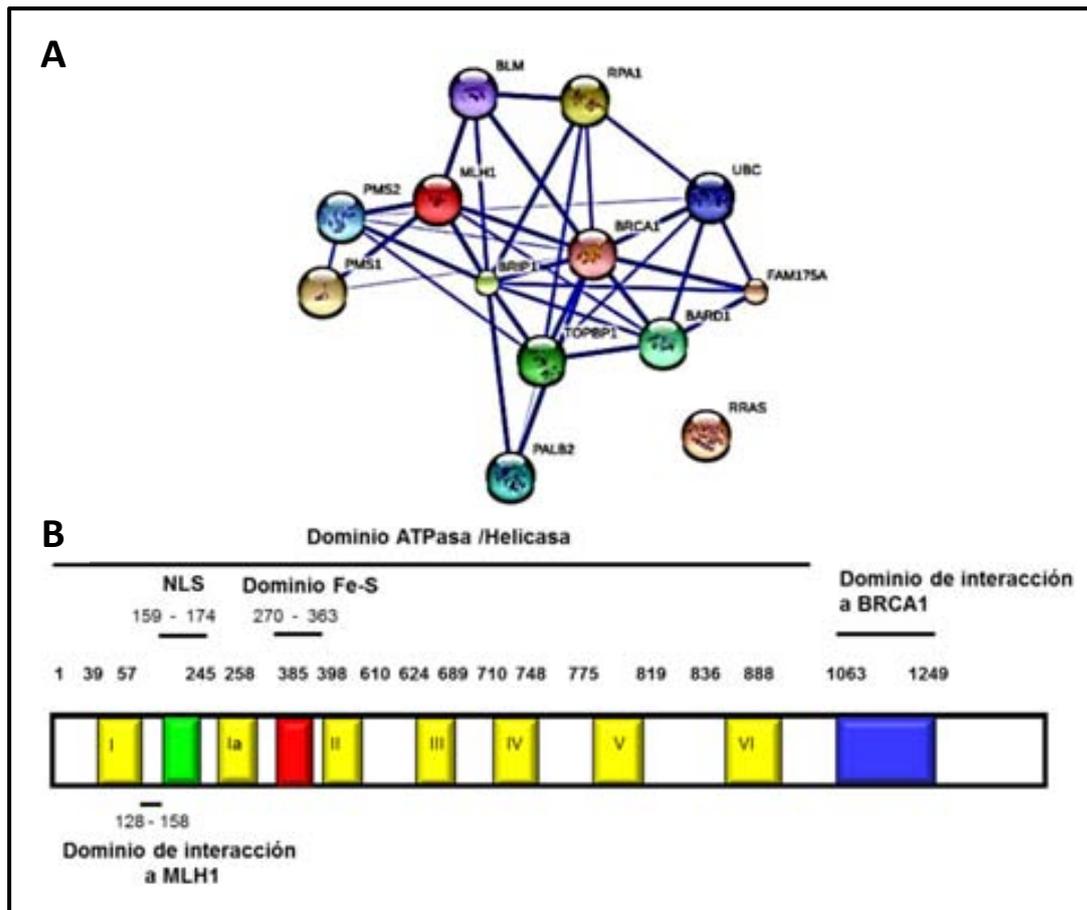


Figura 7. Interacciones de FANCJ/BRP1. (A) Esquema tomado de la página web: <http://string-db.org/>. (B) Estructura de la proteína FANCJ/BRP1 con sus diferentes dominios y zonas de interacción (Wu & Brosh, 2009).

1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA AF

La AF es una enfermedad hereditaria de patrón recesivo mayoritariamente autosómico y en un caso ligado al cromosoma X (*FANCB*). Considerada hasta el momento como una enfermedad rara ya que su prevalencia en la población general está estimada a ser de 1 a 5 en un millón de habitantes, con una tasa de incidencia al nacimiento de al menos 1/131.000 y una frecuencia de portadores estimada en 1/181 en los Estados Unidos, según un último estudio que incluyó los nuevos casos reportados (Rosenberg et al., 2011). Sin embargo estas estimaciones no se pueden hacer a nivel mundial debido a que el número total de pacientes con AF no está documentado en muchos países (Rosenberg et al., 2011). España con una población actual de unos 47 millones de habitantes tiene 157 pacientes AF inscritos en el registro de la Red nacional AF, lo cual permite hacer unas estimaciones similares a las estadounidenses.

En algunas poblaciones, con una alta carga de consanguinidad, la frecuencia de portadores es mucho mayor, debido a la presencia de mutaciones fundadoras. En este aspecto, se ha identificado que la población gitana española presenta la frecuencia estimada de portadores más alta, 1/64 a 1/70 (Callén et al., 2005).

Por otra parte la AF es una enfermedad genotípica y fenotípicamente heterogénea, que se produce por igual en hombres y mujeres. La relación hombre:mujer (incluyendo todos los grupos étnicos) fue estimada entre 1.1 a 1.2:1, respectivamente, con excepción de los pacientes FA-B que son exclusivamente hombres (Auerbach, 2009; Neveling et al., 2009; Rosenberg et al., 2011).

1.3.1. Malformaciones congénitas

Aunque actualmente la AF se considera una enfermedad principalmente hematológica, esta puede afectar a todos los sistemas corporales la predisposición a desarrollar cáncer. Entre estas otras afecciones se han identificado un amplio espectro de malformaciones congénitas en un rango de ninguna a muchas. A su vez, estas malformaciones pueden clasificarse en malformaciones congénitas mayores y menores. Las primeras han sido reportadas en 2/3 de los pacientes mientras que un 1/3 no presentan malformaciones congénitas. En estos pacientes sin malformaciones congénitas el diagnóstico es hecho posterior al presentar síntomas de disfunción hematológica. Los primeros síntomas de la AF pueden ser astenia, adinamia, fatiga, infecciones recurrentes, hemorragias nasales (epistaxis) o equimosis con facilidad. Los análisis de sangre pueden revelar los primeros signos: bajos recuentos de leucocitos, eritrocitos, plaquetas u otras anomalías hematológicas. Algunas veces un síndrome mielodisplásico (SMD), una leucemia mieloide aguda (LMA) o cáncer (principalmente de tipo carcinoma de células escamosas) es la primera señal de AF. A nivel de la biología del desarrollo, las anomalías congénitas en pacientes AF puedan ser unilaterales como bilaterales. La presencia de anomalías congénitas unilaterales sugiere que un defecto en la ruta FA/BRCA no es suficiente para

causar una alteración en el desarrollo, pero este aumenta dramáticamente la probabilidad para que este ocurra (Auerbach, 2009).

Malformaciones congénitas mayores

Hace referencia a las malformaciones que producen una disfuncionalidad notoria en el individuo, y en el contexto del fenotipo AF pueden involucrar el sistema nervioso central, el sistema gastrointestinal y el sistema esquelético. La asociación VACTERL (acrónimo que hace referencia a anomalías vertebrales, atresia anal, anomalías cardíacas, fistula traqueo-esofágica, anomalías renales y anomalías radiales de las extremidades) y pueden incluir hidrocefalos (VACTERL-H), la cual se diagnostica por la presencia de una combinación de 3 o más anomalías congénitas, representa un 5% de los pacientes AF (109/2,246 casos reportados desde el 1927 a 2012) (Alter & Rosenberg, 2012; Bogliolo et al., 2013). En la figura 8 se presenta el porcentaje de pacientes AF identificados con clínica de la asociación VACTERL de acuerdo a los diferentes subtipos de esta patología. De estos 109 pacientes, sólo 44 han sido subtipados, siendo los grupos más frecuentes el FA-B con 20%, FA-A con 18%, el FA-D1 con 14% y el FA-D2 con 11%. Dentro de estos datos se ha incluido el paciente con fenotipo VACTERL de los dos pacientes reportados recientemente en el nuevo grupo de complementación FA-Q (Bogliolo et al., 2013). Es importante tener presente este fenotipo VACTERL cuando se está estudiando casos con alteraciones hematológicas, ya que casos severos de VACTERL-H y de síndromes como el de Baller-Gerold han sido reclasificados diagnósticamente como AF después de presentar un fallo de médula ósea y tener un ensayo de fragilidad cromosómica positivo (Auerbach, 2009).

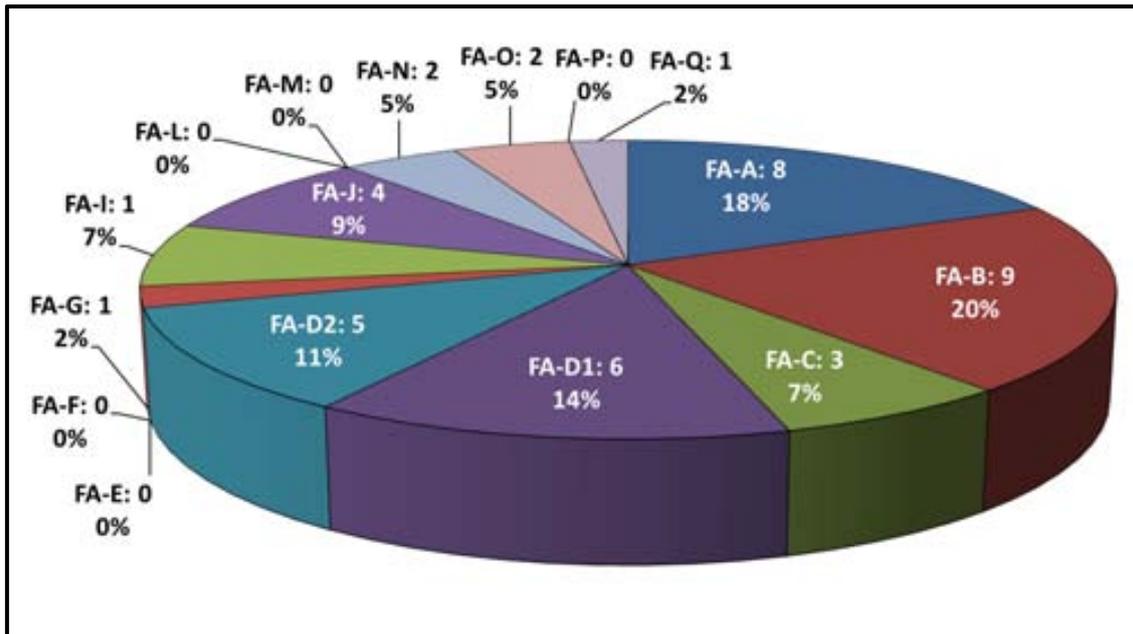


Figura 8. Pacientes AF subtipados con asociación VACTERL. 44 pacientes AF subtipados de los 108 reportados en la literatura con fenotipo VACTERL. El 75% de los pacientes FA-B (9 de 12) tenían un fenotipo VACTERL, mientras que sólo el 3.5% de los 227 pacientes FA-A presentaban un fenotipo VACTERL ($p=0.007$) (Alter & Rosenberg, 2012).

Entre las malformaciones congénitas mayores más frecuentes están las anomalías esqueléticas de las extremidades superiores y las anomalías evolutivas del tracto genital masculino, seguidas de las anomalías oculares y renales (ver tabla 4). Los problemas esqueléticos más habituales afectan al pulgar y al borde radial del antebrazo. El pulgar puede estar presentar algún grado de hipoplasia (ser más pequeño) con diferentes grados de afectación hasta la ausencia (ver figura 9), o presentar un hueso adicional o estar duplicado (polidactilia preaxial) (ver tabla 4) (Kozin, 2008).

Tipo	Características clínicas
I	Hipoplasia menor generalizada
II	A. Ausencia de músculos tenares intrínsecos B. Estrechamiento del espacio entre el pulgar y el índice C. Insuficiencia del ligamento colateral cubital (LCC)
III	Observaciones similares al tipo II, además de: anomalías extrínsecas del músculo y tendón Déficit óseo: A. Articulación carpometacarpiana estable B. Articulación carpometacarpiana inestable
IV	<i>Pouce flottant</i> o pulgar flotante
V	Ausencia

Tabla 4. Clasificación de las hipoplasias del pulgar. Tomado de los lineamientos para diagnóstico y manejo de la AF, capítulo 5 (Kozin, 2008).

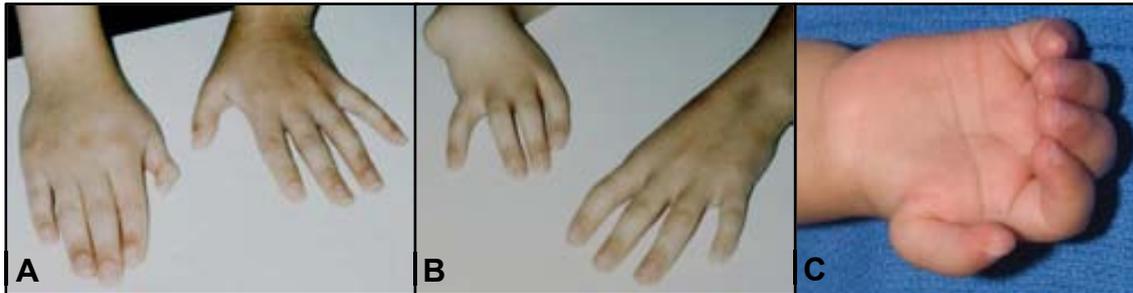


Figura 9. Diferentes tipos de hipoplasias de pulgar. (A) Hipoplasia de pulgar tipo II en un paciente de 15 años. **(B)** Hipoplasia de pulgar tipo IV en un paciente de 15 años. **(C)** Hipoplasia de pulgar tipo V en un paciente de 1 año de edad. Imagen tomada de los lineamientos para diagnóstico y manejo de la AF, capítulo 5, (Kozin, 2008) . Imágenes A y B tomadas de la publicación “*Fanconi anemia and its diagnosis*” (Auerbach, 2009).

El grado de hipoplasia del pulgar varía y no es consistente entre los niños con AF, puede representar una ligera hipoplasia del pulgar (tipo I) sin ausencia específica de estructuras y pasar desapercibida. Pero también puede implicar más afectación como anomalías del músculo tenar e inestabilidad de la articulación metacarpofalángica (tipo II y III) (ver tabla 4.) (Kozin, 2012; Papadogeorgou & Soucacos, 2008; Soldado et al., 2013).

La duplicación del pulgar, es otra anomalía presente, aunque menos frecuente. Esta anomalía involucra no sólo los elementos óseos, sino también otros tejidos como tendones, ligamentos, articulaciones y estructuras neurovasculares. Su clasificación tiene en cuenta la extensión de la duplicación y si los componentes están unidos próximamente (bífido) o están duplicados (ver tabla 5) (Kozin, 2008; Tonkin, 2012).

Tipo	Elementos duplicados
I	Falange distal bífida
II	Falange distal duplicada
III	Falange bífida normal
IV	Falange proximal duplicada
V	Falange metacarpal bífida
VI	Falange metacarpal duplicada
VII	Componente trifalángico

Tabla 5. Clasificación de las duplicaciones del pulgar. Su clasificación depende del grado de replicación esquelética. Tomado de los lineamientos para diagnóstico y manejo de la AF, capítulo 5 (Kozin, 2008).

De todos modos las anomalías del pulgar no son las únicas que suelen presentarse en estos pacientes, sino que hay una amplia variedad de alteraciones que pueden implicar uno o más dedos de las manos y de los pies. De modo similar el radio puede verse acortado, con diferentes grados de hipoplasia hasta la ausencia y su grado de severidad se basa en la interpretación de imágenes radiográficas (ver tabla 6) (Kozin, 2008; Launay et al., 2008). Cabe resaltar que como la osificación del radio se retrasa en la deficiencia radial, la diferenciación entre la ausencia total y parcial (tipos III y IV) no puede establecerse hasta aproximadamente los tres años de edad. En niños con AF, es común observar la ausencia completa del radio junto con ausencia del pulgar, tal como el caso ilustrado en la figura 10.

Tipo	Observaciones radiográficas	Características clínicas
I Radio corto	Epífisis distal radial retrasada en apariencia. Epífisis proximal radial normal. Ligeramente acortamiento del radio sin arqueamiento del cúbito.	Desviación radial menor de la mano. La hipoplasia del pulgar es la característica clínica más importante que requiere tratamiento.
II Hipoplasia	Epífisis distal y proximal presente. Crecimiento anómalo en ambas epífisis. Mayor densidad, acortamiento y arqueamiento del cúbito.	Radio en miniatura. Desviación radial moderada de la mano
III Ausencia parcial	Ausencia parcial (distal, media, proximal) del radio. La ausencia distal 1/3-2/3 es la más común. Mayor densidad, acortamiento y arqueamiento del cúbito.	Desviación radial severa de la mano
IV Ausencia total	Radio ausente. Mayor densidad, acortamiento y arqueamiento del cúbito.	Tipo más común. Severa desviación radial de la mano.

Tabla 6. Clasificación de la deficiencia radial. La gravedad de la deficiencia radial se gradúa de I a IV y se basa en la interpretación de radiografías. Tomado de los Lineamientos para diagnóstico y manejo de la AF, capítulo 5 (Kozin, 2008).



Figura 10. Deficiencia radial tipo IV. Fotografía (A) y radiografía (B) clínicas de un niño de ocho años de edad, con ausencia total del radio izquierdo, en el cual se observa una alineación perpendicular entre la mano y el antebrazo. Imágenes tomadas de los Lineamientos para diagnóstico y manejo de la AF, capítulo 5 (Kozin, 2008).

Con respecto a las anomalías del desarrollo del tracto genital son más frecuentes en pacientes AF masculinos que femeninos. Entre las anomalías masculinas se incluyen el criptorquidismo, hipospadia, testículos pequeños para su edad con reducción de las células Sertoli y la espermatogénesis, y retraso del estado puberal. Entre las anomalías femeninas está el riesgo elevado de presentar útero unicorne o hemiútero (ver tabla 7) (Rose et al., 2008).

Finalmente, otras malformaciones congénitas mayores menos frecuentes están especificadas en la tabla 7. De ellas vale la pena mencionar las alteraciones gastrointestinales y las auditivas por la disfuncionalidad que producen en los pacientes.

En cuanto a las anomalías auditivas, vale la pena resaltar uno de los pocos estudios exhaustivos realizados en AF hecho en pacientes inscritos en el Registro Internacional de AF (IFAR) hasta Septiembre del 2008. En este estudio se identificó anomalías del oído en 232 de los 1,075 pacientes (21.6%). La frecuencia de anomalías fue la misma para los tres grupos de complementación más comunes (FA-A, FA-C, AF-G). Estas anomalías incluyeron anomalías morfológicas que afectaban a las estructuras del oído y/o implicaban pérdida auditiva. La pérdida auditiva, fue reportado en 126 de los pacientes con anomalías morfológicas (54.3%). Esta pérdida auditiva fue principalmente de tipo conductivo, pero también se observó de tipo neurosensorial (Auerbach, 2009). Entre las malformaciones más comunes encontradas en esta serie de pacientes, con o sin pérdida de la audición, se observó la ausencia del pabellón auricular, orejas prominentes, anomalías de la posición de las orejas, conductos auditivos pequeños o ausentes, anomalías de la membrana timpánica (ver figura 11), microtía (oreja pequeña), y fusión de los huesecillos del oído medio (Auerbach, 2009). Estos resultados sugieren que más de la mitad de los individuos con AF padecen de pérdida auditiva principalmente de tipo conductivo leve, probablemente debido a anomalías del desarrollo del sistema auditivo. Sin embargo, estos resultados discrepan significativamente con la frecuencia de alteraciones auditivas reportadas en diferentes publicaciones (ver tabla 7) (Shimamura and Alter, 2010; Tischkowitz and Dokal, 2004), lo cual podría reflejar una subestimación de los problemas auditivos por una inadecuada valoración.



Figura 11. Anomalías del tímpano en pacientes AF. (A) Tímpano normal de un individuo sano. (B) Tímpano de un paciente AF que incluyen tímpanos más pequeños, el martillo más corto y en una ubicación anormal dentro del tímpano y la presencia de islas óseas anormales bajo el tímpano. Imágenes tomadas de los Lineamientos para diagnóstico y manejo de la AF, capítulo 8 (Kim et al., 2008).

Entre las anomalías anatómicas del tracto gastrointestinas más habituales está la atresia esofágica con o sin fístula traqueo-esofágica, la atresia duodenal y la atresia anal o ano ectópico. La mayoría de las anomalías se diagnostica y se trata en las etapas tempranas de la infancia, a menudo mucho antes del diagnóstico de AF. Aunque pueden existir anomalías del tracto gastrointestinal aisladas, también pueden estar asociadas a otras anomalías congénitas, dentro de la asociación VACTERL (Schwarzenberg & Yagizi, 2008).

Malformaciones congénitas menores

Estas anomalías menores no causan una mayor disfunción o incluso pasan desapercibidas clínicamente. En este sentido, dentro del tercio de pacientes que no presentan malformaciones congénitas aparentes, es posible que puedan tener alguna malformación menor no diagnosticada. Estas anomalías pueden incluir alteraciones de los parámetros de crecimiento, de talla, de peso y microcefalia (circunferencia de la cabeza por debajo del percentil 5). Otras alteraciones comunes incluyen las hipopigmentaciones e hiperpigmentaciones de la piel (ver figura 12), hipoplasia de la eminencia tenar y microftalmia. La identificación de este espectro de anomalías menores podría permitir en algún momento ser relevantes para hacer un diagnóstico temprano de esta enfermedad. Sin embargo estos pacientes, en su mayoría, terminan siendo diagnosticados al desarrollar un fallo de la MO, un SMD, una LMA u otro tipo de cáncer. Si estos pacientes que llegan a la edad adulta tienen una

predisposición a desarrollar carcinomas de cabeza y cuello, ginecológicos, y/o cáncer gastrointestinal a una edad mucho más temprana (entre los 20 a 40 años de edad) que la población general, momento en el cual se hace el diagnóstico (Tabla 7) (Auerbach, 2009).

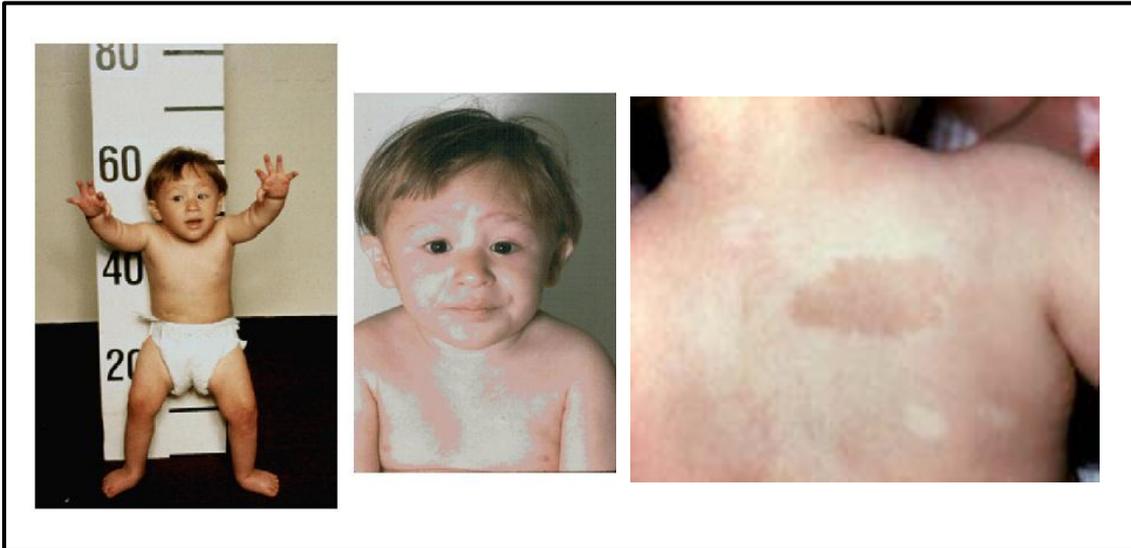


Figura 12. Paciente con anemia de Fanconi. Dentro de sus anomalías menores se observan baja estatura, microcefalia, epicanto, microftalmia, cara triangular, manchas café con leche y zonas de hipopigmentación (Shimamura & Alter, 2010).

Malformación congénitas y otras manifestaciones clínicas	Frecuencia
Alguna anomalía física	60%
Microsomía: corta estatura	40%
Dérmicas: hiperpigmentación generalizada, manchas café con leche, áreas hipopigmentadas.	40%
Malformaciones en extremidades superiores (unilateral o bilateral): Pulgares: agenesia o hipoplasia, bífido, duplicado, rudimentario, pulgar flotante, trifalangeal, de implantación baja o alta. Radio: agenesia o hipoplasia (solo con pulgares anormales), pulso débil o ausente. Manos: eminencia tenar hipoplásica, ausencia de primer metacarpo, clinodactilia, polidactilia. Cúbito: cúbito corto o displásico.	35% 35% 7% 5% 1%
Otras alteraciones esqueléticas: Cabeza: microcefalia, hidrocefalia (macrocefalia), craneosinostosis. Cara: triangular, pequeña, dismórfico, micrognatia, hipoplasia del tercio medio facial. Cuello: cabello corto, bajo y fino, síndrome de Klippel–Feil (fusión de 2 a 7 vertebras cervicales, escápula congénita alta (deformidad de Sprengel). Columna vertebral: espina bífida, escoliosis, hemivertebras, costillas anormales, aplasia coccígea.	20% 2% 1% 2%
Ojos: microftalmia, estrabismo, pliegues del epicanto, hipotelorismo, hipertelorismo, cataratas, astigmatismo.	20%
Renal: riñón en herradura, ectópico o pélvico, hipoplásico o displásico, ausente, hidronefrosis o hidroureter.	20%
Gónadas: Masculinas: hipogenitalia, criptorquidia, hipospadias, micropenes, ausencia de testículos. Femeninas: hipogenitalia, útero bicorne, malposición y ovários pequeños.	25% 2%
Retraso en el desarrollo: retardo mental, retraso en el desarrollo.	10%
Oído: sordera (usualmente conductiva), oído displásico, atrésico, con forma anormal, canal auditivo estrecho, oído medio anormal.	10%
Cardiopulmonar: cardiopatía congénita, ductos arterioso patente, defecto septal atrial, defecto septal ventricular, coartación, situs inversus, truncus arterioso.	6%
Bajo peso al nacer	5%
Extremidades inferiores: Dedos: sindactilia de los dedos del pie, pie zambo. Piernas: dislocación congénita de cadera.	5%
Gastrointestinal: atresia (esófago, duodeno, yeyuno), ano imperforado, fístula traqueoesofágico, páncreas anular, malrotación.	5%
Sistema nervioso central: pituitaria pequeña, síndrome de interrupción del tallo pituitario, cuerpo calloso ausente, hipoplasia cerebelar, hidrocefalo, ventrículos dilatados.	3%

Tabla 7. Hallazgos físicos reportados en pacientes AF. Manifestaciones clínicas en pacientes con AF y su respectiva frecuencia de presentación (Shimamura & Alter, 2010).

1.3.2. Alteraciones hematológicas

Generalmente, los pacientes con AF desarrollan un cierto grado de disfunción de la médula ósea, que va desde citopenias leves asintomáticas en cualquiera de los linajes hematológicos hasta anemia aplásica severa, síndrome mielodisplásico (SMD) o leucemia mieloide aguda (LMA). Sin embargo, la ausencia de fallo medular no descarta el diagnóstico de la AF (Shimamura, 2008). La mayoría de los pacientes con AF presentan macrocitosis [volumen corpuscular media (VCM) alto para su edad] en la infancia o niñez temprana. Las anormalidades hematológicas se presentan en casi todos los pacientes AF españoles a una edad media de 7 años (Castella et al., 2011a). Con base en los datos clínicos en el IFAR (n = 754 pacientes hasta Septiembre del 2008), la incidencia acumulada de fallo de médula ósea para los 40 años fue del 90% (Auerbach, 2009). Los hallazgos hematológicos iniciales en esta serie de pacientes fueron diversos. La trombocitopenia a menudo estaba asociada con niveles elevados de hemoglobina fetal y macrocitosis, y por lo general precedido la aparición de la anemia o la neutropenia (Auerbach, 2009).

La mejor manera de evaluar la celularidad medular es mediante una biopsia de médula ósea. La celularidad medular debe interpretarse en el contexto de recuentos de sangre periférica, ya que la celularidad medular está sujeta a variaciones de la técnica de muestreo. Es muy útil seguir las tendencias en la celularidad medular y los recuentos de sangre periférica en el transcurso del tiempo. A pesar que muchos pacientes desarrollan una anemia aplásica manifiesta, otros pueden permanecer a niveles ligeramente anormales indefinidamente. La insuficiencia (aplasia) medular se manifiesta clínicamente con conteos sanguíneos por debajo de las normas apropiadas a la edad debido a una disminución de la eficacia de la hematopoyesis medular. La clasificación por grados de severidad de la insuficiencia medular se presenta en la tabla 8. Cabe resaltar en este punto que para que estos criterios sean correctamente aplicados a la clínica, las citopenias deberán ser persistentes y no secundarias a otra causa tratables, tales como infección, medicamentos, destrucción o pérdida de sangre periférica o deficiencias nutricionales (Shimamura, 2008).

Parámetros	Leve	Moderada	Grave
Recuento de Neutrófilos absolutos	<1,500/mm ³	<1,000/mm ³	<500/mm ³
Plaquetas	150,000-50,000/mm ³	<50,000/mm ³	<30,000/mm ³
Hb	≥8 g/L*	<8 g/L	<8 g/L

Tabla 8. Clasificación de la insuficiencia de médula ósea. Consenso de clasificación de las insuficiencias medulares en tres amplias categorías dependiendo del grado de citopenias y niveles de Hb. * Menor que la normal para la edad pero mayor de 8 g/dL (Shimamura, 2008).

La intervención terapéutica no deberá estar basada solamente en la celularidad medular si no existen citopenias periféricas clínicamente significativas o evidencia de un proceso mielodisplásico o maligno (Shimamura, 2008).

De los 754 pacientes analizados, 120 (16%) pacientes experimentaron SMD y/o LMA. La incidencia acumulada de SMD o LMA a los 40 años de edad fue del 33%. Basado en un estudio de pacientes con AF realizadas Rosenberg y colaboradores, la edad media para la aparición de la leucemia fue a los 11.3 años (Rosenberg et al., 2003).

La presencia de anomalías citogenéticas clonales en médula ósea se hacen cada vez más frecuentes con el aumento de la edad. El riesgo estimado de identificar anomalías citogenéticas clonales en el momento de fallo de médula es del 67% a los 30 años de edad (Butturini et al., 1994). Entre las anomalías clonales más frecuentes observadas están las duplicaciones y triplicaciones 1q, el reordenamiento +3q y la monosomía 7 o 7q-. Las supresiones de 5q, 11q, los reordenamientos de 6p, y las ganancias de los cromosomas 8 y 21, también fueron observado por diferentes grupos (Tönnies et al., 2003). Un ejemplo de anomalías clonales en pacientes AF se ilustra en la figura 13.

En un estudio llevado a cabo en una serie de 46 pacientes AF con leucemia comparado con 559 LMA de novo evidencian que reordenamientos como +1q, +3q, -7, 7q-, +20q son muy frecuentes en estos pacientes AF, mientras que reordenamientos como t(8;21), t(9;11), t(6;9), e inv(16) y la trisomía 8 fueron solo halladas en las LMA de novo (Rochowski et al., 2012). Interesantemente, los reordenamientos cromosómicos observados en la LMA de pacientes AF muchas veces son diferentes a los vistos en pacientes no AF con LMA.

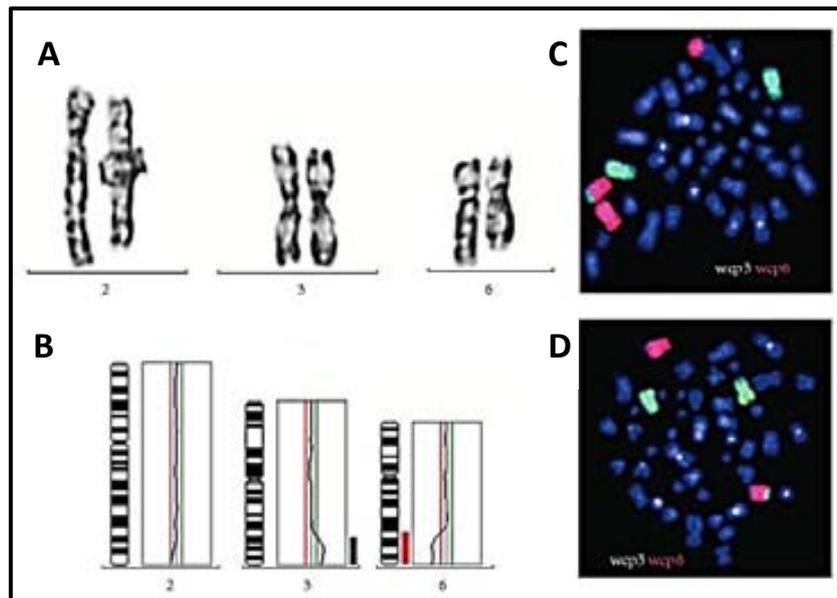


Figura 13. Aberraciones 3q asociadas a AF. (A) Citogenética convencional llevada a cabo en los cromosoma 2, 3, y 6. (B) la CGH convencional muestra una ligera desviación en 2q, una ganancia de 3q25 a 3qter, y una pérdida de material del 6q23 a 6qter. (C) y (D) El FISH con sondas específicas wcp3 (verde) y wcp6 (rosa) (Meyer et al., 2012).

1.3.3. Disfunciones endocrinas

Muchos de los niños y adultos con AF tienen problemas endocrinos. Entre ellos se incluye talla baja, deficiencia de la hormona del crecimiento, hipotiroidismo, retraso de la pubertad, osteopenia u osteoporosis y alteraciones del metabolismo de la glucosa o de la insulina (lo que conduce a deficiencias en la tolerancia a la glucosa o diabetes mellitus) (Rose et al., 2008). La talla baja es una característica bien reconocida en AF y es a menudo secundaria a deficiencias hormonales, como la hipofunción hipofisaria con hipogonadismo, la deficiencia de la hormona de crecimiento, la disfunción tiroidea, la deficiencia de insulina o resistencia a la insulina con intolerancia a la glucosa. La AF se asocia generalmente con alteraciones del crecimiento tanto prenatal como postnatal. La media de la talla, el peso y la circunferencia de la cabeza de los pacientes de AF en el IFAR está cerca al percentil 5. Un estudio prospectivo llevado a cabo en 54 pacientes AF del IFAR (30 hombres y 24 mujeres) de 47 familias no emparentadas, mostraron que las endocrinopatías son una característica común de estos pacientes, que se manifiesta principalmente con

alteraciones de la glucosa/insulina, deficiencia de la hormona de crecimiento e hipotiroidismo (Wajnrajch et al., 2001).

Aunque la talla baja es muy frecuente en pacientes con AF, los pocos estudios llevados a cabo en este aspecto muestran que los pacientes con alguna disfunción endocrina tienen más probabilidad a tener talla baja. Estos datos indican que la baja estatura es una característica integral de la AF, pero que la adición de endocrinopatías magnifica el retraso del crecimiento de manera significativa en estos pacientes (Auerbach, 2009; Rose et al., 2012).

El hallazgo de la deficiencia de la secreción de la hormona del crecimiento endógena puede sugerir una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario subyacente que se traduce en un pobre crecimiento. Dado que la corrección de la deficiencia de la hormona de crecimiento o de la hormona tiroidea puede mejorar la talla final y la calidad de vida del paciente, y que los pocos estudios realizados identificaron alguna disfunción endocrina en pacientes AF en un porcentaje >70% (Auerbach, 2009; Rose et al., 2012), se recomiendan evaluaciones endocrinas para todos los pacientes con AF a una edad más temprana, antes del uso de andrógenos y si es posible del TPH (Auerbach, 2009).

Por otra parte, en estos estudios se identificó que el 65% de los pacientes AF peripuberales o pospuberal mostraban algún tipo de disfunción gonadal. En este aspecto se ha observado que la infertilidad también es común en AF, aproximadamente la mitad de todas las mujeres con AF son infértiles y la menopausia generalmente comienza durante la cuarta década. Sin embargo, un 15% de las mujeres AF, citadas en publicaciones y/o inscritas en la IFAR (hasta el 2008), que llegaron a sus 16 años de edad y que no estaban recibiendo terapia con andrógenos tuvieron al menos un embarazo (Alter et al., 1991b; Auerbach, 2009). Cabe resaltar que en los casos en los que el embarazo fue posible, se asociaron a menudo complicaciones significativas, tales como una rápida y marcada progresión de aplasia medular (ver figura 14), preeclampsia y parto prematuro. Por el contrario, los hombres AF son muy raramente fértiles y hay muy pocos casos reportados de varones afectados que tengan descendencia. Las malformaciones genitales y las hipoplasias gonadales son hallazgos comunes en los hombres con AF. Los resultados de los análisis de semen normalmente revelan ausencia o muy bajo número de

espermatozoides, así como alteraciones de la espermatogénesis (Auerbach, 2009; Liu et al., 1991).

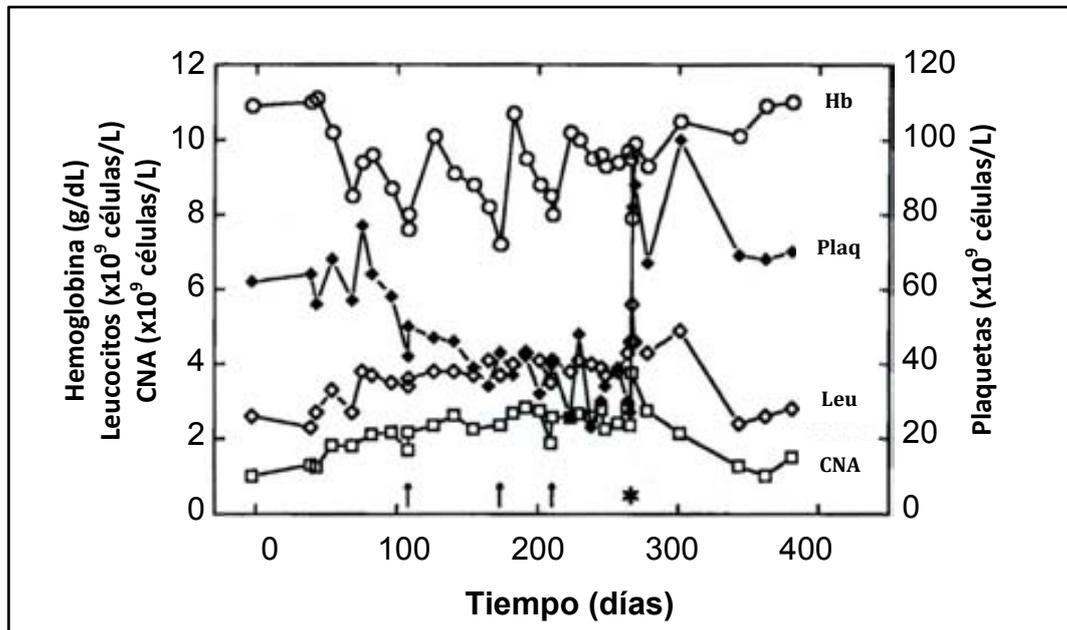


Figura 14. Seguimiento hematológico en una mujer con AF durante su embarazo. Paciente de 18 años que requirió transfusiones de eritrocitos (↑) por aparición súbita de anemia durante las semanas 18, 27 y 28 de embarazo. Debido al aumento de su trombocitopenia a las 38 semanas de embarazo también requirió transfundida de plaquetas (*). Hb: hemoglobina, Plaqa: plaquetas, CNA: recuento de neutrófilos absolutos, Leu: leucocitos (Alter et al., 1991b).

Entre los 29 pacientes con AF de los que se ha informado sobre sus estudios de lípidos, un 55% presentó dislipidemia. Las alteraciones del perfil de lípidico fueron asociadas con intolerancia a la glucosa. Así mismo, los pacientes con diabetes mostraron una asociación con sobrepeso u obesidad. El síndrome metabólico (sobrepeso/obesidad, dislipidemia y resistencia insulínica) fue diagnosticado en el 21% de los adultos con AF y en el 50% de los niños mostraron alguna anomalía metabólica. Adicionalmente, en los pocos estudios hechos para la evaluación de la densidad mineral ósea en AF mostró que el 92% de los pacientes examinados, de 18 o más años, tenían mucha más osteopenia u osteoporosis de lo esperado (Auerbach, 2009; Rose et al., 2008). Debido a que la disfunción endocrina está presente tanto en los niños como en adultos con AF se deben enfocar los esfuerzos clínicos para la identificación temprana de estas alteraciones. Así mismo hay que tener en cuenta que tanto la condición de AF subyacente como su tratamiento (andrógenos, TPH) pueden afectar el sistema endocrino de estos pacientes (Auerbach, 2009).

1.3.4. Predisposición a desarrollar tumores sólidos

Además de la extraordinariamente alta frecuencia de malignidades hematológicas, los pacientes AF tienen una alta incidencia de riesgo a desarrollar malignidades no hematológicas, lo cual sorprende debido a la temprana mortalidad dada por causas hematológicas asociadas con el síndrome (la media de supervivencia estimada es de 23 años y el riesgo estimado de mortalidad por causas hematológicas es del 81% a los 40 años de edad). Así, los pacientes son inusualmente jóvenes cuando desarrollan cáncer, y la incidencia de tumores malignos probablemente sería considerablemente mayor si los pacientes tuvieran una esperanza de vida más larga (Auerbach, 2009; Satagopan et al., 2004).

La mayoría de los tumores no hematológicos en pacientes con AF son CCE, especialmente de cabeza y cuello y de las regiones ano-genitales (Kutler et al., 2003a; Rosenberg et al., 2003). Pacientes con AF tienen una incidencia 500 a 700 veces mayor de CCE de cabeza y cuello que la población general con una incidencia acumulada 14% para este tipo de tumores a la edad de 40 años (Kutler et al., 2003; Kutler et al., 2003a). En la figura 15 se esquematiza la incidencia acumulada para las alteraciones hematológicas y tumorales a lo largo del tiempo en AF.

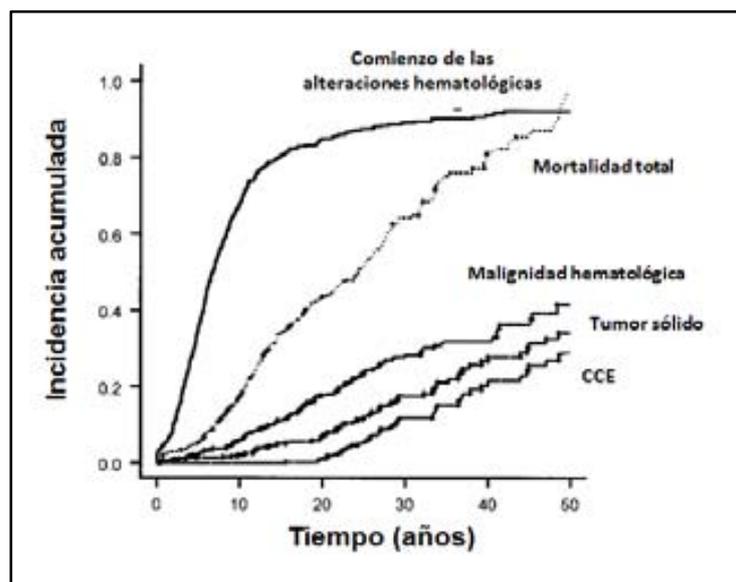


Figura 15. La incidencia acumulada de las alteraciones hematológicas y tumorales en pacientes AF. Evolución de la enfermedad en 754 pacientes AF de la IFAR. Se evidencia el tiempo de supervivencia total para las alteraciones hematológicas, malignidades hematológicas y no hematológicas. (Kutler et al., 2003a).

Un estudio realizado por Kutler y colaboradores sugiere que la AF se asocia con aumento de la susceptibilidad a la carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano (VPH) y que el CCE en pacientes con AF está probablemente asociado con la inactivación de p53 mediado por oncoproteínas asociadas al VPH por mutagénesis directa (Auerbach, 2009; Kutler et al., 2003b).

Está claro que la AF es a la vez un síndrome de aplasia medular y también de susceptibilidad al cáncer con una alta penetrancia. Los análisis epidemiológicos sugieren que los tumores sólidos se convertirán en el problema clínico predominante de los pacientes con AF, en los que TPH y nuevas terapias de tratamiento hematológico permitan una mayor supervivencia (Auerbach, 2009).

1.3.5. Variabilidad del fenotipo clínico en función del grupo de complementación

Dado que algunos de los subtipos de AF son extremadamente raros y se han identificado muy pocos pacientes, la presentación aparentemente de fenotipos específicos en estos grupos podría llevar a un sesgo de evaluación y, por tanto, derivar en una falsa afirmación. De todas maneras diferentes revisiones clínicas han intentado hacer algún tipo de correlación fenotipo/genotipo, aunque no siempre todos los datos han resultado ser concordantes entre estudios realizados en poblaciones distintas. Tal es el caso de los pacientes FA-C y FA-G, en donde los estudios llevados a cabo en la población de los Estados Unidos muestran un fenotipo más severo en los pacientes FA-C dado por fallo de médula ósea a edades más tempranas y una menor supervivencia comparado con los grupos FA-A y FA-G. Por el contrario estudios llevados a cabo en Europa indican que los pacientes FA-G presentan unas alteraciones hematológicas más severas y una mayor incidencia de LMA y SMD (Faivre et al., 2000; Kutler et al., 2003a).

De todos modos, si se intenta una agrupación de los diferentes fenotipos AF de acuerdo con sus características clínicas, es evidente que todos estos grupos de fenotipos están representados por más de un subtipo AF. Un ejemplo claro es la presentación del fenotipo VACTERL en diferentes porcentajes en pacientes de algunos grupos de complementación AF (Alter and Rosenberg, 2012).

Otra situación similar se da para el fenotipo de mejoría hematológica causada por reversiones mutacionales somáticas. Este fenómeno se ha documentado sólo en 5 grupos de complementación (FA-A, -C, -D2, -L y -N) (Waisfisz et al., 1999).

En el caso de los pacientes FA-J, uno de los pocos estudios en los que reportan una serie de 11 pacientes, muestran un fenotipo hematológico severo con un inicio del fallo de médula ósea entre los 2 a 6.5 años en 7 de estos pacientes (de los 4 que no refieren síntomas hematológicos uno fallece a las 22 semanas de edad gestacional, otro a las 6 semanas de vida y otro a las 4 días de vida, el cuarto fue diagnosticado a las 5 años aun sin síntomas hematológicos). Todos estos pacientes al menos tenía un alelo con la mutación truncadora (c.2533C>T, p.R798*) lo cual sugiere una correlación clínica severa con mutaciones truncadoras en este gen (Levran et al., 2005a). En otro estudio publicado en paralelo refieren una serie de 7 pacientes con un paciente con dos mutaciones de cambio de base en heterocigosis compuestas, pero no hacen referencia al fenotipo clínico (Levitus et al., 2005).

Quizás el mejor ejemplo de correlación fenotipo/genotipo en relación al grupo de complementación se ha observado en los pacientes FA-D1 y FA-N en los que el gen afectado parece desempeñar un papel importante en el fenotipo clínico. Estos pacientes se caracterizan por un fenotipo severo dado por la aparición muy temprana de meduloblastoma, tumor de Wilms o LMA, con una probabilidad de incidencia acumulada de malignidad de 97% para la edad de 5,2 años (Alter et al., 2007; Reid et al., 2007). Otro caso a resaltar es el fenotipo de los pacientes FA-D2, todos los pacientes descritos presentan alguna anomalía congénita a diferencia del resto de la población AF que en un 30% no presentan anomalías congénitas. Dentro de las anomalías más frecuentes en los pacientes FA-D2 está la microcefalia (89%), el retardo del crecimiento (86%), las hiperpigmentaciones de la piel (75%), las malformaciones de radio (72%) y la microftalmia (61%) (Kalb et al., 2007).

1.3.6. Correlación fenotipo/genotipo

Probablemente las discrepancias dentro de un mismo grupo de complementación, y a su vez, las similitudes observadas entre los fenotipos

que presentan los pacientes de diferentes grupos de complementación se deban al tipo de mutación que afecte a cada paciente junto con la interacción con su fondo genético y la exposición ambiental que a la que esté sometido durante cada paciente durante su vida.

1.3.6.1. Tipos de mutación y longevidad

Uno de los criterios más informativos en la correlación genotipo/fenotipo es si un determinado tipo de alteración genética es compatible con la supervivencia intrauterina, y si un paciente puede sobrevivir hasta la edad adulta con dicha alteración.

Con respecto a las alteraciones presentes en los pacientes AF y su letalidad, se ha visto que los pacientes FA-D2 todos presentan anomalías congénitas y que las anomalías más graves persisten a pesar de las diferentes combinaciones mutacionales presentes. Adicionalmente, las mutaciones que ocurren en los pacientes FA-D2 y probablemente en los pacientes FA-I no dan lugar a la pérdida total de función de la proteína, lo cual sugiere que mutaciones bialélicas que generen pérdida de la función en *FANCD2* y *FANCI* pueden ser letales en los seres humanos (Kalb et al., 2007; Sims et al., 2007).

Una situación similar se ha sugerido para el subtipo FA-D1 debido a mutaciones en *BRCA2*. Sin embargo, en ausencia de datos sistemáticos de historias de fecundidad y aborto en FA-D1, no existe una evidencia clara (Fackenthal & Olopade, 2007). Dado que los genes *BRCA1* y *BRCA2* están involucrados en vías relacionadas y son portadores de mutaciones heterocigotas que muestran frecuencias y manifestaciones similares, cabe la posibilidad de plantear que existan individuos con mutaciones *BRCA1* bialélica y que dado por el efecto severo podrían ser excesivamente raros o incluso sujetos a abortos tempranos (Neveling et al., 2009).

Por otra parte también se ha visto asociaciones genotípicas en pacientes AF que presentan fenotipos menos graves y una mayor longevidad. En un estudio realizado por Neveling y colaboradores sobre una cohorte de pacientes AF adultos (de 20 o más años y con un 57% de los pacientes como FA-A), se observa un aumento significativo en la proporción de pacientes FA-A con el aumento de la edad (edades superiores a los 50 años, ver figura 16). Estos

paciente FA-A con una mayor longevidad no tenían reversiones mutacionales somáticas evidenciadas hasta el momento del estudio, pero interesantemente la mayoría eran heterocigotos compuestos, con al menos un alelo portador de una mutación de cambio de base (*missense*). En la mayoría de estos pacientes el diagnóstico de AF fue debido a presentar cánceres a edad temprana y/o sufrir inusualmente severas reacciones a la quimioterapia.

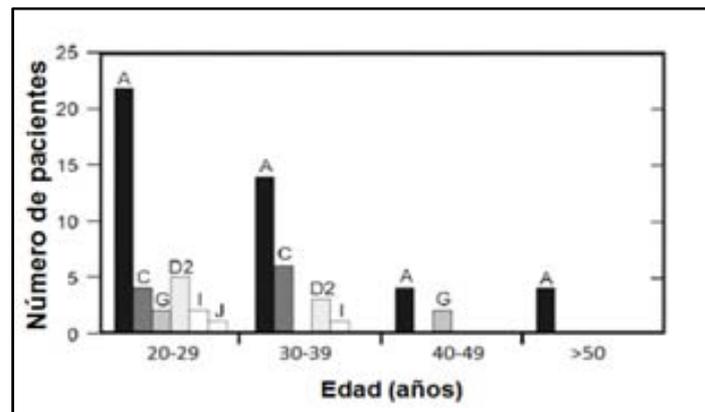


Figura 16. Subtipos de paciente AF de acuerdo a diferentes rangos de edad. Pacientes AF adultos de 20 o más años (n=70). La letra en la parte superior hace referencia al subtipo AF de los pacientes (Neveling et al., 2009).

Un caso representativo y perteneciente a este grupo de edad avanzada fue descrito por Huck y colaboradores (Huck et al., 2006). Este paciente FA-A de sexo femenino a excepción de una baja estatura, no tenía anomalías físicas. Esta paciente aunque presentó una leucopenia y trombocitopenia entre los 20 a 30 años no fue diagnóstica hasta los 49 años, dentro de un cuadro clínico de un cáncer de mama bilateral. A raíz de haber presentado una reacción grave al tratamiento quimioterapéutico de un cáncer de mama contralateral, se realizaron estudios de MO, citogenéticos y del ciclo celular que permitieron llegar al diagnóstico de AF. Su estudio mutacional documentó una heterocigosis compuesta para una mutación truncadora y una mutación *missense* (p.W410X y p.R517W, respectivamente). Los estudios de supervivencia celular y del ciclo celular fueron compatibles con una actividad residual de FANCA, aunque el estudio de FANCD2-Ub por WB no detectó activación de la ruta (Huck et al., 2006). De todos modos, un estudio llevado a cabo en una serie de pacientes FA-A españoles no encontró diferencias entre mutaciones truncadoras y no truncadoras en cuanto a la funcionalidad de la

proteína (ninguna puede localizarse a nivel nuclear), número de malformaciones o edad de aparición del fallo medular (Castella et al., 2011a).

Otro buen ejemplo de fenotipo suave y mayor longevidad asociado con un tipo de mutación está descrito y estudiado para la mutación c.67delG (reportada previamente como delG322) del gen *FANCC*. A pesar que esta mutación produce una proteína más corta (50 kDa), estudios llevados a cabo por Yamashita y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de esta proteína mutada en células deficientes de *FANCC* rescataba parcialmente el fenotipo de sensibilidad a la MMC, sugiriendo un grado de funcionalidad preservada (Yamashita et al., 1996).

A parte del tipo de mutación, otros factores que se han visto implicados en una mayor longevidad en pacientes AF han sido el mosaicismo del sistema hematopoyético, el género femenino y el TPH. En relación a las diferencias de género, los varones presentan una mayor morbilidad y mortalidad antes de los 85 años de edad, con una relación de 2:1 (hombres:mujeres) (Smith, 1993). Al igual que en la población general, la población AF masculina mueren antes que la población AF femenina, a pesar de la elevada morbi-mortalidad de la AF en ambos sexos (Neveling et al., 2009).

1.3.6.2. Mutaciones idénticas con diferentes fenotipos clínicos

Hay algunos reportes que describen fenotipos divergentes en pacientes AF con mutaciones idénticas, generalmente entre hermanos AF. Un análisis de las malformaciones congénitas realizado con datos del IFAR reveló que existe una variación fenotípica intrafamiliar entre los hermanos afectados. Se estudiaron 53 hermandades compuestas por 120 hermanos. En este estudio se identificó dos pares de gemelos monocigóticos fenotípicamente discordantes. El primer par de gemelos se trataba de dos fetos afectados examinados después de la interrupción del embarazo. Uno tenía un pulgar bífido y atresia duodenal, mientras que el otro no tenía anomalías congénitas. El segundo par de gemelos, eran dos niñas de 15 años de edad, una tenía ausencia unilateral de radio, ausencia bilateral de pulgares, y ausencia de clavícula derecha (ver figura 19). La otra niña tenía el pulgar derecho bífido, el pulgar izquierdo hipoplásico y ausencia de clavícula izquierda (ver figura 17) (Auerbach, 2009).

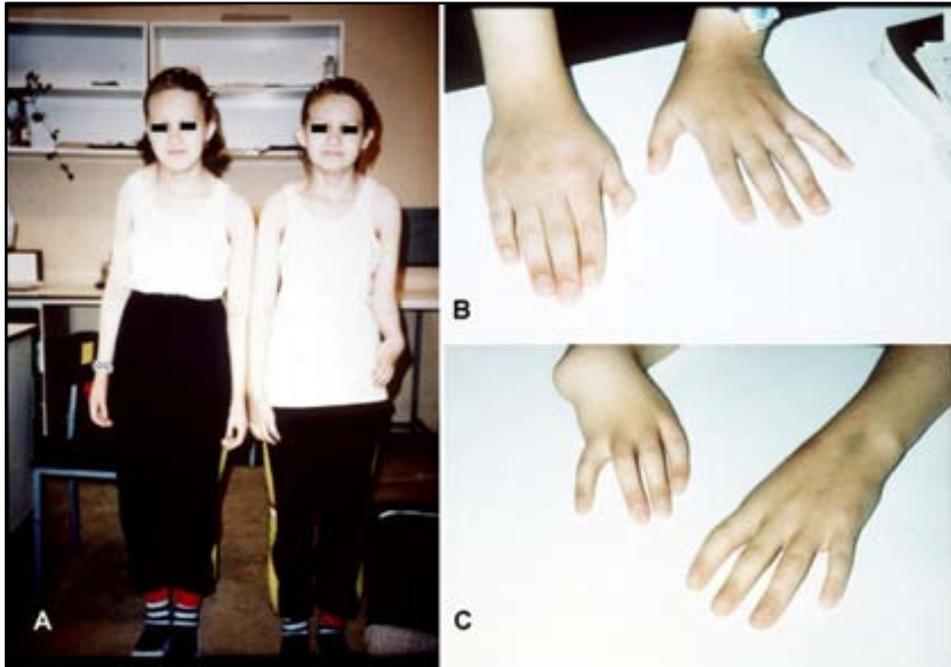


Figura 17. Gemelas monocigóticas de 15 años de edad. Pacientes FA-A homocigotas para la delección de los exones 30 y 31. **(A)** La paciente de la izquierda (gemela A) y la paciente de la derecha (gemela B) presentan un fenotipo clínico claramente discordante. **(B)** Manos de la gemela A. **(C)** Manos de la gemela B (Auerbach, 2009).

Otro caso interesante de variabilidad fenotípica con una misma mutación lo representa la mutación puntual $IVS4+4A>T$ ($IVS4$) en el gen *FANCC*. Pacientes AF judíos *Ashkenazi* con esta mutación $IVS4$ tienen un fenotipo severo, tales como la aparición temprana de alteraciones hematológicas, múltiples malformaciones congénitas y una baja supervivencia en comparación con otros pacientes FA-C. Por el contrario, esta misma mutación presente en la población japonesa muestra un fenotipo menos severo (Futaki et al., 2000; Kutler and Auerbach, 2004; Yamashita et al., 1996).

Estos ejemplos ilustran cómo los fenotipos AF se ven influidos por distintos factores de la alteración genética subyacente. Factores como fondos genéticos diferentes, influencias de genes modificadores, factores medioambientales y efectos fortuitos podrían estar involucrados y permitirían explicar estas discrepancias fenotípicas (Auerbach, 2009; Neveling et al., 2009).

1.3.6.3. Características de progeria segmental en pacientes con AF

Las manifestaciones clínicas de envejecimiento prematuro observadas en el fenotipo de los pacientes AF son la prueba más convincente de correlación

genotipo-fenotipo con un modelo progeroide. En ese sentido, en el fenotipo AF se pueden identificar una gama de signos y síntomas clínicos prematuros de envejecimiento acelerado (ver tabla 7).

Diferentes publicaciones en la literatura describen una serie de características del fenotipo AF que nos recuerdan la senescencia celular (Auerbach, 2009; Bogliolo et al., 2013; Neveling et al., 2009). Por ejemplo, en el envejecimiento normal, la tasa de lesiones cromosómicas y teloméricas aumenta en función de la edad, tanto *in vivo* y *ex vivo*. Hay un aumento constante de los linfocitos T detenidos en la fase G2 del ciclo celular cuando se requieren crecer en cultivos y de manera similar en función de la edad del donante (Seyschab et al., 1993). Así mismo, la inestabilidad genómica ha sido reconocida como una característica común de los síndromes progeroides clásicos. Existen evidencias convincentes en modelos animales que los defectos de reparación del DNA deterioran las funciones de las células madre y promueven el envejecimiento (Martin & Oshima, 2000; Park & Gerson, 2004). La hipocelularidad de la MO es una característica constante en individuos de edad avanzada. Sin embargo, esta hipocelularidad se presenta prematuramente en los pacientes AF. De hecho, muchas de las características clínicas de la AF, como el fallo de MO, se pueden interpretar como manifestaciones de envejecimiento prematuro a nivel celular, orgánico y sistémico.

Por otra parte, se ha evidenciado un exceso de producción de TNF- α en pacientes con AF, lo cual puede relacionarse con la reducción de su masa muscular de estos pacientes tal como se ha visto en el proceso de envejecimiento normal (Pedersen et al., 2003; Rosselli et al., 1994). Entre las muchas acciones pleiotrópicas de TNF- α que pueden relacionarse con el envejecimiento prematuro en el fenotipo AF está la supresión de la eritropoyesis, la hipersensibilidad a estímulos de citoquinas proapoptóticas y la resistencia a la insulina (Briot et al., 2008; Dufour et al., 2003; Pedersen et al., 2003). Este daño puede ser atribuido a la inducción de ROS mediado por el TNF- α . Está claro que el deterioro de las funciones de los genes AF genera susceptibilidad celular a diversos tipos de agentes genotóxicos incluyendo los radicales libres de oxígeno (ROS) (Du et al., 2008). De todos modos, aún no está claro el papel que juega la ruta FA/BRCA en respuesta al estrés oxidativo, y probablemente, la sensibilidad vista en las células AF a ROS se deba a la

incapacidad de las mismas para reparar adecuadamente el daño generado en el DNA (D'Andrea, 2001; Du et al., 2008).

En cuanto a los trastornos endocrinos, muchos ocurren durante el proceso de envejecimiento normal. Curiosamente estos trastornos se presentan en un 70 a 80% de los pacientes con AF a edades relativamente tempranas, y pueden ser interpretados como manifestaciones de envejecimiento prematuro de los diferentes sistemas, entre los que se incluye el metabolismo de la glucosa, los lípidos, del sistema óseo y el eje hipotálamo-hipofisiario (Rose et al., 2012).

Otro aspecto en que los autores hacen relevancia es la posible relación entre un sistema inmune comprometido y el aumento de la carcinogénesis, tal como se observa en individuos de edad avanzada. En estos individuos es muy frecuente el desarrollo de CCE en cabeza y cuello y en el área ano-genital, tal como sucede en pacientes con AF. En este aspecto existe alguna evidencia de disfunción del sistema inmune en pacientes con AF que puede contribuir al aumento de la tumorigénesis a edades tempranas (Fagerlie & Bagby, 2006). Otro ejemplo a resaltar es el SMD, cuya incidencia aumenta con la edad, con un incremento de la tasa de incidencia en los individuos mayores de 70 años, y con una edad media de diagnóstico de aproximadamente 71 años (Sandhu & Sekeres, 2008). Sin embargo en los pacientes con AF su incidencia acumulada es de casi del 7% y la edad media de diagnóstico es de 9.3 años, mucho antes de lo observado en la población general (Alter et al., 2003; Rosenberg et al., 2003).

Finalmente, Neveling y colaboradores presentan un caso de un paciente AF masculino de 28 años de edad, con un proceso de envejecimiento prematuro asociado a una EICH crónica (posterior a un TPH a los 9 años de edad). En la figura 18 pueden apreciarse el fenotipo clínico de esta paciente (cataratas bilaterales, opacidades y neovascularización de ambas córneas, alopecia, queratosis actínica y lesiones atróficas diseminadas). Otras características clínicas incluyen baja estatura, microcefalia, una sordera parcial congénita e hipoplasia del pulgar izquierdo (Neveling et al., 2009).



Figura 18. Características de progeria segmental en un paciente AF. Se trata de un paciente FA-A (heterocigoto compuesto por c.2222 + 1G>T y Ex32del) con un fenotipo de manifestaciones clínicas de un proceso de envejecimiento prematuro (Neveling et al., 2009).

1.4. FENOTIPO DE LA CÉLULA AF

Un aspecto importante de mencionar es el fenotipo celular de la célula AF. A pesar de la gran heterogeneidad a nivel molecular y de fenotipo que presentan los pacientes AF, las células AF sorprenden por su uniforme e invariable fenotipo en todos los grupos de complementación (Auerbach, 2003a). Esta uniformidad está dada por lo hipersensibilidad de estas células a agentes inductores de ICLs. También se ha visto que las células AF cierta sensibilidad a daño oxidativo (Pagano et al., 2005; Park et al., 2004; Saadatzadeh et al., 2004).

Por otra parte, con la excepción de los subtipos FA-D1 y FA-N (Godthelp et al., 2006; Reid et al., 2007), las células AF son uniformemente competentes en formación de focos de RAD51 inducido por ICLs.

De acuerdo con el patrón de herencia recesiva, la notable uniformidad del fenotipo celular AF requiere la presencia de mutaciones bialélicas, excepto en el caso del gen *FANCB*, donde los pacientes masculinos son hemocigotos (Meetei et al., 2004). La reversión somática de una de las mutaciones constitucionales (mosaicismo por reversión mutacional) elimina las características del fenotipo celular AF en la población de células revertidas (Gregory et al., 2001; Soulier et al., 2005; Lo Ten Foe et al., 1997b).

En otras palabras, se puede concluir que los múltiples fenotipos y genotipos presentes en la población de pacientes AF están conectados por un único fenotipo celular de múltiples características. Dichas características se encuentran interrelacionadas y en algún grado contribuyen con el fenotipo clínico observado en los pacientes AF (ver figura 19). A continuación hablaremos de cada una de estas características fenotípicas.

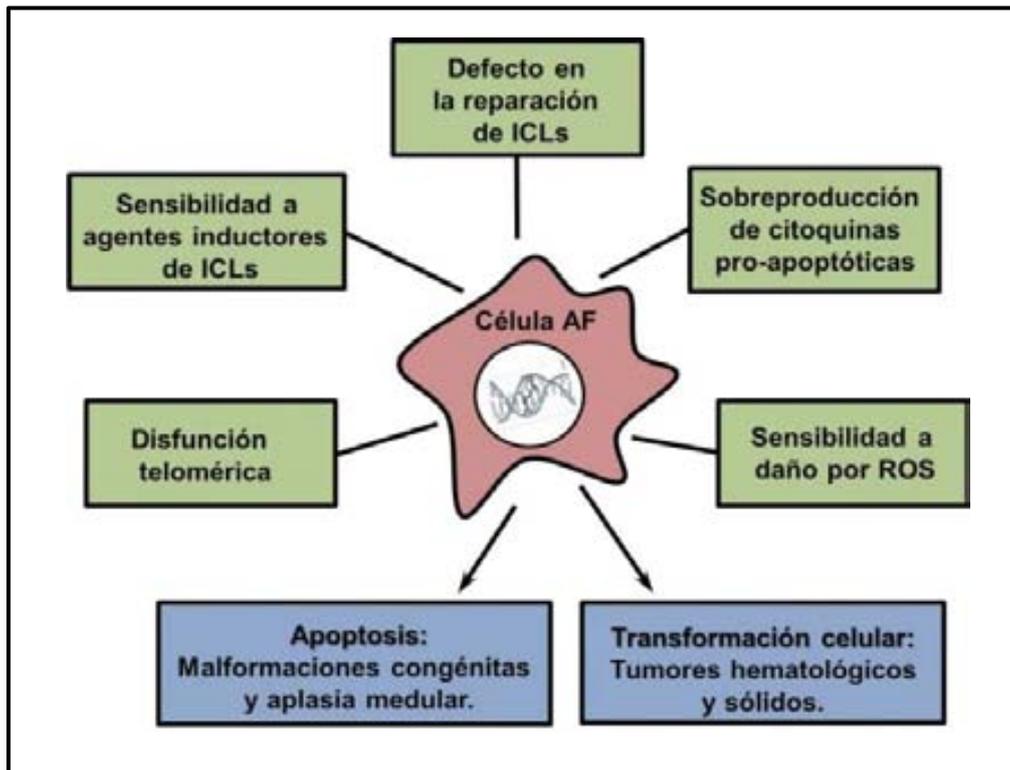


Figura 19. Fenotipo de la célula AF. Indiferentemente del grupo de complementación AF, todas las células AF presentan un fenotipo de inestabilidad cromosómica común (cuadros en verde), el cual repercute en el fenotipo clínico del paciente con AF (cuadros en azul).

1.4.1. Fragilidad Cromosómica

Las rupturas cromosómicas tanto espontáneas como inducidas son actualmente reconocidas como un marcador citogenético universal de la AF. Adicionalmente Joenje y colaboradores demostraron que las lesiones cromosómicas en linfocitos AF eran dependientes de la tensión de oxígeno en el ambiente celular de cultivo (Joenje et al., 1981). La inestabilidad cromosómica vista en AF es mayoritariamente de tipo cromatídico e incluye intercambios de cromátidas (ver figura 20) y ocurren durante la fase S del ciclo celular. Las rupturas cromatídicas son consecuencias de rupturas de doble

cadena de DNA no reparadas, mientras que las figuras multirradiales son consecuencias de una mala reparación de este tipo de rupturas (Joenje & Patel, 2001; Niedernhofer et al., 2005). Ambos tipos de lesiones son microscópicamente visibles y se utilizan como parámetros para en el análisis citogenético de esta patología.

En la figura 20 se ilustra los principales tipos de daño cromosómico implicados en la AF y sus posibles mecanismos de generación.

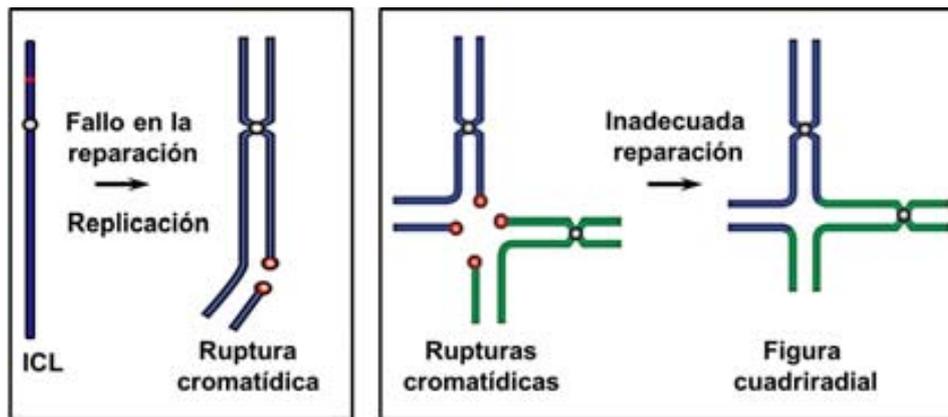


Figura 20. Fragilidad cromosómica en AF. Las aberraciones que ocurren en las células AF durante el proceso de división celular son el reflejo de su incapacidad de reparar los ICLs en el DNA y de la inadecuada reparación de las DSB inducidos por el proceso de replicación (Joenje & Patel, 2001).

En la figura 21 se ilustra una metafase de una célula AF con múltiples lesiones cromatídicas inducidas por DEB dentro del proceso de confirmación diagnóstica por el ensayo de fragilidad cromosómica.

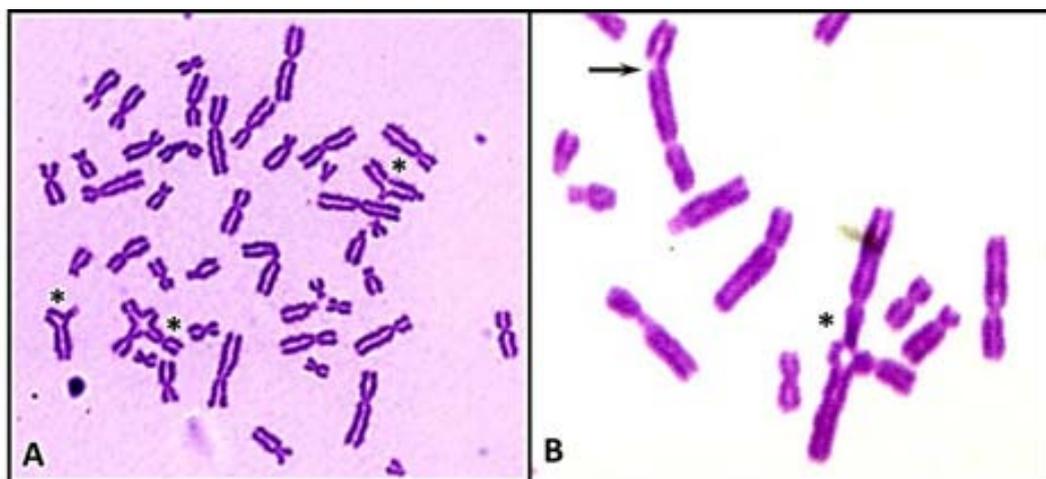


Figura 21. Aberraciones cromatídicas en células AF. (A) Metafase de una célula AF expuesta a DEB en la cual se indican con asteriscos figuras trirradiales y tetraradiales. (B) Parte de una metafase de una célula AF en la se indica con una flecha una ruptura cromatídica y con un asterisco una figura trirradial después de ser tratada con DEB.

1.4.2. Hipersensibilidad a los agentes inductores de ICLs

Desde el descubrimiento de las rupturas cromosómicas espontáneas en las células AF, diferentes estudios han reportado una uniformidad de todos los tipos celulares de los pacientes AF al ser expuestas a agentes inductores de ICLs. Esta uniformidad celular está dada por su hipersensibilidad a todos los agentes generadores de ICLs y su inadecuada reparación de este daño se ve reflejada en la fragilidad cromosómica de estas células (Deans & West, 2011).

Diferentes estudios han mostrado grados variables de sensibilidad a los distintos agentes generadores de ICLs, tales como el diepoxibutano (DEB), la mitomicina C (MMC), el cisplatino (CDDP), la mostaza nitrógenada (NM), el melfalán, el psoraleno, la UV u otros agentes (Deans & West, 2011). Esta sensibilidad a todos los agentes generadores de ICLs es dependiente de la dosis y se manifiesta como reducción de la supervivencia celular, elevadas tasas de rupturas cromatídicas y parada del ciclo celular en fase G2/M (Auerbach, 2003a, 2009; Oostra et al., 2012). Estas tres características pueden ser considerados criterios de valoración celular para la reconfirmación diagnóstica.

En términos de correlación genotipo-fenotipo, la evaluación de la sensibilidad a ICL sólo son valorables en el contexto de líneas celulares isogénicas, las cuales permiten comparar los grados de sensibilidad de diferentes alteraciones genéticas en una misma línea celular con el fin de caracterizar genes candidatos como nuevos genes AF (Reid et al., 2007; Trujillo et al., 2012).

En lo que aún no hay claridad es en su correlación con la severidad fenotípica. En estudios realizados para mirar el impacto de la fragilidad cromosómica en el fenotipo clínico, no han identificado correlaciones consistentes entre los niveles de fragilidad cromosoma y la severidad del fenotipo clínico (Castella et al., 2011a; Heinrich et al., 1998).

Finalmente, está claro que la sensibilidad a agentes generadores de ICLs es un marcador universal pero no exclusivo de las células AF. En este sentido, hay un número considerable de informes que describen fenotipos clínicos y celulares que sugieren un solapamiento con AF, pero sin llegar a ser totalmente compatibles. Para mencionar algunos ejemplos están los síndromes de Seckel, de rupturas cromosómicas de Nijmegen, de Roberts, de ruptura cromosómicas

de Varsovia, de Cornelia de Lange, de cerebro-óculo-facio-esquelético (COFS, por *ERCC1*) entre otros (Andreassen et al., 2004; Gennery et al., 2004; Jaspers et al., 2007; Petra van der Lelij et al., 2010; Vrouwe et al., 2007). De algunas de estas patologías hablaremos en el apartado de diagnóstico diferencial.

1.4.3. Alteraciones del ciclo celular en AF

La identificación y demostración de la prolongación de la fase G2 en el progreso del ciclo celular llevada a cabo, por Dutrillaux y colaboradores en 1982, cultivando linfocitos AF de SP (Dutrillaux et al., 1982), pero sólo hasta 1985 se puso a punto el primer ensayo de ciclo celular por citometría de flujo para el análisis del ciclo celular en pacientes con AF (Kubbies et al., 1985). Actualmente esta técnica ha sido modificada y adaptada para el análisis del ciclo celular de diferentes tipos celulares AF por citometría de flujo después de ser tratadas con agentes inductores de ICLs como la MMC y utilizada como herramienta de ayuda diagnóstica (Heinrich et al., 1998; Seyschab et al., 1993, 1995). En la figura 22 se muestra un claro ejemplo de análisis del ciclo celular en un paciente AF por medio de la citometría de flujo.

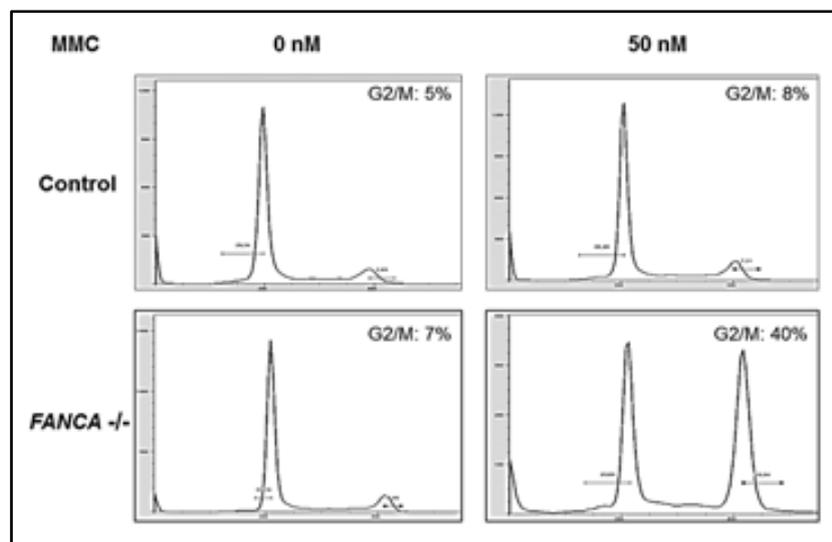


Figura 22. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo en fibroblastos primarios. Se evidencia una notoria parada de la fase G2/M del ciclo celular en los fibroblastos derivados del paciente FA-A comparado con los fibroblastos control derivados de un individuo sano.

1.4.4. Sensibilidad a daño generado por ROS

Con el trabajo realizado por Joenje y colaboradores en el que demostraron que las tasas de rupturas cromosómicas espontáneas de AF linfocitos T de SP variaban en función de la tensión de oxígeno del ambiente del cultivo celular, se puso por primera vez en evidencia la hipersensibilidad de las células AF a especies reactivas de oxígeno (ROS) (Joenje et al., 1981). Sin embargo, el grado de implicación de ROS en la ruta AF no se ha podido establecer, aunque diferentes estudios siguen acumulando evidencia de la relación entre el estrés oxidativo y la ruta AF en diferentes modelos experimentales (Alter et al., 1991a; Cohen-Haguenauer et al., 2006; Du et al., 2008; Saadatzadeh et al., 2004).

Por otra parte se ha demostrado que el grado de sensibilidad de oxígeno de este tipo de células varía en función de la concentración de hierro en los medios de cultivo, siendo las células AF más sensibles a las ROS en presencia de concentraciones elevadas de hierro (Poot et al., 1996).

Algunos modelos murinos AF no reproducen las manifestaciones clínicas hematológicas de la AF como el fallo medular y la leucemia, sin embargo, sus células hematopoyéticas muestran hipersensibilidad al ROS. Estudios llevados a cabo en células hematopoyéticas AF han demostrado como dichas células no sólo son hipersensibles a estrés oxidativo sino que su viabilidad se ve reducida frente este tipo de daño, lo cual sugiere que las proteínas AF juegan un papel crucial en el mantenimiento de la hematopoyesis durante el metabolismo oxidativo (Alter et al., 1991a; Cohen-Haguenauer et al., 2006; Du et al., 2008; Saadatzadeh et al., 2004). Dentro de la ruta AF, dos de las proteínas del complejo nuclear AF (FANCC y FANCG) han sido asociadas con una variedad de factores, cuya función primaria está implicada en la reducción del estrés oxidativo. En la tabla 9 se resumen estas interacciones con las proteínas AF.

Proteínas AF	Factores de interacción	Referencias
FANCC	NADPH Citocromo P450 reductasa (RED) Glutatina S transferasa P1-1 (GSTP1) Superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) Kinasa 1 reguladora de la señal apoptótica (ASK1)	Cumming et al., 2001; Hadjur et al., 2001; Kruyt et al., 1998; Saadatzadeh et al., 2004
FANCG	Citocromo P450 2E1 (CYP2E1) Antioxidante mitocondrial peroxiredoxina 3	Futaki et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2006

Tabla 9. Proteínas AF implicadas en la señalización de reducción oxidativa.

En un estudio llevado a cabo en células *Fancc* $-/-$ con el fin de medir el efecto protector de agentes antioxidantes demostraron como un tratamiento previo con estos agentes rescataba la supervivencia de estas células frente a la exposición a un agente oxidante (ver figura 23) (Saadatzadeh et al., 2004). Estos resultados sugieren que los antioxidantes mejoran preferentemente la supervivencia de células AF frente al estrés oxidativo y plantea la posibilidad de la utilización de los antioxidantes en el manejo médico de los pacientes AF (Du et al., 2008; Pagano et al., 2013; Saadatzadeh et al., 2004).

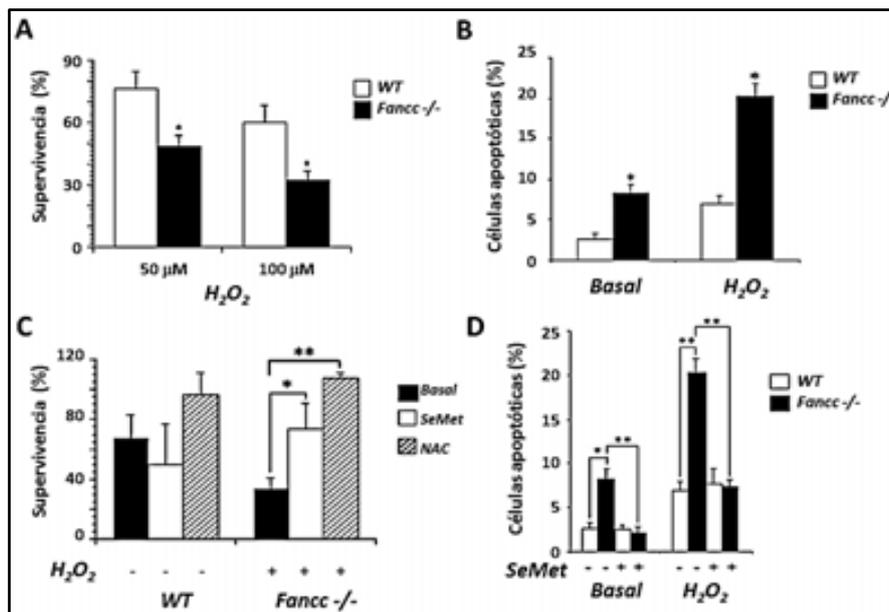


Figura 23. Tratamiento antioxidante disminuye la apoptosis generado por estrés oxidativo en células *Fancc* $-/-$. (A) Supervivencia de células sanas (WT) y *Fancc* $-/-$ bajo tratamiento con diferentes dosis de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). (B) Tasa de apoptosis de células WT y *Fancc* $-/-$. (C) Supervivencia de células WT y *Fancc* $-/-$ sin exposición a H_2O_2 y expuestas a H_2O_2 previo tratamiento con selenometionina (SeMet) y N-Acetil cisteína (NAC). (D) Tasa de células WT y *Fancc* $-/-$ sin exposición a H_2O_2 y expuestas a 100 μ M de H_2O_2 previo tratamiento con 20 μ M SeMet (Saadatzadeh et al., 2004).

Interesantemente, un estudio llevado a cabo utilizando un modelo murino *Fancd2* $-/-$ y *Trp53* $-/-$ tratado con un antioxidante permitió retrasar la aparición de tumores sólidos, posiblemente a través de un mecanismo que implica una mejor reparación de daño oxidativo DNA por mecanismos antioxidantes (Zhang et al., 2008).

La pérdida de la función de la ruta FA/BRCA conduce a un aumento del nivel de ROS o la reducción de la reparación del daño oxidativo en el DNA. En consecuencia, las células AF acumulan mayor nivel de daño, lo que lleva a un mayor nivel de activación de p53. Esto a su vez genera una mayor senescencia

y apoptosis celular (Du et al., 2008). Los defensores de la hipótesis de la desregulación del proceso de reducción oxidación en AF proponen que muchas de las anomalías clínicas y celulares observadas en AF pueden ser debido a la no reparación del daño inducido por ROS o de su inadecuado manejo (Du et al., 2008; Pagano et al., 2005). Sin embargo el principal sistema de reparación de 8-oxo-G, el BER funciona correctamente en las células de los pacientes con AF (Castillo et al., 2011).

Por otra parte, diferentes autores plantean la posibilidad de que las proteínas AF pueden influir en la expresión de enzimas antioxidantes (tales como glutatión S transferasas y catalasas) o en la biosíntesis metabólica de ROS por medio de moléculas tales como glutatión (Coussens and Werb, 2002; Macdougall and Cooper, 2002; Du et al., 2008).

1.4.5. Desregulación de la respuesta inflamatoria y la apoptosis

Un fenotipo pro-apoptótico de las células en proliferación ha sido planteado en la patogénesis de fallo medular y en la aparición de malformaciones congénitas durante el desarrollo embrionario en AF. En este sentido, el estudio del fallo medular en pacientes con AF se ha asociado con una excesiva tasa de apoptosis de las células progenitoras hematopoyéticas y la sobreproducción de citoquinas pro-apoptóticas tales como el Interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gamma (INF- γ) tanto *in vivo* como *ex vivo* (Dufour et al., 2003; Rosselli et al., 1992, 1994). De estas citoquinas la más estudiada hasta este momento ha sido el TNF- α , el cual se ha visto implicado en inflamación, en hematopoyesis y apoptosis. Altos niveles de TNF- α han sido encontrados tanto en suero fisiológico como en células de médula ósea y líneas celulares linfoblásticas de diferentes subtipos de pacientes de AF. Esta sobreproducción de TNF α conllevan a una sobreactivación de la cascada de señalización de la vía MAPK (Wajant *et al.* 2003) y del factor de transcripción NF-kappaB (Osborn *et al.* 1989), rutas que se han visto implicadas en el fallo medular y en procesos de leucemogénesis (Nakata et al., 2004; Ventura et al., 2004; Li et al., 2007). También se ha visto que la sobreproducción de TNF α induce una mayor producción de ROS, esto aunado

al hecho que las células son hipersensibles a estos agentes explicarían la acumulación de daño oxidativo y el aumento de las tasas de apoptosis en estas células. Se ha demostrado que la sobreproducción de estas citoquinas y la hipersensibilidad de las células AF respecto a sus efectos aumentan la producción de ROS y desregulan factores tales como el receptor Fas (receptor de muerte celular) (Schultz and Shahidi, 1993; Wang et al., 1998). Adicionalmente la corrección de los niveles de TNF α en células AF mediante el uso de anticuerpos contra esta proteína ha permitido demostrar la corrección parcial del fenotipo AF celular al disminuir su sensibilidad a la MMC y su fragilidad cromosómica, así mismo el uso de anti-TNF α mejora la viabilidad de las células progenitoras hematopoyéticas lo que lo cual permite plantear el uso de anti-TNF α en ensayos clínicos para el análisis de su efecto en la progresión del fallo medular en estos pacientes (Dufour et al., 2003; Rosselli et al., 1994). Por otra parte, la disfunción de la ruta FA/BRCA ha sido planteada en la desregulación del control de la apoptosis. De hecho la muerte de las células AF en respuesta a agentes inductores de ICLs se ha atribuido a un mecanismo que implica necrosis en lugar de apoptosis (Guillouf et al., 1999; Ridet et al., 1997).

Finalmente los resultados de los diferentes estudios permiten plantear la conexión entre el estrés oxidativo, la apoptosis, el daño en el DNA y la disfunción de la ruta FA/BRCA y su implicación en mayor o menor grado en el complejo y heterogéneo fenotipo que se observa en el paciente AF.

1.4.6. Formación de focos de RAD51

Desde la identificación de RAD51 como una recombinasa importante en RRH, la formación de los focos de RAD51 fue exhaustivamente estudiada en células AF de diferentes grupos de complementación, demostrándose así que las células AF de la mayoría de los grupos de complementación tienen tasas normales de formación de focos de RAD51 inducido por daño en el DNA. Las únicas excepciones, presentes hasta ahora, son los subtipos FA-D1 y FA-N, los cuales presentan en sus células menos del 10% de focos de RAD51 (Godthelp et al., 2006; Reid et al., 2007). Este excepcional fenotipo confirma la estrecha relación funcional entre las proteínas BRCA2 y PALB2 y su papel fundamental

en el reclutamiento de la recombinasa RAD51 a sitios de RH. Una prueba crucial en este sentido lo demuestra el hecho de que células deficientes para proteínas del complejo nuclear AF y el complejo ID presentan defectos en los pasos iniciales de eliminación ICLs por incisión de nucleótidos, mientras que células FA-D1 su defecto parece residir en el paso más tardío de la RH (Tsuchida & Komatsu, 2008). Estos resultados confirman el carácter distintivo del fenotipo celular de FA-D1 y FA-N que muestran que sus tasas de rupturas cromosómicas espontánea y la sensibilidad a los agentes ICL están por encima de la media en comparación con las células AF de los otros grupos de complementación. Esta notable excepción a la regla general del fenotipo celular único en AF permite explicar el fenotipo clínico característico de los subtipos FA-D1 y FA-N con respecto a la predisposición temprana a cáncer (Alter et al., 2007).

1.4.7. Fallo en la monoubiquitinación de FANCD2

Con ya se ha venido comentando la monoubiquitinación del complejo ID es fundamental para la activación de la ruta FA/BRCA, y la alteración genética de algunas de las proteínas del complejo nuclear AF no permite la activación de este complejo. Por lo tanto el análisis por western blot (WB) de la FANCD2-Ub permite identificar si alguna alteración en uno de los genes que conforman estos dos complejos (Casado et al., 2007; Shimamura et al., 2002). De esta manera se pueden también descartar genes en el proceso de subtipaje de un paciente con AF. Si no hay activación del complejo ID hay que estudiar los genes implicados en estos dos complejos, y si hay activación de la ruta habrá que estudiar los genes implicados en la fase posterior (Casado et al., 2007; Pilonetto et al., 2009).

1.4.8. Daño inducido por aldehídos endógenos

El ser humano no está generalmente expuesto a agentes clastogénicos como los usados en el laboratorio o en tratamientos quimioterapéuticos. Sin embargo, la ruta FA/BRCA se ha especializado en el mantenimiento de la integridad genómica reparando el daño generado por agentes inductores de ICLs que se

generan endógenamente durante el proceso del metabolismo celular. Se sabe que el estrés oxidativo puede generar agentes inductores de ICLs nucleofílicos como el malondialdehído, el crotonaldehído, la acroleína, y aldehídos β -insaturados, los cuales son derivados de la peroxidación lipídica (Langevin et al., 2011; Ridpath et al., 2007; Rosado et al., 2011). Otra genotoxina endógena que puede promover la formación de ICLs es el óxido nítrico, el cual es generado independientemente de los lípidos (Deans & West, 2011; Langevin et al., 2011; Ridpath et al., 2007; Rosado et al., 2011). Los aldehídos son también una mayor fuente de agentes generadores de ICLs, por lo cual su estudio es fundamental para la comprensión de como el daño generado por esta fuente de agentes endógenos activan la ruta FA/BRCA. En este sentido, el acetaldehído, un metabolito intermedio del proceso del etanol y que se genera de forma natural durante el metabolismo celular, es considerado como un agente genotóxico. Este metabolito estimula la monoubiquitinación de FANCD2 *in vitro*, y las células AF son sensibles a formaldehído (Langevin et al., 2011).

Los niveles del acetaldehído se ven aumentados aún más por factores externos tales como el consumo de alcohol. Normalmente, su desintoxicación por las enzimas deshidrogenasa de aldehído tales como ALDH2, lo convierte en acetato. Si esta reacción metabólica no se produce o es defectuoso, la acumulación de acetaldehído puede producir daño en el DNA, por formación de ICLs. A su vez si este daño no es reparado eficientemente se generan una catástrofe celular con consecuencias clínicas evidentes, entre las que se incluyen defectos en el desarrollo, fallo de la MO y la predisposición a cáncer, tal como sucede en pacientes con AF (disfunción de la ruta FA/BRCA) (Joenje, 2011). En la figura 24 se esquematiza los defectos del metabolismo del acetaldehído en un individuo con una ruta FA/BRCA defectuosa.

Estudios llevados a cabo en células de pollo DT40 generadas para un doble mutante, un gen AF y un gen implicado en el catabolismo del formaldehído (*ADH5*), demostraron una interacción sinérgica letal, sugiriendo que la toxicidad se genera cuando las células permiten la acción tóxica de los aldehídos (Rosado et al., 2011).

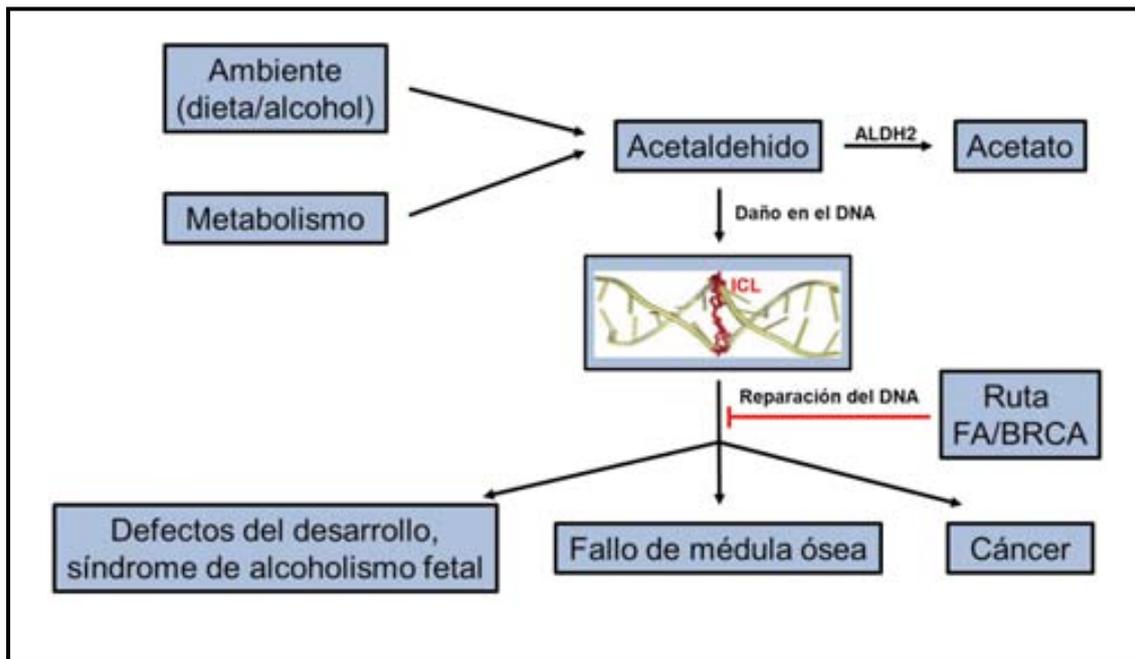


Figura 24. Efectos del metabolismo del acetaldehído. Factores endógenos y exógenos aumentan los niveles del acetaldehído y defectos en su desintoxicación generan ICLs en el DNA. A su vez, la ruta FA/BRCA repara este tipo de daño y la disfunción de esta ruta puede llevar a defectos en el desarrollo, el fallo de la médula ósea y la predisposición a cáncer (Joenje, 2011).

En otro estudio, utilizando un doble mutante para *Fancd2* y *Aldh2* se evidenció que sólo en los casos donde la madre era homocigota para la mutación en *Aldh2*, el doble mutante presentaba una letalidad embrionaria en etapas tempranas. Por el contrario los embarazos en hembras con alelo WT para este mismo gen llevaban sus embarazos a término. Mientras que las hembras heterocigotas para *Aldh2* alimentadas con una dieta rica en etanol, sus cachorros dobles mutantes exhibían drásticas anomalías del desarrollo, tales como anencefalia y defectos oculares (Langevin et al., 2011). Sorprendentemente, estos ratones postnatales desarrollaron rápidamente a un fallo de la médula ósea que se asemejaba a la observada en pacientes con AF (Langevin et al., 2011). Estos últimos hallazgos sugieren que estos aldehídos endógenos son deletéreos para las células madre hematopoyéticas y están implicados en la presentación de malformaciones congénitas en el contexto de disfunción de la ruta FA/BRCA (Garaycoechea et al., 2012; Kottemann & Smogorzewska, 2013; Langevin et al., 2011).

1.4.9. Disfunción telomérica

La longitud telomérica es otra de las características cromosómicas estudiadas en las células de los pacientes con AF. El acortamiento acelerado de los telómeros en AF comparados con los de personas sanas de la misma edad han quedado demostrado en diferentes tipos celulares (Ball et al., 1998; Callen et al., 2002; Joksic et al., 2012; Leteurtre et al., 1999).

De acuerdo con un acortamiento acelerado de los telómeros, Callén y colaboradores identificaron un aumento de más de 10 veces, en fusiones de extremos cromosómicos en células AF en comparación con células normales (Callen et al., 2002). La elevada frecuencia de señales de repetición TTAGGG extrateloméricas, así como la presencia de extremos de cromosomas sin una señal telomérica apreciable y elevada actividad de sus telomerasas, indican que las células AF sufren una mayor tasa de rupturas en sus telómeros (Callen et al., 2002; Leteurtre et al., 1999). Sin embargo, tratar de establecer la importancia biológica de estos hallazgos a nivel clínico es bastante difícil, ya que el desgaste del telómero hace parte del proceso fisiológico durante la replicación de las células.

Contrario a los resultados anteriores, un estudio llevado a cabo en células MEFs *Fancg* ^{-/-} (hematopoyéticas y no hematopoyéticas) evidenciaron que su longitud telomérica, actividad de la telomerasa, y protección del extremo terminal del cromosoma eran normales, incluso ante la presencia de una amplia inestabilidad genómica inducida por agentes clastogénicos (Franco et al., 2004). Estos resultados pueden indicar que FANCG no juega un papel importante en el acortamiento de los telómeros en pacientes con AF.

Por otra parte, el acortamiento de los telómeros sirve como un importante mecanismo supresor de tumores mediante la limitación de la capacidad de proliferación celular y la protección de los extremos de los cromosomas (con la ayuda de proteínas asociadas a estos). De esta manera contribuye al mantenimiento de la estabilidad genómica (Kong et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que los telómeros y proteínas asociadas a estos están implicados en diversas enfermedades genéticas humanas (Callén and Surrallés, 2004; Kong et al., 2013). Además, cada vez hay más evidencia de la asociación entre el acortamiento acelerado de los telómeros con enfermedades

metabólicas, inflamatorias y cáncer (Kong et al., 2013). En la figura 25 se hace una esquematización de un modelo posible de la disfunción telomérica en las enfermedades humanas.

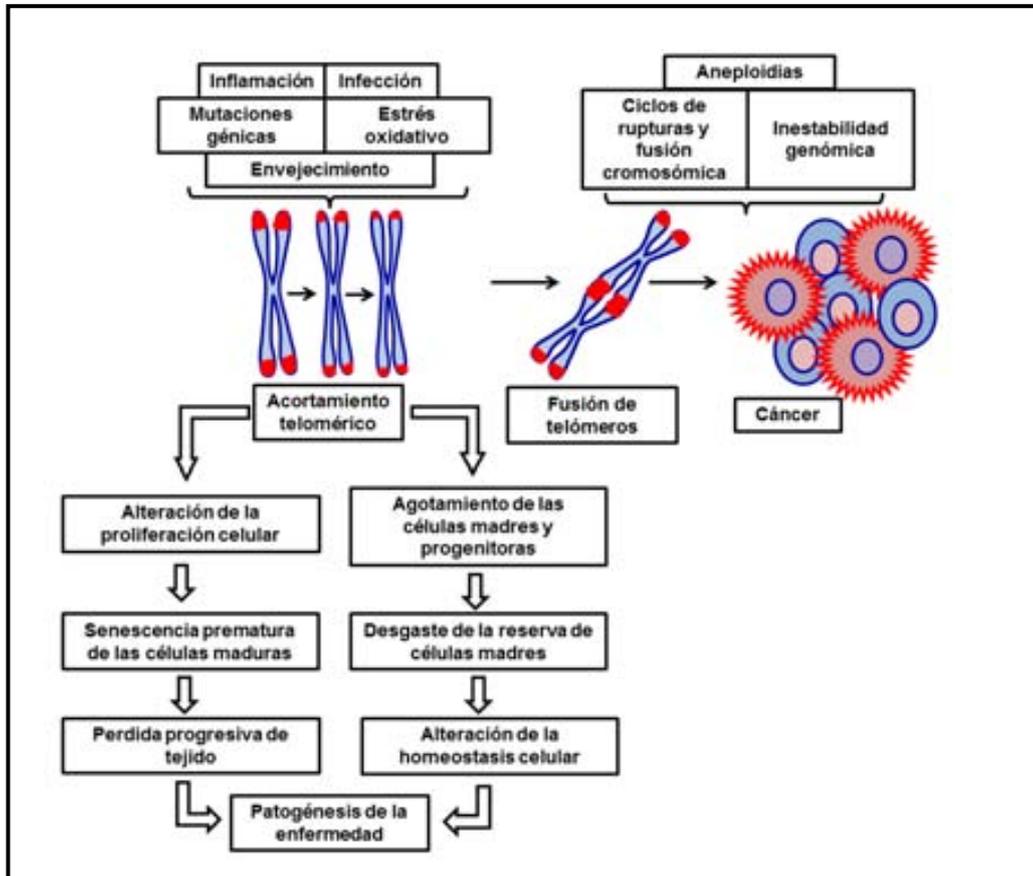


Figura 25. Disfunción telomérica en la patogénesis de las enfermedades humanas. Este modelo ilustra las diferentes alteraciones posibles que puede darse por disfunción telomérica, lo cual nos recuerda un proceso de envejecimiento prematuro en el cual está incluido la carcinogénesis, tal como sucede en AF (Kong et al., 2013).

1.5. DIAGNÓSTICO DE LA AF

El diagnóstico precoz de la AF no sólo permite excluir otras enfermedades sino que fundamentalmente previene el manejo inadecuado de las enfermedades hematológicas (la anemia aplásica, el SMD y la LMA). Adicionalmente conociendo el progreso natural de la enfermedad se puede acelerar intervenciones quirúrgicas para corrección de malformaciones congénitas y ofrecer un seguimiento clínico enfocado a la vigilancia y manejo médico-quirúrgico precoz del cáncer. Sin embargo, realizar un diagnóstico precoz no es fácil debido al fenotipo heterogéneo de la enfermedad. En los siguientes

apartados revisaremos puntos clave a tener en cuenta para realizar un adecuado diagnóstico de esta patología, así como las herramientas citogenéticas y biomoleculares con las que disponemos actualmente para su confirmación.

1.6.1. Presunción diagnóstica por el fenotipo clínico

Ya sabemos que sólo un 60% de los pacientes AF presentan manifestaciones clínicas y estas en diferentes porcentajes, sin llegar ninguna a un 100% (Auerbach, 2009; Tischkowitz & Dokal, 2004; Neveling et al., 2009; Shimamura & Alter, 2010). Adicionalmente, estas anomalías físicas se pueden presentar en otras enfermedades, por lo cual el único signo casi patognomónico de la AF es la aplasia medular (excepto para pacientes Fanconi-like del subtipo FA-O). Por lo tanto el índice de sospecha es muy bajo en pacientes sin sintomatología hematológica y en ausencia de antecedentes clínicos en la familia y/o malformaciones congénitas en el paciente. Por ello es importante resaltar una buena anamnesis clínica en la cual se indague por antecedentes familiares importantes (consanguinidad de los padres, etnia, patologías, cáncer, etc.), la elaboración de un árbol genealógico, un examen físico exhaustivo buscando descubrir malformaciones congénitas menores que hayan pasado desapercibidas (pigmentaciones de la piel, baja estatura para la edad, hipoacusias leves, alteraciones faciales leves, etc.) (Auerbach, 2009), así como exámenes bioquímicos y hematológicos (alteraciones de la hormona de crecimiento, macrocitosis sin anemia o con una anemia leve, Hb fetal elevada, etc.) (Alter, 2008; Rose et al., 2008; Shimamura, 2008).

De todos modos, ante la sospecha de un paciente con AF debe confirmarse con un ensayo de fragilidad cromosómica del cual hablaremos a continuación (Alter, 2008).

1.5.2. Confirmación diagnóstica citogenética

Las hipersensibilidad específica de las células AF a agentes inductores de ICLs como el diepoxibutano (DEB), la mitomicina C (MMC), los psoralenos

fotoactivados o el cisplatino (CisPt), ha permitido desarrollar un ensayo diagnóstico para la enfermedad (Auerbach, 2009).

Al tratar las células AF con DEB o MMC, la incapacidad de éstas de reparar los ICLs hace que se generen rupturas de tipo cromatídico que pueden derivar en la formación de estructuras radiales (triradiales y tetraradiales) como resultado de la mala unión de extremos rotos (ver figuras 21 y 26). El protocolo más estandarizado se basa el tratamiento de las células con DEB por 48h, las células AF presentan un número de roturas hasta cien veces mayor que las células de un individuo no AF. Este protocolo fue inicialmente descrito por Auerbach en 1988 y estandarizado por la misma autora para su uso como herramienta para la confirmación del diagnóstico de la AF (Auerbach, 2003b). Actualmente se realiza rutinariamente en linfocitos de SP de los pacientes, aunque también se puede realizar en fibroblastos o amniocitos, dependiendo del caso que se esté estudiando.

La MMC es también otro de los agentes usados por algunos laboratorios para la realización de este ensayo citogenético. Sus resultados en células AF son parecidos a los obtenidos por DEB, sin embargo, no está aún del todo estandarizado, debido a que es un compuesto mucho más inestable que el DEB, y pierde su actividad a medida que pasa el tiempo. Sin embargo la principal dificultad de su uso radica en el grado variable de sensibilidad que existe en la población general, y que está dada por su metabolismo. De modo que, hay individuos sanas que presentan una mayor sensibilidad a este compuesto, lo cual genera falsos positivos en el ensayo de fragilidad cromosómica. Es por ello que la estandarización de los protocolos se basan en el uso de varias dosis de MMC en un mismo ensayo para cada paciente y control, lo cual hace más laborioso el ensayo si se quiere llegar a un resultado fiable (Oostra et al., 2012). En la figura 26 (Oostra et al., 2012) se ilustran los resultados obtenidos por en el ensayo citogénético usando MMC para el análisis de un paciente sospechoso de AF con el fin de realizar su confirmación diagnóstica.

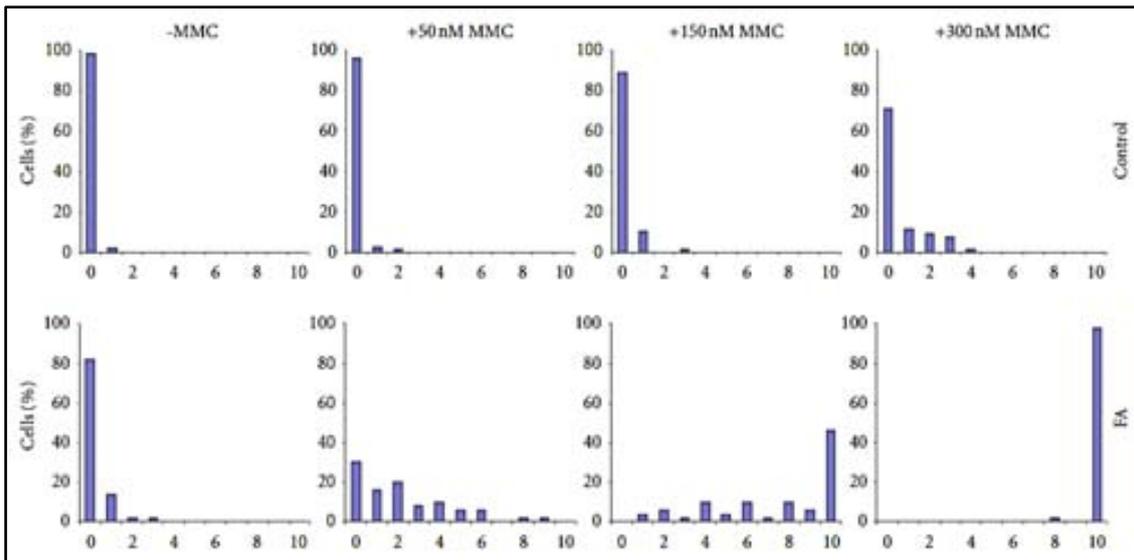


Figura 26. Evaluación de la fragilidad cromosómica inducida MMC en cultivos de linfocitos T de SP. El control sano (parte superior) muestra ruptura cromosómica sólo a una dosis alta de MMC (300 nM), mientras que el paciente AF (parte inferior) muestra una tasa de rupturas cromosómicas masiva que no se evidencia en células normales (Oostra et al., 2012).

1.5.3. Otras técnicas de ayuda diagnóstica

Como ya lo comentamos en el capítulo del fenotipo celular AF, el estudio de diferentes características específicas se pueden utilizar de forma complementaria al ensayo de fragilidad cromosómica para el estudio de pacientes AF.

Como resultado de la acumulación de daño y de la incapacidad de las células AF de repararlo, la fase G2 del ciclo celular se alarga más de lo normal como consecuencia de la activación del punto de control G2/M (Dutrillaux et al., 1991; Kubbies et al., 1985). Con base en esta característica se ha establecido un ensayo de análisis del ciclo celular por citometría de flujo después de 72 horas de tratamiento con un agente inductor de ICLs, usualmente MMC. Los cultivos de células de un paciente con AF muestran una típica prolongación de la fase G2 del ciclo celular en un elevado porcentaje después su tratamiento con estos agentes, tal como lo ilustra la figura 27.

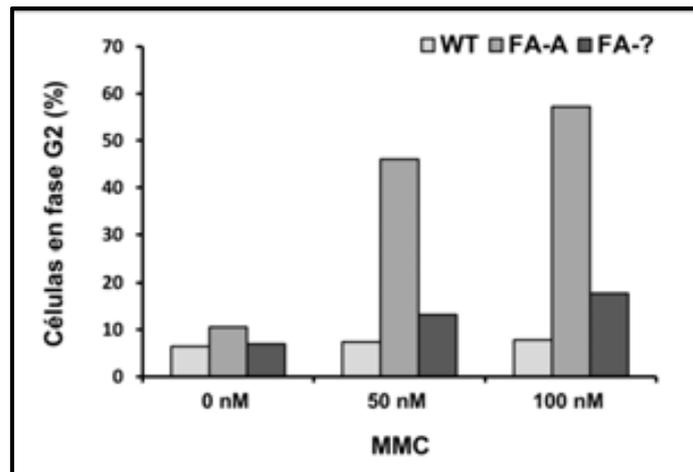


Figura 27. Análisis de ciclo celular de fibroblastos de un paciente con sospecha clínica de AF. Los fibroblastos de un paciente FA-A, un control sano (WT) y del paciente sospechoso de AF (FA-?) fueron tratados con MMC a diferentes dosis por 72 horas. El análisis de la fase G2/M del ciclo celular se realizó por citometría de flujo. Los resultados sugieren que el probando no es un paciente AF, lo cual concuerda con la fragilidad cromosómica que fue negativa en este paciente.

El análisis de la activación de la ruta FA/BRCA por Western blot (WB) como herramienta diagnóstica se puede utilizar en determinados casos (Pilonetto et al., 2009; Soulier et al., 2005). Esta activación puede ser analizada fácilmente mediante un WB. En el caso del WB, la no aparición de la banda correspondiente a la forma monoubiquitinada de FANCD2 o la ausencia total de proteína FANCD2 indica que el individuo está afectado por AF, aportando además, información sobre el grupo de complementación (ver figura 28). En otros casos el uso del WB nos permite igualmente llegar de manera rápida y sencilla al subtipaje de un paciente por ausencia de la banda específica de la proteína que se está analizando (Casado et al., 2007; Joksic et al., 2012). En la siguiente figura se ilustra un buen ejemplo de lo mencionado anteriormente.

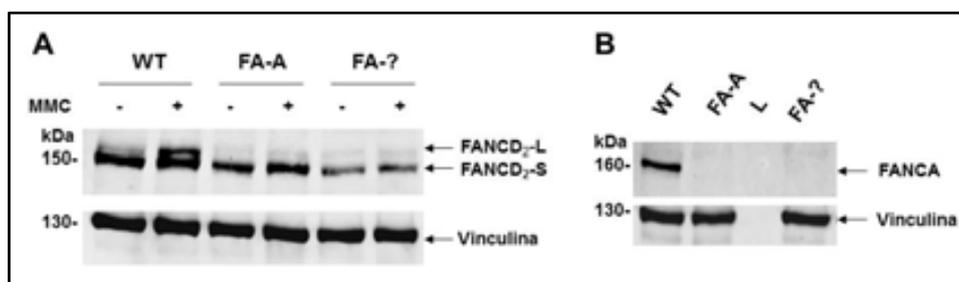


Figura 28. Análisis por WB de proteínas AF en los fibroblastos de piel de un paciente AF. (A) Ensayo de la activación de la ruta FA/BRCA, la cual muestra como sólo las células sanas (WT) activan su ruta después un tratamiento de 48 horas con MMC. (B) Análisis de la expresión de FANCA por WB, la cual muestra una clara ausencia de proteína en un paciente FA-A conocido y en nuestro paciente en estudio (FA-?). Los resultados son concordantes con un paciente FA-A. L: hace referencia al carril del marcador de peso molecular.

Otro ensayo útil en el caso de pacientes AF sospechosos clínicamente de pertenecer a los subtipos FA-D1 y/o FA-N (por presentar un meduloblastoma, un tumor de Wilms o una LMA temprana), es el estudio de la deficiencia en formación de focos RAD51 por inmunofluorescencia (IF) en células tratadas con agentes inductores de ICLs u otro tipo de daño. En la figura 29 se ilustra la formación de focos de RAD51 para diferentes grupos de complementación AF.

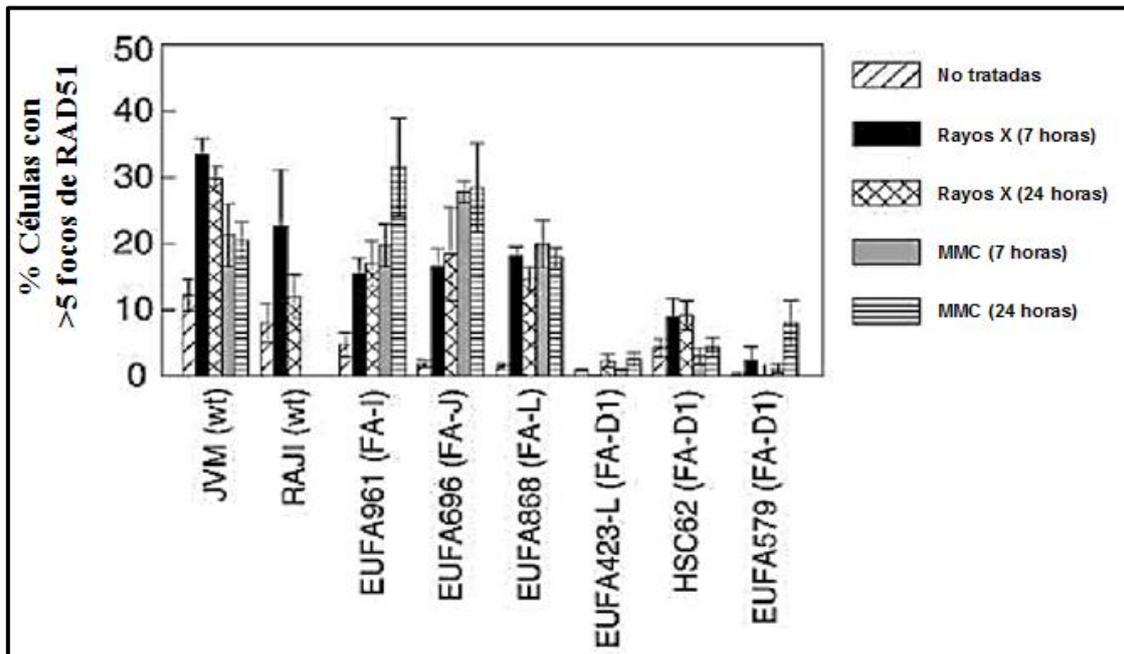


Figura 29. Análisis de diferentes grupos de complementación para la formación de Focos de RAD51. Sólo las líneas celulares linfoblastodides FA-D1 mostraron deficiencia en la formación de focos de RAD51 a diferentes tipos de daño y en diferentes tiempos de exposición. La dosis de MMC usado fue de 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o de rayos X 12 Gy. Figura tomada del estudio publicado por Godthelp y colaboradores (Godthelp et al., 2006).

1.5.4. Subtipaje de pacientes AF por complementación con vectores retrovirales

Es una técnica que permite mediante la reversión de la sensibilidad a MMC, utilizando vectores retrovirales en linfocitos T de SP, fibroblastos y/o líneas linfoblasticas que contiene el cDNA de los diferentes genes AF, identificar el gen responsable entre los 16 genes que pueden producir la AF. La corrección fenotípica de las células AF utilizando vectores retrovirales puede ser utilizado con éxito para determinar el grupo de complementación AF inmediatamente después del diagnóstico de la enfermedad (Casado et al., 2007; Chandra et al., 2005; Hanenberg et al., 2002; Fu et al., 1997). En la figura 30 se ilustra un

claro ejemplo de subtipaje de un paciente FA-A perteneciente a la población y llevado a cabo durante mi estancia en la División de Hematopoyesis y Terapia Génica, CIEMAT, Madrid.

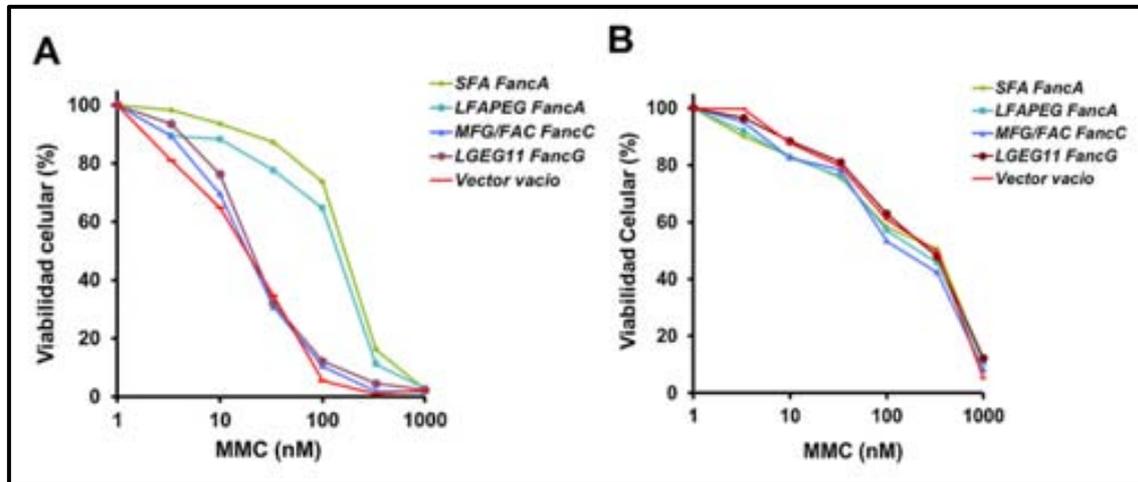


Figura 30. Subtipaje por complementación retroviral de individuos sospechosos de AF. (A) Los linfocitos T de SP del paciente FA596 (con fragilidad cromosómica positiva) presentaron una clara corrección de la hipersensibilidad a la MMC con los vectores que contiene los dos diferentes cDNAs de *FANCA* al realizar el estudio de complementación con vectores retrovirales. (B) Los linfocitos T de SP de su hermano asintomático no presentaron en ningún caso sensibilidad a la MMC durante el estudio de complementación retroviral. Los vectores retrovirales contenían los cDNAs de los 3 genes más comunes para AF (*FANCA*, *FANCC* y *FANCG*). Los cultivos de linfocitos T se llevaron a cabo durante 5 a 6 días bajo el tratamiento de diferentes dosis de MMC. Resultados mostrados con el consentimiento de la División de Hematopoyesis y Terapia Génica, CIEMAT, Madrid.

Esta herramienta dio la base para el inicio de estudios de terapia génica en modelos murinos para esta enfermedad, permitiendo demostrar no sólo la reversión a la hipersensibilidad a los agentes inductores de ICLs de sus fenotipo celular, sino que básicamente demostró la utilidad de los modelos murinos en la evaluación de los vectores que codifica el gen homólogo humano con fines de uso en ensayos preclínicos de terapia génica (Fu et al., 1997; ush et al., 2000; o et al., 2002).

1.5.5. Análisis mutacional de los pacientes AF

Aunque el análisis mutacional era antes la parte final del estudio de pacientes AF, y aportaban la confirmación final del diagnóstico y del subtipo del paciente, la implementación de nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento permiten actualmente realizar el subtipaje y estudio mutacional a la vez. No

obstante, debido a que la población de pacientes AF muestran un espectro mutacional bastante amplio y variado, lo dicho anteriormente no es del todo cierto. En este sentido, existe una gran diversidad de mutaciones reportadas en varios estudios de determinación del espectro mutacional realizados en distintas poblaciones en los cuales han venido cada vez identificado mutaciones antes no reportadas (Castella et al., 2011a; Kalb et al., 2007; Levrán et al., 2005b; Savino et al., 2003; Yagasaki et al., 2004). Por lo cual se hace necesario junto al estudio mutacional realizar estudios funcionales de complementación génica para las mutaciones nuevas que se vayan identificando. Esto no es cierto para algunos grupos altamente consanguíneos dónde una mutación determinada presenta un efecto fundador. Existen ejemplos muy claros de este fenómeno en diferentes poblaciones. En la población española de individuos de etnia gitana, dónde la mutación c.295C>T en *FANCA* hace que esta población tenga la frecuencia de portadores de AF más elevada del mundo (1/67) (Callén et al., 2005). Estos efectos fundacionales no son exclusivos de etnias altamente consanguíneas sino que también se han observado en otras poblaciones como es el caso de la población brasileña, dónde se ha reportado que el 50% de las mutaciones encontradas en el gen *FANCA* corresponden a la mutación c.3788_3790delTCT (Magdalena et al., 2005). Estos efectos fundacionales hacen que en algunas poblaciones algunos grupos de complementación en particular estén más representados. En algunos genes AF y especialmente en *FANCA*, son muy comunes las deleciones intragénicas, que pueden incluir desde un exón a la totalidad del gen. Las deleciones pueden representar hasta un 40% de las mutaciones encontradas en este gen en determinadas poblaciones, y muy frecuentemente, se asocian a recombinaciones entre repeticiones *Alu* (Callén et al., 2004; Castella et al., 2011a; Morgan et al., 1999).

Una herramienta importante de resaltar en este aspecto es la base de datos creada por la Dra. Auerbach, la “*Fanconi Anemia Mutation Database*” (<http://www.rockefeller.edu/fanconi/mutate/>). Desde su creación ha tenido como objetivo registrar todas las mutaciones encontradas en pacientes AF de todo el mundo que hayan sido publicadas. Gracias a esta base de datos se puede asignar rápidamente la patogenicidad a muchas de las mutaciones que

actualmente se están identificando en las diferentes poblaciones que se están estudiando. Adicionalmente, se permite hacer una idea de manera más global del espectro mutacional de cada grupo de complementación. Por ejemplo, para el gen *FANCA*, *FANCC* y *FANCG* se han registrado hasta la fecha 489, 56 y 54 mutaciones distintas, respectivamente.

Las técnicas usadas para la detección de las mutaciones se han venido renovando con la incorporación de nuevas técnicas y mejor tecnología. Entre las primeras técnicas ampliamente usadas están la cromatografía líquida de alta resolución de DNA (DHPLC, sigla del inglés) y la secuenciación por Sanger de los fragmentos de PCR, las cuales se basan en la amplificación de las zonas codificantes del gen y su posterior análisis para la detección de variantes. Otra técnica usada es la amplificación múltiple dependiente de ligación (MLPA, sigla del inglés), la cual ha mostrado una gran utilidad para la detección de grandes deleciones y duplicaciones de exones. El análisis de cDNA (obtenido a partir del *mRNA* de la célula) es usado para detectar las posibles omisiones o incorporaciones de determinados fragmentos en la secuencia del *mRNA* y así identificar mutaciones que afectan el *splicing* del *mRNA*.

Entre las nuevas técnicas de secuenciación de ADN que se han desarrollado en los últimos años destacan las técnicas de nueva generación, que se suelen conocer como secuenciación de nueva generación (NGS, sigla del inglés) e incluyen diferentes tecnologías de alto rendimiento a gran escala y de manera paralelizadas (secuenciación del exoma completo, del genoma, del transcriptoma).

A diferencia de los sistemas de secuenciación tradicionales, estas plataformas son capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de DNA en un único proceso de secuenciación a menor tiempo y por coste cada vez más reducido. En este último aspecto, se pasó de forma exponencial de secuenciar unos cuantos millones de pares de bases (registrados en 1995) a los casi 30.000 millones (registrados en 2002), y el coste de cada nucleótido de secuencia publicada pasó desde 10 dólares en 1990 hasta unos 0.01 dólares en 2005 (Pettersson et al., 2009; Schuster, 2008).

Debido a su gran rendimiento, este tipo de plataformas ha sido rápidamente incorporado para el estudio a gran escala de enfermedades monogénicas y genéticamente heterogéneas, difíciles de abordar con otro tipo de tecnología existente hasta la fecha debido al enorme coste que ello supone.

La existencia de bases de datos internacionales de mutaciones o de variantes de significado incierto permite verificar si una variante ha sido identificada anteriormente y la podremos clasificar como SNP (del inglés, polimorfismo de un solo nucleótido) o mutación. Si se trata de una variante frecuente en la población, queda descartado un efecto patogénico de dicho cambio. Por el contrario, si es una mutación ha sido encontrada ya en otros pacientes, nos confirma el carácter patogénico. En caso de no estar registrado en ninguna base de datos disponible, se hace necesario un análisis de dicha variante para confirmar o no su carácter patogénico. En este caso son muy útiles los análisis *in silico*, de predicción del efecto del cambio de aminoácido en la proteína. Estos modelos, tienen en cuenta la diferencia en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, la conservación de la posición en las secuencias de genes homólogos de distintas especies, la presencia de dominios funcionales en la región o el efecto esperado de cambio de la estructura terciaria de la proteína (Rudd et al., 2005). No obstante, en caso de duda el carácter patogénico de las mutaciones de cambio de sentido (*missense*) puede ser confirmado mediante un análisis funcional. El análisis funcional consiste en la transfección de células deficientes en el gen que se quiere analizar con un vector de expresión que contiene el mismo gen con el cambio a ensayar (introducido normalmente mediante un sistema de mutagénesis dirigida) (Lo Ten Foe et al., 1996). Posteriormente, con las células transfectadas se consiguen confirmar si se corrige el fenotipo celular, por ejemplo en AF, la sensibilidad a MMC. La existencia de corrección indica que el cambio no compromete la funcionalidad de la proteína y por tanto, no es patogénico.

En el caso de los resultados generados por la tecnología de secuenciación de alto rendimiento, surge la dificultad para el análisis de la gran cantidad de datos generados. Dicha dificultad implica el manejo de un volumen de datos bastante grande el cual requiere un manejo más sistematizado por plataformas bioinformáticas que faciliten la transformación de los datos brutos producidos en datos analizados de acuerdo a su impacto biológico. En este sentido

también se ha avanzado en el desarrollo de plataformas bioinformáticas que permiten la obtención de análisis fiables pero que requieren de personal altamente cualificado (D'Antonio et al., 2013; Davis et al., 2013; Huang et al., 2013).

Aplicaciones del análisis mutacional

Los investigadores han descubierto hasta el momento 16 genes AF [*FANCA*, -*B*, -*C*, -*D1* (también conocido como *BRCA2*), -*D2*, -*E*, -*F*, -*G*, -*I*, -*J*, -*L*, -*M*, -*N*, -*O*, -*P* y -*Q*]. Las mutaciones en estos genes representan más del 95% de los casos reportados de AF. Las mutaciones en *FANCA*, *FANCC* y *FANCG* son los más comunes y representan aproximadamente el 85% de los pacientes con AF en todo el mundo. *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF* y *FANCL* representan el 10%, mientras que los genes de AF restantes, *FANCB*, *FANCI*, *FANCI*, *FANCM*, *FANCN*, *FANCO*, *FANCP* y *FANCO* representan menos del 5%. Algunos individuos con AF no parecen tener mutaciones en estos 16 genes, por lo cual nuevos genes AF serán descubiertos en los próximos años.

A parte de representar la confirmación del subtipo genético, la identificación de las mutaciones es relevante en muchos sentidos. Desde un punto de vista clínico, permite realizar un cribado de portadores en familiares (fundamental en familias altamente consanguíneas), realizar el diagnóstico prenatal en embarazos tempranos, descartar la enfermedad en donantes de médula ósea emparentados y la selección de embriones sanos y HLA compatibles por diagnóstico preimplantacional. Adicionalmente, en un futuro cuando la terapia génica se haya podido desarrollar en AF será necesario tener la caracterización mutacional de la población AF para su tratamiento de corrección génica.

Por otra parte, como ya se comentó anteriormente, en algunas ocasiones el tipo de mutación explica parte del fenotipo observado en los pacientes. Tal es el caso de la mutación c.456+4A>T (IVS4+4A>T) o mutaciones en el exón 14 para el gen *FANCC*, analizados en la etnia Judía *Ashkenazi*, que fue asociada con una mayor severidad clínica, mientras que la mutación c.67delG en el exón 1 se asoció a un fenotipo más leve (Gillio et al., 1997). Sin embargo, en el gen *FANCA* no han reportado hasta el momento correlación alguna entre mutaciones y fenotipo, aunque en un estudio realizado en la cohorte europea

se observó asociación entre mutaciones bialélicas truncadoras y una edad de aparición de fallo medular más temprana y supervivencia reducida (Castella et al., 2011a; Faivre et al., 2000). En otros genes AF, como el *FANCD1*, *FANCI* y *FANCN*, el cribado de mutaciones en busca de portadores en la población general tiene interés a nivel de salud pública ya que son genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario, así como de otros tipos de cáncer familiar (Cantor & Guillemette, 2011; Begg CB et al., 2008; Garcia-Higuera et al., 2001; Reid et al., 2007). En este aspecto la identificación de mutaciones en estos genes se deben complementar con un consejo genético de los miembros de las familias portadoras.

1.6. MOSAICISMO POR REVERSIÓN SOMÁTICA EN LOS PACIENTES AF

La aparición espontánea de células mutacionalmente revertidas, conducen a mosaicismo hematopoyético en pacientes AF (la presencia de poblaciones hematopoyéticas sanas), en un 15 a 25% de pacientes con AF (Soulier et al., 2005; Lo Ten Foe et al., 1997b). Este fenómeno sucede cuando una única célula progenitora hematopoyética revierte espontáneamente una de las mutaciones de los dos alelos del gen AF y por consiguiente, revierte también el fenotipo celular convirtiéndose en una célula sana. Debido a la ventaja proliferativa de esta célula, se expande clonalmente y coloniza la médula ósea del paciente (Lo Ten Foe et al., 1997b).

En este aspecto es muy importante el nivel en el cual se presenta la primera reversión mutacional, la cual se puede producirse en una célula madre o en una célula progenitora o en una célula más diferenciada de alguno de los linajes hematopoyéticos. Dependiendo del estado de diferenciación de la célula, la reversión involucrará todos los linajes hematopoyéticos o sólo parte de ellos. Si la reversión se produce a nivel de una célula madre, “terapia génica natural”, los recuentos hematopoyéticos del paciente vuelven a niveles normales (Soulier et al., 2005; Lo Ten Foe et al., 1997b), tal como se esquematiza en la figura 31.

A nivel molecular, la reversión mutacional se puede generar por varios mecanismos entre los cuales están descritos la conversión génica, la recombinación intragénica o reversión directa de la mutación (generan un alelo

completamente normal), mutaciones espontáneas compensatorias en *cis* (pueden producir una restitución de la funcionalidad de la proteína) (Hirschhorn, 2003; Lo Ten Foe et al., 1997b; Waisfisz et al., 1999).

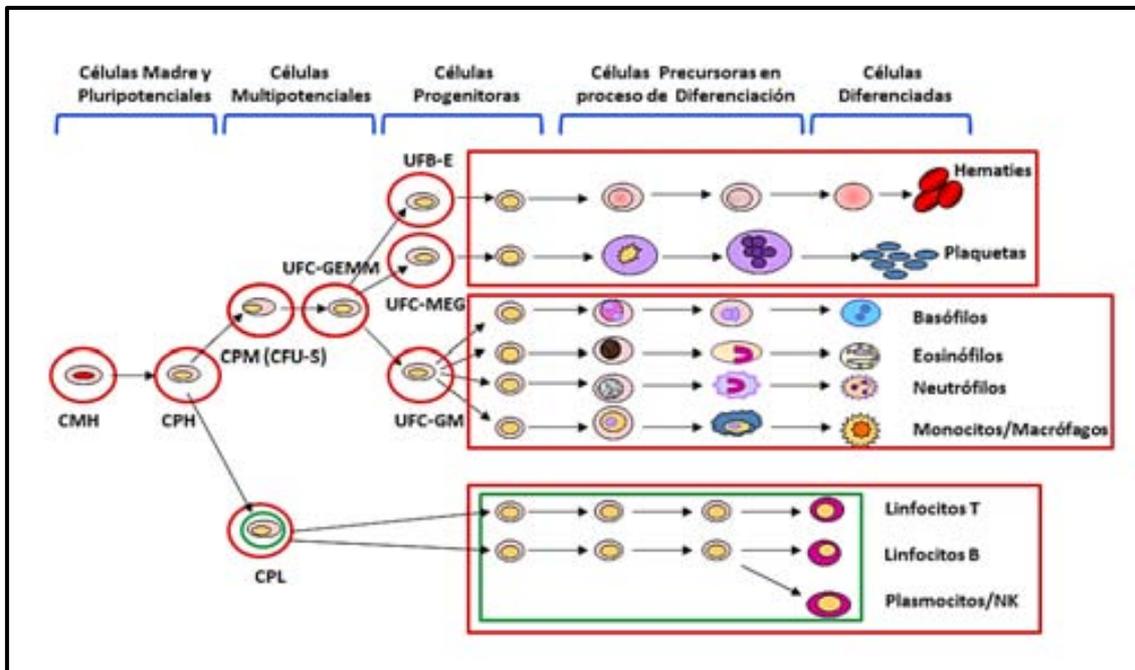


Figura 31. Mosaicismo hematopoyético por reversión mutacional. En círculos y cuadros rojos se representa el evento de una reversión mutacional a nivel de células madre hematopoyéticas lo cual da una ventaja selectiva de crecimiento celular con mejoría de todos los conteos celulares a nivel sanguíneo. En círculo y cuadro verdes se representa el evento de una reversión mutacional a nivel de células progenitoras linfopoyéticas lo cual solamente repercute en la mejoría de los conteos linfoides a nivel sanguíneo. CMH: células madre hematopoyéticas, CPH: células pluripotenciales hematopoyéticas, CPL: células progenitoras linfoides, CPM: células progenitoras mieloides, UFC-E: unidades formadoras de brotes eritroides, UFC: unidades formadoras de colonias, MEG: megacariocitos, GM: granulocito-macrófagos, NK: células *natural killer*.

1.6.1. Diagnóstico de pacientes mosaicos

Como se comentaba anteriormente dependiendo a que nivel se dé la reversión mutacional se podrá identificar o no el fenómeno de mosaicismo en SP por el ensayo de fragilidad cromosómica. Otro aspecto a tener en cuenta es su porcentaje de progresión de las células revertidas, si este porcentaje no es significativo no se podrá identificar el fenómeno y si este es superior que las células enfermas podría darnos en el ensayo de fragilidad cromosómica un falso negativo. De todas maneras lo clásico en mosaicismo somático es observar dos poblaciones celulares posterior al tratamiento con DEB o MMC:

una población con varias rupturas cromatídicas en cada célula (población no revertida) y otra población sin rupturas (población revertida). En este aspecto diversos estudios observaron que hay un solapamiento a dos niveles diferentes del ensayo de fragilidad cromosómica, uno entre los pacientes AF y los no AF y otro entre los pacientes AF mosaicos y AF no mosaicos (Auerbach, 2009; Castella et al., 2011b). En el primer caso se recomienda volver a realizar el ensayo en células de otro tejido (piel) y en el segundo volver a realizar el ensayo en otro momento. Este solapamiento que se puede observar en algunos pacientes es simplemente parte de la dinámica del proceso de mosaicismo que se va dando en estos pacientes. Para resolver el solapamiento que se presenta entre los pacientes no AF y los pacientes AF mosaicos Castella y colaboradores diseñaron el índice de fragilidad cromosómica (CFI, sigla del inglés) (Castella et al., 2011b), el cual permite identificar claramente estos dos tipos de pacientes. Este índice se calcula así:

$$[\text{CFI} = (\% \text{ células aberrantes}) \times (\text{Aberraciones/célula multiaberrante})]$$

Desafortunadamente, el CFI no nos permite diferenciar los pacientes AF mosaicos de los AF no mosaicos, seguramente debido al progresivo crecimiento selectivo que se va dando en el mosaicismo de las células sanas a través del tiempo. En la tabla 10 se muestran los rangos en los que se encasillan cada grupo de pacientes.

Pacientes	Rango CFI
AF no mosaicos	181-1180
AF mosaico dudoso	156-238
AF mosaico	55-220
No AF	2-40

Tabla 10. Clasificación de los pacientes usando el CFI de fragilidad cromosómica. Distribución de los individuos analizados en función del cálculo del índice CFI para cada uno de los grupos y establecimiento de valor umbral entre individuos no AF y pacientes de AF (Castella et al., 2011b).

Ante la sospecha clínica de AF en un paciente con un ensayo de fragilidad cromosómica negativo, se deben repetir el ensayo de fragilidad cromosómica o análisis del ciclo celular en fibroblastos de piel con el fin de descartar un caso de reversión total.

Dada el impacto clínico que se ha visto del mosaicismo sobre el paciente AF, es importante estar atentos ante casos de AF sin disfunciones hematológicas,

con mejorías de sus recuentos de células sanguíneas, o de estabilidad hematológica, y se recomienda repetir el análisis de fragilidad cromosómica para determinar el grado de mosaicismo.

En cuanto al impacto clínico de este fenómeno en pacientes AF, los pocos estudios realizados se han hecho a corto plazo y por lo tanto el nivel de impacto aún no se ha podido determinar claramente. Un estudio realizado por Gross y colaboradores en una serie de 5 paciente por 3 a 5 años mostró que en 4 de los 5 pacientes hubo mejoramiento de su condición hematológica durante el periodo de observación, lo que sugiere que no todos los pacientes AF mosaicos pueden tener mejoría clínica (Gross et al., 2002). Desafortunadamente hasta la fecha no hay estudios de series de mosaicos AF a largo plazo que permitan tener un referente sobre las características de evolución clínica de este subtipo de pacientes AF. En este trabajo pretendemos analizar una cohorte de estos pacientes con datos obtenidos retrospectivamente a largo plazo.

1.7. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS PACIENTES AF

Como ya se comentó en los primeros capítulos las últimas dos décadas han significado un periodo de grandes avances en la investigación clínica y básica de la AF. Es por ello que la caracterización de los pacientes ha sido posible en los países del mundo que tienen la tecnología y los recursos necesarios a su alcance para hacerlo. Sin embargo, estos representan aun la minoría de la totalidad de los países.

Entre los grandes avances está la cooperación de los diferentes grupos de investigación y la participación en diferentes actividades científicas, de las cuales las más importante es la “*Fanconi Anemia Research Fund*” (<http://www.fanconi.org>), la cual desde su fundación en 1989 ha colaborado en diferentes niveles con la investigación de esta patología. Otra gran aportación internacional lo ha realizado *The Rockefeller University* con la creación primero de la *International Fanconi Anemia Registry* (IFAR) en 1989, y luego de la base de datos de mutaciones en AF en 1998 con el fin de lograr crear un consorcio internacional en mutaciones en AF (<http://www.rockefeller.edu/fanconi>). Gracias

a esta base de datos se puede acceder a la información de todos los casos de pacientes con AF reportados y sus respectivas mutaciones.

1.7.1. Grupos de complementación nivel mundial

El subtipaje se venía realizando mediante el análisis de complementación con vectores lenti- y retrovirales y/o el análisis mutacional de todos los genes AF principalmente, y en algunos casos el análisis de expresión de la proteína o de la monoubiquitinación de FANCD2 por WB. Actualmente con la incorporación de las nuevas tecnologías de secuenciación estos anteriores métodos van quedando en desuso. Hasta la fecha 16 grupos de complementación han sido identificados, de los cuales el grupo FA-Q se realizó gracias a la utilización de las nuevas tecnologías de secuenciación (Bogliolo et al., 2013). Las distribuciones y frecuencias de los grupos de complementación están graficadas en la figura 32 y representan las poblaciones de pacientes AF norteamericanas y de algunos países europeos. Estos datos son sacados del registro IFAR, la cual solo incluye los pacientes AF en los cuales se ha asignado uno de los grupos de complementación identificados y publicados hasta la fecha.

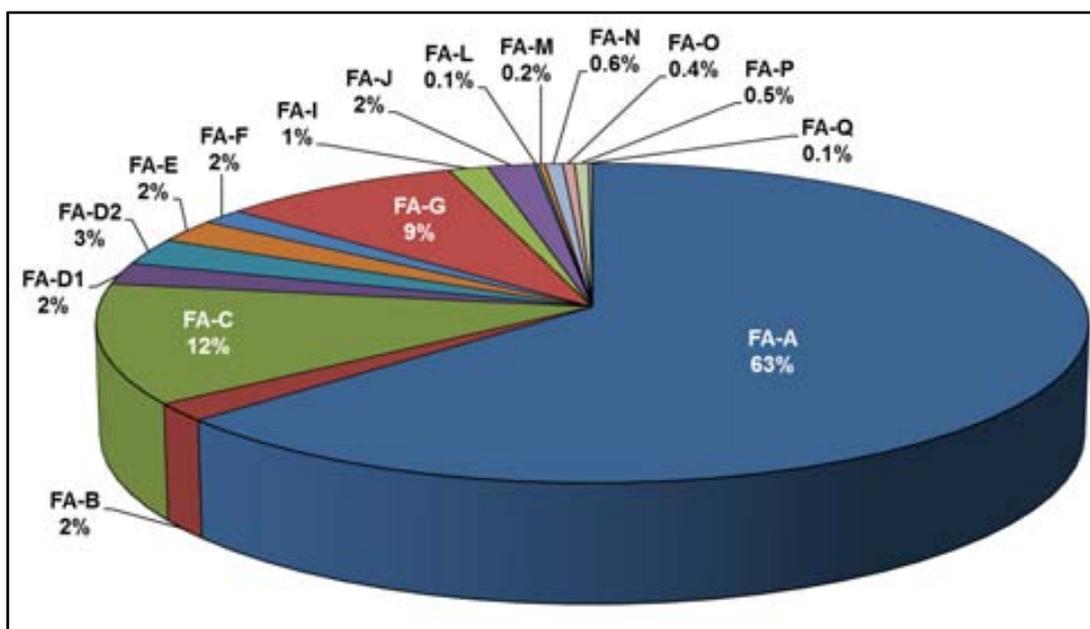


Figura 32. Distribución de los grupos de complementación registrados en la “Fanconi Anemia Mutation Database” de la IFAR. Un total de 1413 pacientes han sido registrados hasta agosto del 2013, la cual muestra un mayor porcentaje de los grupos FA-A, FA-C y FA-G (<http://www.rockefeller.edu/fanconi>).

1.7.1.1. Grupos de complementación en la población española

Al igual que en otros países, el subtipaje de la población AF española se realizó principalmente mediante análisis de complementación con vectores retrovirales mayoritariamente, otras técnicas como el análisis mutacional, el análisis de expresión de la proteína o de la monoubiquitinación de FANCD2 por WB o la formación de focos de RAD51 fueron muy útiles para descartar o identificar grupos menos comunes. En el caso de la población gitana española el análisis mutacional permitió realizar directamente el subtipaje en estos pacientes. El proceso de subtipaje fue llevado mayoritariamente en la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT, Madrid (Casado et al., 2007), en donde se realizó el subtipaje por complementación retroviral y en algunos casos en ensayo de focos de RAD51. En la población española, aunque aún hay pacientes sin subtipar, no todos los grupos de complementación están presentes. Además debido a la alta frecuencia de una mutación fundadora en el gen *FANCA* en la población de la etnia gitana española, la proporción de pacientes FA-A resultó ser significativamente superior a la vista en la población mundial (80%). Otra particularidad en esta población es la baja frecuencia del subtipo FA-C (1%) (Casado et al., 2007). La población de la etnia gitana española y portuguesa resultaron compartir la misma mutación fundadora, por lo cual se consideran como una misma población gitana (Callén et al., 2005).

1.7.2. Espectro y análisis mutacional a nivel mundial

Basados en los datos de la *Fanconi Anemia Mutation Database*, registrados hasta agosto del 2013, en un total de 895 pacientes FA-A se identificaron 1542 alelos mutados distribuidos por todo el gen *FANCA*, con 486 variantes distintas. De estos datos se observó que el tipo de mutación más frecuente fueron las grandes deleciones y las microdeleciones (54.8%), seguidos de los cambios de base (sustituciones) con un 38% de los alelos mutados, y finalmente, las duplicaciones y la microinserciones son las menos frecuentes, con un 6%. Si miramos dentro de este tipo de mutaciones, el porcentaje que se ubican a nivel

intrónico y que afectan el *splicing* muestran una frecuencia alta (24% del total de mutaciones). En la figura 33 se ilustran el número de mutaciones identificadas para cada exón.

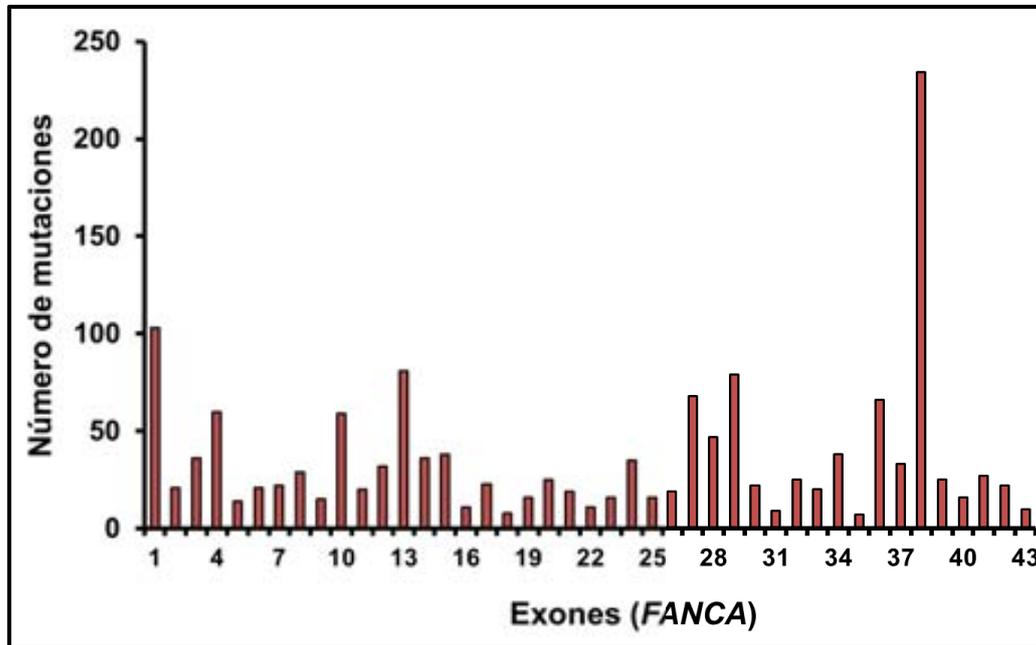


Figura 33. Número de mutaciones encontradas en los pacientes AF de la *Fanconi Anemia Mutation Database* en cada exón del gen *FANCA*. el mayor porcentaje de alelos mutados se observó en el exón 38 (15% del total), exón 1 (6.7% del total), exón 13 (5.2% del total) y exón 29 (5.1% del total).

En cuanto al espectro mutacional para los demás genes AF, aunque el número de pacientes es menor, también se observan una amplia distribución y distintos tipos de variantes para cada gen.

Por ejemplo para los dos segundos grupos más comunes, FA-C y FA-G, el espectro mutacional fue similar al visto en el gen *FANCA* (datos analizados para agosto del 2013). En el subtipo FA-C había 172 pacientes registrados en ese momento, con 300 alelos mutados, representados por 56 variantes distintas y distribuidos por todo el gen. Para el subtipo FA-G había 123 pacientes, con 239 alelos mutados, representados por 54 variantes distintas y distribuidos por todo el gen.

Otro punto a resaltar en el análisis mutacional es la particularidad de *FANCB*. Es sabido que este gen está sujeto a la inactivación del cromosoma X en mujeres, por lo que las células de los portadores heterocigotos de mutaciones en *FANCB* son funcionalmente hemicogotos para este gen. Parece ser que el patrón de inactivación alélica está sujeto al alelo mutado del gen *FANCB* en

portadores heterocigotos. Meetei y colaboradores demostraron que tres de las mujeres portadoras sanas identificadas tenían una inactivación completa sesgada del alelo mutado en células de sangre, piel y orina (Meetei et al., 2004). Dos estudios posteriores confirmaron dicho patrón de inactivación en mujeres portadoras de la mutación en DNA de células de SP (Holden et al., 2006; McCauley et al., 2011).

1.7.2.1. Espectro y análisis mutacional en la población española

Como la población AF la etnia gitana comparten una mutación *FANCA* fundadora (c.295C<T, p.Q99*) (Callén et al., 2005), el análisis mutacional de estos pacientes AF se hace buscando dicha mutación. Con ello se obtenía rápidamente subtipaje y análisis mutacional. En cuanto a la población AF española no gitana el espectro mutacional es muy similar al observado en la población mundial, el cual es muy amplio. Para agosto de 2010, en el gen *FANCA* se detectaron un total de 130 alelos mutados en un total de 67 pacientes, de los cuales 13 eran gitanos (Castella et al., 2011a).

Entre los 130 alelos mutados se identificaron 52 mutaciones distintas, revelando una gran heterogeneidad de mutaciones en esta población (Castella et al., 2011a).

Por otra parte, con el fin de optimizar el estudio mutacional en estos pacientes FA-A, se analizaron cuáles eran las mutaciones más frecuentes y en que exones se localizan, considerando todas las grandes deleciones como un mismo tipo de mutación ya que se detectan en la misma reacción de MLPA. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta población de pacientes se observó que las grandes deleciones y las mutaciones en los exones 13, 36 y 38 acumulaban la mayoría de mutaciones (58.5% de las mutaciones) (Castella et al., 2011a). A partir de estos resultados se elaboró una estrategia para el cribado mutacional de los pacientes FA-A españoles, basado en 4 rondas (Castella et al., 2011a).

En cuanto a la población AF gitana española, de los 13 pacientes analizados, en 12 de ellos se identificó la mutación c.295C>T en homocigosis, y sólo en un paciente (FA363) se identificó una deleción de los exones 4 a 6 en homocigosis. Este caso identificado en la población gitana plantea la necesidad

de incluir en su análisis mutacional el uso de la MLPA para los casos de pacientes AF donde no se identifiquen la mutación gitana en homocigosis o no se pueda amplificar el exón 4 por PCR (Castella et al., 2011a; Callén et al., 2005).

También se identificaron las mutaciones patogénicas para los otros grupos de complementación de la población AF española. Para agosto del 2010 se caracterizaron mutacionalmente los pacientes de los otros grupos de complementación: 1 FA-C, 1 FA-D1, 5 FA-D2, 3 FA-E, 3 FA-G y 3 FA-J. Interesantemente, se observó una variabilidad en cuanto al espectro mutacional. Se identificaron 2 mutaciones distintas en *FANCC*, 2 en *FANCD1*, 5 en *FANCD2*, 3 en *FANCE*, 4 en *FANCG* y 3 en *FANCI*.

1.8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Mucho de lo que sabemos actualmente sobre la conexión entre la inestabilidad genómica, la aparición prematura de cáncer y el envejecimiento deriva del estudio metódico de síndromes humanos raros que son causados por defectos en los sistemas de reparación y mantenimiento del DNA (Ciccia & Elledge, 2010; Gollin, 2005; Thoms et al., 2007).

Todos estos síndromes raros presentan algún defecto en algunas de las vías de reparación del DNA, los cuales presentan como característica en común algún grado de predisposición a cáncer. A su vez se ha visto que cada una de estas vías de reparación del DNA representan vías alternativas de reparación de daño en el DNA, lo cual queda confirmado con los diferentes estudios que demuestran e identifican nuevas conexiones de cooperación y complementación entre las diferentes vías (Ciccia & Elledge, 2010; Kim & D'Andrea, 2012; Kottmann & Smogorzewska, 2013; Moldovan & D'Andrea, 2009). Es por ello que es de esperarse que muchos de estos síndromes se solapen fenotípicamente. En este punto la AF se solapa fenotípicamente con dos grupos diferentes de patologías. Por un lado están los síndromes de inestabilidad genómica y por el otro están los síndromes congénitos de fallo de médula ósea y anemias aplásicas.

1.8.1. Síndromes de inestabilidad genómica

La importancia de la función de la respuesta a daño en el DNA en la fisiología humana está reflejada por el amplio espectro de defectos congénitos que presentan los pacientes con mutaciones en algunos de los genes implicados en esta función. De tal manera que estos síndromes presenta afectaciones en todos los niveles de la homeostasia de los sistemas orgánicos, envejecimiento prematuro y predisposición a cáncer (Ciccia & Elledge, 2010).

Se comentó anteriormente que los síndromes de inestabilidad genómica presentan características comunes no sólo a nivel clínico y celular, sino también a nivel molecular. Se ha identificado diferentes síndromes causados por un mismo gen, así como un mismo síndrome causado por diferentes genes, siendo un buen ejemplo la AF. Recientes estudios llevados a cabo en un gen AF nuevo (*FANCQ/ERCC4*) permitieron determinar 4 síndromes diferentes (AF, síndrome progeroide XFE, xerodermia pigmentosa tipo F y síndrome de Cockayne) causados por alteraciones genéticas en este gen (Bogliolo et al., 2013; Kashiyama et al., 2013). Estos resultados dan una idea de la multifuncionalidad que pueden tener los diferentes genes que están implicados en reparación.

A continuación comentaremos las principales características clínicas y moleculares de algunos de los síndromes de inestabilidad genómica se deben tener en cuenta como diagnóstico diferencial de la AF.

1.8.1.1. Síndrome de Seckel

El síndrome de Seckel (SS) es una rara enfermedad genética de patrón autosómico recesivo. Hasta el momento menos de 100 casos han sido reportados. Clínicamente se caracteriza por retraso del crecimiento intrauterino, enanismo osteodisplásico proporcionado (dwarfismo), una microcefalia severa que confiere un aspecto característico facial de “cabeza de pájaro” [con retrognatia, frente hundida, y nariz picuda y prominente ("pico-corno")] y retraso mental (MIM 210600) (O’Driscoll et al., 2004; Faivre et al., 2002; Shanske et al., 1997). Sin embargo otras malformaciones congénitas también han sido reportadas entre las que están alteraciones del desarrollo como clinodactilias u

otras anormalidades óseas, pliegue simiano, cardiopatías congénitas y fibrosis pulmonar. Se han encontrado anomalías hematológicas y rupturas cromosómicas sólo en un subgrupo de pacientes. Entre las anomalías hematológicas están la aplasia medular y LMA (Hayani et al., 1994). Los pacientes con síndrome de Seckel, quienes mostraron rupturas cromosómicas espontánea e inducida por agentes generadores de ICLs también presentaban pancitopenias o neoplasias hematológicas (Hayani et al., 1994; Syrrou et al., 1995; Woods et al., 1995). En la figura 34 se ilustran algunas de las características clínicas de estos pacientes.

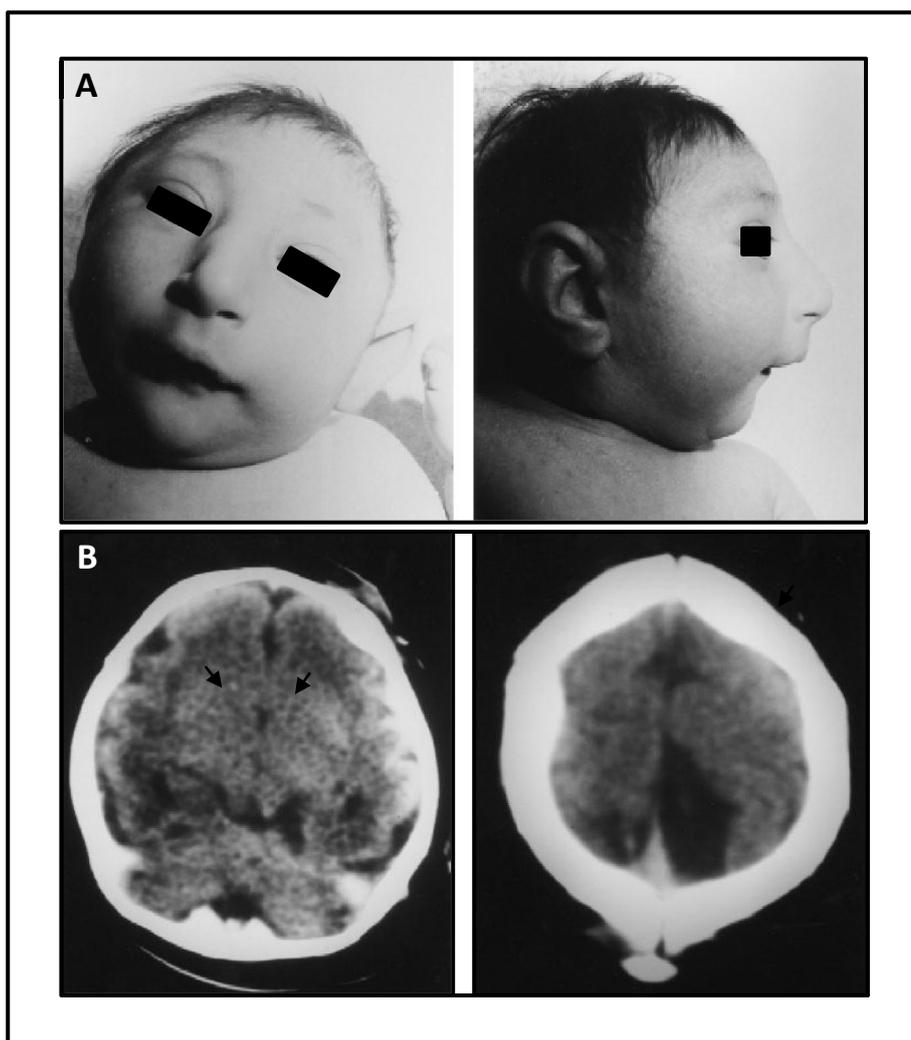


Figura 34. Paciente con síndrome de Seckel. (A) Es evidente la facies característica anteriormente descrita, junto con la marcada microcefalia y orejas prominentes. **(B)** En la tomografía axial computarizada de cerebro del mismo paciente se evidencia una disgenesia de la corteza cerebral con ausencia del cuerpo calloso (flechas de la imagen izquierda), una marcada paquigiria (circunvoluciones cerebrales de un tamaño superior a lo normal), así como un quiste cerebral dorsal derecho (flecha de la imagen derecha). Imágenes tomadas del reporte realizado por Shanske y colaboradores, en dos pacientes con SS, sobre sus alteraciones en el sistema nervioso central (Shanske et al., 1997).

Esta patología es genéticamente heterogénea, ya que en estos pacientes se han identificado diferentes genes como causantes de la enfermedad, lo cual ha llevado hasta el momento a agruparlo en 7 tipos. Entre los genes implicados está el gen *ATR* (MIM 601215) para el tipo 1, para el tipo 2 (MIM 606744) está el gen *RBBP8* (MIM 604124), para el tipo 3 (MIM 608664) está en el locus del cromosoma 14 sin un gen identificado, para el tipo 4 (MIM 613676) está el gen *CENPJ* (MIM 609279), para el tipo 5 (MIM 613823) está el gen *CEP152* (MIM 613529), para el tipo 6 (614728) está el gen *CEP63* (MIM 614724) y para el tipo 7 (MIM 614851) está el gen *NIN* (MIM 608684). Recientemente ha sido identificado en un paciente SS con mutaciones en el gen *ATRIP* (Tomoo Ogi et al., 2012). Esto sugiere que proteínas relacionadas con la activación de ATR pueden generar esta patología.

El diagnóstico se basa las características clínicas, hallazgos radiológicos y si es posible en la identificación del defecto genético. Sin embargo su solapamiento clínico con otros síndromes como AF, síndrome de ruptura cromosómica de Nijmegen y la deficiencia de la ligasa IV (*LIG4*) complica su diagnóstico. Por fortuna existen biomarcadores citogenéticos que permiten diferenciarlo de otros síndromes. Las células del SS no parecen presentar una radiosensibilidad marcada como el síndrome de ruptura cromosómica de Nijmegen o *LIG4*. Estudios sobre células derivadas de pacientes SS demostraron deficiencia de la fosforilación de una gama de sustratos dependientes de ATR (*H2AX*, *p53*, *Nbs1* y *Rad17*) después de la exposición a la radiación UV, pero con una respuesta de ATM normal a la RI (O'Driscoll et al., 2003). Más recientemente, se ha observado la fosforilación defectuoso similar en células de SS después de la exposición a la hidroximetilurea (O'Driscoll et al., 2004). Estas células muestran una sensibilidad moderada a los rayos UV y el agente generadores de ICLs, como la MMC. Adicionalmente las células SS aunque no son deficientes en *FANCD2-Ub* no muestran aumento de la *FANCD2-Ub* en respuesta a daño. Por lo tanto, el control de *FANCD2-Ub* por ATR es un mecanismo de regulación adicional al daño del DNA (Andreassen et al., 2004).

1.8.1.2. Síndrome de ruptura cromosómica de Nijmegen

El síndrome de ruptura cromosómica de Nijmegen (NBS, sigla del inglés) es un síndrome raro autosómico recesivo caracterizado principalmente por inestabilidad cromosómica, microcefalia, inmunodeficiencia combinada y predisposición a cáncer a edades tempranas (MIM 251260) (CRHzanowska et al., 2012). Las principales manifestaciones clínicas de este síndrome son: microcefalia en todos los pacientes, presente en el nacimiento y progresiva con la edad, rasgos faciales dismórficos en todos los pacientes, retraso leve del crecimiento en todos los pacientes, discapacidad intelectual leve a moderada en un 60%, y en las mujeres el hipogonadismo hipergonadotrópico e insuficiencia ovárica prematura. Anomalías esqueléticas menores como la clinodactilia del quinto dedo o la sindáctila del segundo y tercer dedo se ha reportado en la mitad de los pacientes. Anomalías de pigmentación de la piel ha sido observada en 50 a 70% de los pacientes. Las figuras 35 ilustran algunas de las manifestaciones clínicas de los pacientes con NBS.

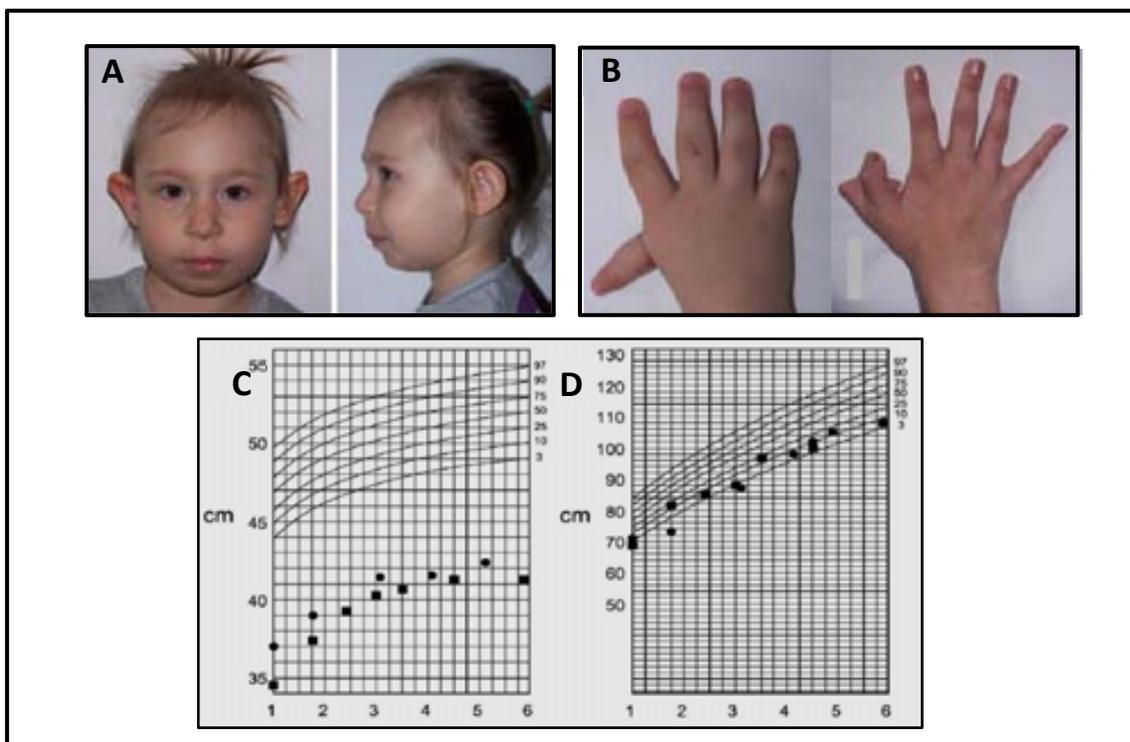


Figura 35. Pacientes con NBS. (A) Facies características de un paciente con NBS en una niña de 3.5 años (B) Pulgar con hipoplasia tipo IV con duplicación del otro pulgar tipo VI en un paciente de 16 años (C) Circunferencia cefálicas de los dos hermanos en la cual se muestra una marcada microcefalia. (D) Curva de crecimiento longitud de los dos hermanos de la imagen (C). Imágenes tomadas de dos artículos diferentes sobre NBS (CRHzanowska et al., 2012; Digweed & Sperling, 2004).

Aunque es considerada una enfermedad rara no hay actualmente una estimación real de su prevalencia. Hasta la fecha solo hay alrededor de 150 casos reportados en la literatura, sin haber una predilección por alguno de los géneros. Debido a una mutación fundadora en el gen *NBS1/NBN* (c.657_661del5, p.K219fs*19) la enfermedad se encuentra con más frecuencia entre las poblaciones eslavas (1/76) (CRHzanowska et al., 2012; New et al., 2005; The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, 2000).

El único gen identificado como responsable ha sido el gen *NBS1/NBN*, el cual codifica para una proteína llamada nibrina. La nibrina es necesaria no sólo para la activación de ATM, sino también para la fosforilación por la quinasa ATR.

ATM es el activador primario de la respuesta celular a rupturas de doble cadena y es responsable de fosforilar cientos de proteínas diana en respuesta a daño por IR, incluyendo la nibrina. ATM está implicado en las vías de apoptosis inducida por exposición a IR, dependiente e independientemente de p53. La reducción de la apoptosis en las células mutantes para la nibrina refleja un fallo en la activación de ATM. Por lo cual, claramente, esta interacción entre nibrina y ATM explica la gran similitud fenotípica a nivel clínico y celular entre ataxia telangiectasia (AT) y NBS (CRHzanowska et al., 2012; Digweed & Sperling, 2004). Junto con las proteínas MRE11 y RAD50, NBS1 forma el complejo MRN, siendo NBS1 esencial para la formación de este complejo en respuesta a la exposición a distintos agentes genotóxicos. Estas proteínas están involucradas en el procesamiento de rupturas de doble cadena de DNA, en la recombinación meiótica, las reorganizaciones de los segmentos V(D)J y en el mantenimiento telomérico (CRHzanowska et al., 2012).

El diagnóstico de esta patología se hace en base a criterios clínicos, análisis de marcadores citogénéticos y moleculares. Dentro de los criterios clínicos se debe tener en cuenta la microcefalia, las infecciones recurrentes del tracto respiratorio, la inmunodeficiencia combinada y malignidades principalmente de origen hematológico. La confirmación se llega a realizar por la confirmación de inestabilidad cromosómica por ensayos citogenéticos. En este caso la evidencia de rupturas cromosómicas espontáneas puede ser útil, pero el ensayo más útil es el ensayo de viabilidad de colonias y el ensayo de síntesis de DNA resistente a radio después de ser expuestas a la RI o radiomiméticos. El análisis por WB permite la detección de la proteína nibrina con el fin de

evaluar su tamaño correcto. Encontrar una nibrina de tamaño adecuado, tras la secuenciación ha mostrado sólo una secuencia de tipo salvaje, lo cual permite excluir con alta probabilidad el diagnóstico de NBS. El análisis genético para la identificación de mutaciones en el gen *NBN* ha resultado muy útil sobre todo en poblaciones eslavas debido a que un 90% de los pacientes presentan la mutación fundadora ya mencionada.

De todos modos se recomienda hacer un diagnóstico teniendo en cuenta todos los criterios y sin olvidar los diagnósticos diferenciales. Entre los síndromes diferenciales está la AF, la ataxia telangiectasia *like* (ATL), el síndrome de Bloom (SB), la inmunodeficiencia severa combinada con microcefalia (síndrome NHEJ1), enfermedad SRN-*like* (SRNL), la deficiencia de la ligasa IV (LIG4) y SS.

1.8.1.3. Síndrome de Bloom

El síndrome de Bloom (SB) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva. La prevalencia es extremadamente rara, con sólo unos 265 casos, en su mayoría de origen judío *Ashkenazi*, confirmados en todo el mundo desde 1975. Tampoco hay una significativa diferencia en el género, presentando una relación hombre:mujer de 1.1:1 (*Bloom's Syndrome Registry*, http://weill.cornell.edu/bsr/data_from_registry). Clínicamente se caracteriza por eritema telangiectásico en la cara, antebrazos y dorso de las manos, fotosensibilidad, corta estatura, manchas café con leche, alteraciones esqueléticas, infertilidad masculina, problemas de aprendizaje, inmunodeficiencias, complicaciones crónicas como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la diabetes mellitus y predisposición elevada a sufrir leucemias, linfomas y carcinomas (especialmente de piel y gastrointestinales) (Bhisitkul & Rizen, 2004; Kamenisch & Berneburg, 2009; Kaneko & Kondo, 2004; Zatterale et al., 2007). La figura 36 muestra algunas características clínicas de los pacientes con SB.

A nivel celular, podemos destacar que aparecen elevados los niveles de intercambios entre cromátidas hermanas, de rupturas cromosómicas y reordenamientos. A su vez, estas células son hipersensibles a la luz UV, la HU,

los agentes alquilantes (inductores de ICLs) y, hasta cierto punto, a la RI (Kamenisch & Berneburg, 2009; Nicotera, 1991; Kuhn & Therman, 1986).

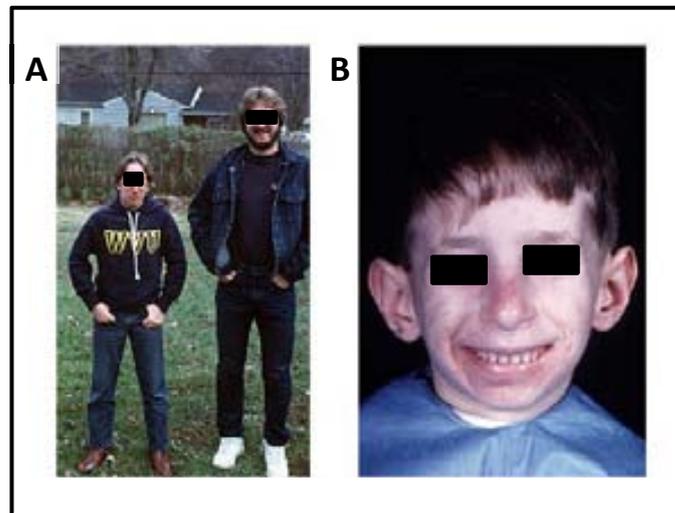


Figura 36. Pacientes con SB. (A) Dos hermanos de 17 y 19 años, el hermano afecto de SB muestra una baja estatura, adicionalmente presenta eritema facial. (B) Paciente con SB de 6 años de edad con eritema facial y una talla de 89 cm. Las imágenes fueron tomadas del Bloom's Syndrome Registry (http://weill.cornell.edu/bsr/clinical_description).

El SB es causado por mutaciones en el gen *BLM*. Este gen es un gen supresor de tumor que junto con los genes *RECQ4* y *WRN* pertenecen a la familia de helicasas RecQ, que albergan unos dominios conservados para la 3' a 5' helicasa, la cual es encargada del desenrollamiento de las cadenas dobles de DNA por medio de hidrólisis de ATP. Esta helicasas son necesarias para mantener la integridad del genoma, pero difieren en sus funciones e interacciones (BacRHati CZ and Hickson ID, 2003; Killoran MP and Keck JL, 2006). Interesantemente, se ha demostrado que hay una interacción entre las proteínas FANCD2, BLM, y ATM (Chaudhury et al., 2013; Wang et al., 2004). Adicionalmente BLM hace parte del complejo *BRCA1-associated genome surveillance* (BASC), que incluye otras proteínas de reparación del DNA como: MSH2–MSH6, MLH1, ATM, NBS1, MRE11(Wang et al., 2000). Este complejo en conjunto es responsable del mantenimiento de la estabilidad genómica y de la homeostasis del ciclo celular/apoptosis (Futaki & Liu, 2001). Por lo cual no es sorprendente la diversidad de funciones que cumple BLM. Las características de las células deficientes en BLM o RECQ4 presentan una replicación anormal del DNA anormal y unas altas frecuencias de eventos de recombinación homóloga. Las células deficientes en BLM muestran como características

citogenéticas unas altas tasas de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y figuras tetraradiales, lo cual ha permitido diseñar un ensayo citogenético para poder hacer una confirmación del diagnóstico (ver figura 37). Una cantidad excesiva de rupturas cromosómicas está presentes: rupturas de cromátidas, reordenamientos cromosómicos, así como figuras tetraradiales y el número de ICH es alto. De hecho la confirmación diagnóstica se hace con la evidencia elevada de ICH en linfocitos de SP cultivados a corto plazo (ver figura 37). De todos modos un número pequeño de pacientes no presentan anomalías cromosómicas en los linfocitos de SP (por fenómenos de mosaicismo) y se hace necesario hacer el estudio en otro tipo de células, como los fibroblastos de piel.

Interesantemente en estas tres *RecQ* helicinas se han asociado, independientemente, con 3 trastornos genéticos: el SB (*BLM*), el síndrome de Werner (*WRN*), y el síndrome de Rothmund-Thomson (*RECQ4*). Todos con una predisposición al cáncer y las dos últimos síndromes caracterizados por envejecimiento prematuro (Kamenisch and Berneburg, 2009; Karmakar et al., 2006).

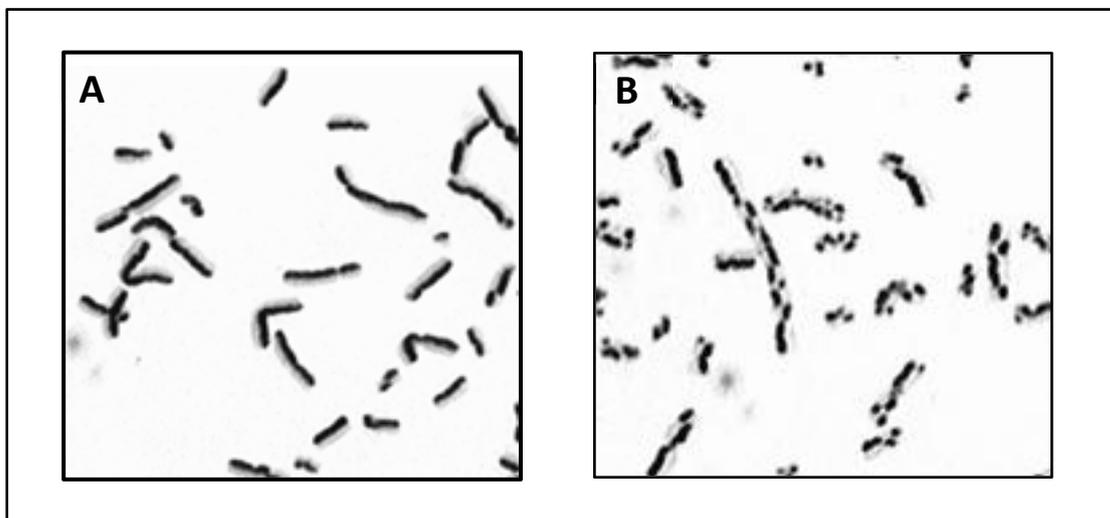


Figura 37. ICH en metafases de linfocitos de SP cultivados con bromodesoxiuridina. (A) Metafase de linfocitos de un individuo no afecto de SB, en el cual es casi nula los ICH. **(B)** Metafase de linfocitos de un individuo con SB, en el cual es notoria la lata tasa de ICH. Imágenes tomadas del Bloom's Syndrome Registry (http://weill.cornell.edu/bsr/lab_diagnosis).

1.8.1.4. Ataxia Telangiectasia

La Ataxia Telangiectasia (AT, MIM 208900) o síndrome de Louis-Barr es una enfermedad hereditaria con un patrón de herencia autosómica recesiva.

La prevalencia de AT en los Estados Unidos es 1:40,000 a 1:100,000 nacidos vivos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26468>).

La AT se caracteriza clínicamente por presentar ataxia cerebelosa progresiva a temprana edad, telangiectasias oculocutáneas, alteraciones de la pigmentación de la piel, grados variables de inmunodeficiencia, infecciones sinu-pulmonares y predisposición a desarrollar cáncer. Las telangiectasias se presentan típicamente entre los 3 a 5 años. A nivel inmunológico los pacientes con AT a menudo revelan alteraciones tanto de la inmunidad humoral como de la mediada por células (Ambrose and Gatti, 2013; Greenberger et al., 2013; Kamiya et al., 2001; Perreault et al., 2012). La figura 38 ilustra algunas de las manifestaciones clínicas típicas de estos pacientes.

A nivel celular, los paciente AT presentan rupturas cromosómica características, así mismo son hipersensibles a rupturas de doble cadena de DNA inducidos por el cisplatino o RI y resistente a la inhibición de la síntesis de DNA por RI. Este último rasgo se ha utilizado para identificar grupos de complementación de la forma clásica de esta patología (Kojis et al., 1991).



Figura 38. Pacientes con AT. (A) Paciente con una telangiectasia ocular. **(B)** Paciente con una telangiectasia cutánea a nivel del cuello. Imágenes tomadas de la publicación “*Dermatologic manifestations of ataxia-telangiectasia síndrome*” (Greenberger et al., 2013).

La causa de la enfermedad es una mutación en el gen *ATM*, el cual codifica para una proteína fosfatidilinositol 3 kinasa. *ATM* es una proteína

predominantemente nuclear que está implicada en el reconocimiento temprano y respuesta a las rupturas de doble cadena del DNA. También desempeña diversas e importantes funciones citoplasmáticas como la fosforilación de cientos de sustratos de proteínas que activan y coordinan las vías de señalización celular implicadas en los puntos de control del ciclo celular, la localización nuclear, la transcripción y expresión de genes, la respuesta al estrés oxidativo, respuesta al daño de doble cadena de DNA, apoptosis y “*nonsense-mediated decay*” . Como se comentó anteriormente, también hace parte del complejo *BRCA1-associated genome surveillance* (BASC) (Wang et al., 2000). Por lo cual las funciones de ATM están interrelacionadas con una serie de proteínas que protegen contra la inestabilidad del genoma y reducen el riesgo de cáncer y otras patologías (Ambrose & Gatti, 2013; Cremona & BeRHens, 2013; Lee JH & Paull TT, 2007; Celli & de Lange, 2005; Futaki & Liu, 2001; Abou-ZaRH et al., 1999). En cuanto al ciclo, en la meiosis, ATM es necesaria para la recombinación, y en la mitosis está implicado en la activación de los puntos de control del ciclo celular en respuesta al daño del DNA. Esta última función puede evitar anomalías cromosómicas y e inestabilidad cromosómica al detener el progreso del ciclo celular hasta que se repare el daño del ADN y por lo tanto sincronizar las posteriores etapas mitóticas (Ambrose & Gatti, 2013; Kamenisch & Berneburg, 2009; Lavin, 2008).

Finalmente, el diagnóstico de AT se basa en los hallazgos clínicos, además de antecedentes familiares. Sin embargo debido a la presentación de un fenotipo no clásico este se hace complicado y se requiere su confirmación con algunas pruebas de apoyo al diagnóstico. Estas incluyen niveles bajos de la proteína ATM intracelular por WB, elevada concentración sérica de alfa-fetoproteína (en el 95% de los pacientes) (Stray-Pedersen et al., 2007), análisis cromosómico en linfocitos de SP, análisis de la inmunodeficiencia y ensayos *in vitro* de radiosensibilidad (Greenberger et al., 2013; Perreault et al., 2012; Kamiya et al., 2001; Kojis et al., 1991).

1.8.1.5. Otros síndromes de inestabilidad genómica

La inestabilidad cromosómica puede ocurrir cuando la respuesta al daño en el DNA, los sistemas de reparación y homeostasis fallan. Es por ello que el

defecto genético en uno de estos sistemas lleva a la presentación de uno de los diferentes síndromes de inestabilidad genómica. Estos están caracterizados por un patrón autosómico recesivo principalmente, con un fenotipo clínico de anomalías del crecimiento y del desarrollo, defectos hematopoyéticos e inmunológicos, sensibilidad a agentes genotóxicos y mutágenos y una alta predisposición al cáncer. En la figura 40 se esquematiza los posibles defectos presentes en estos sistemas de reparación del daño en el DNA y sus consecuencias a nivel celular.

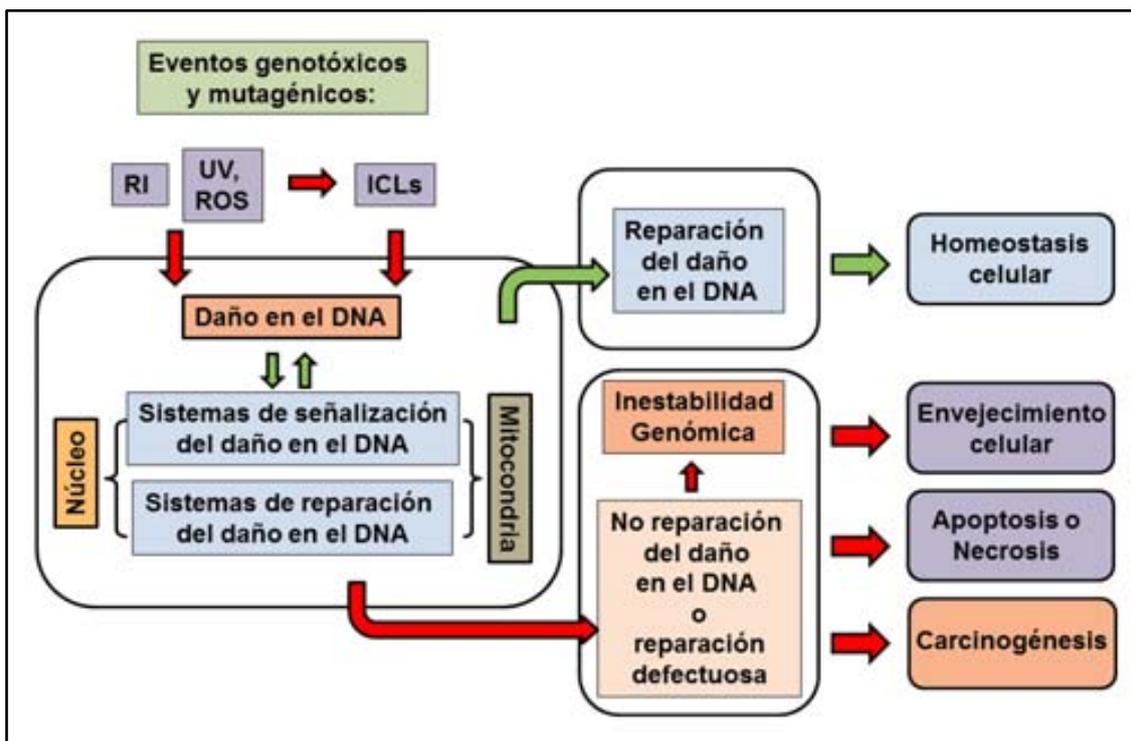


Figura 40. Respuesta al daño en el DNA. El daño generado en el DNA por eventos genotóxicos y/o mutagénicos activa los sistemas de señalización de daño en el DNA e inician la activación de los sistemas específicos de reparación del DNA y la regulación de los puntos de control del ciclo celular y la apoptosis. Si la reparación es defectuosa o no se da, las células afectadas pueden sufrir uno de los siguientes eventos. Si el daño no es compatible con la vida, se inicia la apoptosis o necrosis. Por el contrario, si las células son viables pueden iniciar procesos de envejecimiento prematuro, evitando la replicación celular, o bien, si se mantiene la replicación celular, que pueden conducir a eventos precancerosos (Kamenisch & Berneburg, 2009).

Aparte de los síndromes de inestabilidad comentados anteriormente hay otros síndromes que por su fenotipo celular o clínico se solapan no solo con AF sino también con otros síndromes. Tal es el caso del síndrome de rupturas cromosómicas de Varsovia (SRV, MIM 613398) y el síndrome de Roberts (SR, MIM 268300) (Petra van der Lelij et al., 2010). La prevalencia de estas dos patologías es desconocida.

Estas patologías presentan un patrón de herencia autosómica recesiva y están catalogadas como cohesinopatías debido a que sus genéticos están implicados con defectos en los componentes estructurales y reguladores del complejo de la cohesión de cromátidas hermanas. Este complejo mantiene los cromosomas recién replicados juntos desde el momento de su síntesis en la fase S hasta que se separen durante la mitosis. Los genes implicados hasta la fecha en estas dos patologías son para el SR el gen *ESCO2* y para el SRV el gen *DDX11* (Gerton, 2012; Lelij et al., 2010; Petra van der Lelij et al., 2010).

Clínicamente los pacientes con SR se caracteriza por retraso en el crecimiento prenatal y postnatal, anomalías graves y simétricas de los miembros (principalmente focomelia y en menor grado otras anomalías esqueléticas), malformaciones craneofaciales y déficit cognitivo severo. En cuanto a la clínica del SRV, el único paciente reportado muestra retraso severo del crecimiento, microcefalia, dismorfología facial, paladar ojival, coloboma del disco óptico derecho, sordera debido a anomalías estructurales del oído interno (hipoplasia bilateral de cóclea), defecto septal ventricular, clinodactilia bilateral del quinto dedo, sindactilia de los dedos segundo y tercero, cutis marmorata y una hipo- e hiperpigmentadas de la piel, y un pedigrí con una alta incidencia de cáncer familiar. Las células de estos pacientes, tanto SRV como SR, presentan anomalías cromosómicas, principalmente separación prematura de determinadas regiones de los cromosomas, pero también aberraciones cromosómicas como las presentes en AF. Además estas células presentan retraso de la división celular, incremento de la muerte celular y defectos en la proliferación celular. Estudios realizados en células de estos pacientes revelaron hipersensibilidad a MMC y DEB con generación de anomalías cromosómicas y parada de la fase G2/M del ciclo celular similar a AF, pero con la diferencia que también presentaban separación prematura de cromátidas hermanas (no visto hasta la fecha en células AF) (Lelij et al., 2010; Petra van der Lelij et al., 2010). En una tercera cohesinopatía conocida como síndrome de Cornelia de Lange, estudios en algunos estos pacientes han reportado hipersensibilidad celular a MMC lo cual sugiere también un posible solapamiento celular con AF (Vrouwe et al., 2007). Esta patología es un trastorno del desarrollo multisistémica, causada por mutaciones en genes componentes del complejo de la cohesina (*SMC1A* y *SMC3*) o su factor

regulador *NIPBL* y con un patrón de herencia autosómico dominante, presenta características clásicas de dismorfismo facial, malformaciones de las extremidades superiores, hirsutismo, retraso en el crecimiento y déficit cognitivo, pero también con un amplio espectro de severidad clínica (Liu & Krantz, 2009). En un reporte clínico de un paciente con SR reportaron una reacción leucemoide después de un episodio de infección del tracto urinario con una trombocitopenia moderada durante dos años de vida, de hecho unos de los diagnósticos diferenciales de esta enfermedad es el síndrome de trombocitopenia con radio ausente (Urban et al., 1997).

El diagnóstico de SR y SRV se basan en los signos clínicos y en su confirmación citogenética debido a la apariencia típica de los cromosomas en forma de “rieles de tranvía”. La secuenciación directa de los genes implicados permite reconfirmar el diagnóstico (Lelij et al., 2010; Petra van der Lelij et al., 2010). Con respecto al fenotipo clínico, los autores sugieren que la pérdida de las células progenitoras durante la embriogénesis posiblemente sea la causa de las anomalías del desarrollo observadas.

Por otra parte, genes es posible que otros genes implicados de manera no tan específica en reparación de ICLs también puedan dar cierto solapamiento celular con AF. Tal es el caso de gen *FAN1/KIA1018*, el cual fue descubierto hace pocos años como un nuevo gen involucrado en la reparación de daño en el DNA inducido por agentes generadores de ICLs así como en la prevención de la separación de las cadenas durante la mitosis (Kratz et al., 2010; Liu et al., 2010; MacKay et al., 2010; Shereda et al., 2010).

Más recientemente, este gen fue identificado como uno de los genes causantes de la nefritis intersticial cariomegálica (NIC). Las células de estos pacientes eran deficientes en *FAN1* y mostraban hipersensibilidad a la MMC, pero no fragilidad cromosómica, ni parada del ciclo celular en fase G2/M después de ser tratadas con DEB (Zhou et al., 2012). A pesar de la presencia de algunos de las anomalías físicas se superponen con AF, las características clínicas de los individuos con NIC difieren del fenotipo clínico individuos con AF. Además, las células deficientes en *FAN1* son menos hipersensibles a agentes inductores de ICLs que las células AF (Lans and Hoeijmakers, 2012; Zhou et al., 2012; Trujillo et al., 2012).

Finalmente, se quedan muchos otros síndromes por mencionar cuyas causas han sido demostradas por deficiencia de algunas de las rutas de señalización o reparación del daño en el DNA y mantenimiento de la estabilidad genómica. Con la explosión de datos de interacción de los estudios de proteómica de alto rendimiento y de bioinformática se tiene ahora la oportunidad de diseñar redes de interacciones proteína-proteína. De todos modos, estos métodos deberán tener en cuenta que las proteínas dentro de un complejo tienen más de una interacción, redes cada vez más complejas, lo cual plantea todo un reto estimar la magnitud del efecto biológico cuando se presenta un defecto en algunas de estos componentes. Es por ello que vale la pena rescatar el concepto del complejo BASC, en el que seguramente no sólo estarán implicadas las proteínas propuestas por Wang y colaboradores (2000) en su modelo inicial sino que habrá una interconexión mucho más compleja de muchas más proteínas con múltiples funciones (ver figura 41) (Futaki and Liu, 2001).

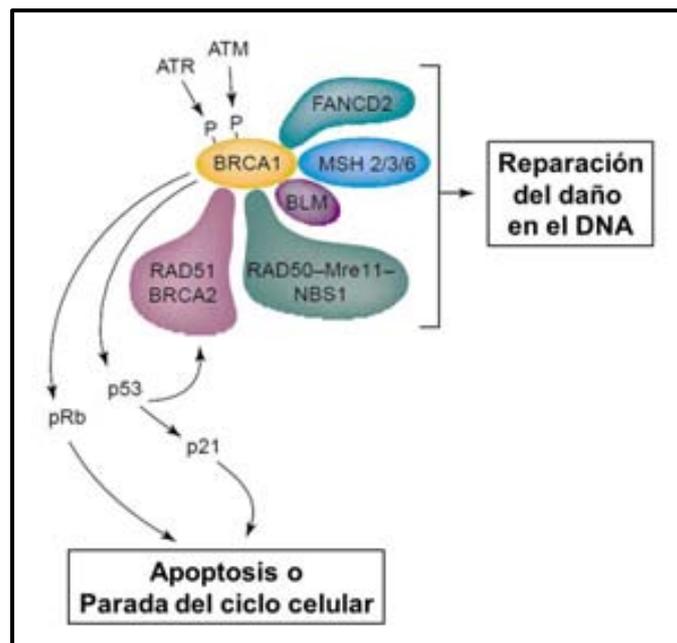


Figura 41. Hipotético modelo del complejo BASC. Como se muestra en el diagrama esquemático, ATM y ATR fosforilan BRCA1. Ello permite su interacción con otras proteínas. Dichas interacciones pueden estar involucradas en la respuesta o la reparación del daño en el DNA, mientras que otras interacciones pueden tener consecuencias para el control del ciclo celular y la apoptosis. Modelo tomado de la publicación “*Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex*” (Futaki and Liu, 2001).

1.9.2. Síndromes de fallo de médula ósea congénitos

Los síndromes de fallo de la médula ósea congénita (SFMOCs) son trastornos multisistémicos con diversos grados de defectos en la producción de células hematopoyéticas que conducen a la citopenia de un solo linaje hasta múltiples linajes (Dror, Yigal, 2011; Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010). Los SFMOCs están considerados dentro de las enfermedades monogénicas con una alta heterogeneidad genética.

La incidencia estimada para estos síndromes esta en dos casos nuevos para un millón de personas por año y de 65 casos por cada millón de niños nacidos (Tsangaris et al., 2011). Las aplasias medulares se presentan a menudo en la infancia, pero en algunos casos puede manifestarse a la edad adulta. Adicionalmente la heterogeneidad clínica y el solapamiento a nivel fenotípico hacen necesarios su estudio y análisis tanto medular como genético para poder llegar a un diagnóstico correcto. De hecho, algunos pacientes que inicialmente pueden ser catalogados de etiología “idiopática” con una mejor comprensión de su patofisiología y con la ayuda de las nuevas tecnologías pueden llegar a ser nuevamente catalogados dentro de algunos de estos síndromes genéticos (Dokal and Vulliamy, 2010a; Shimamura and Alter, 2010).

Es importante tener en cuenta que la causa de aplasia medular congénita más frecuente en niños es la AF, con una estimación de un 30% (Shimamura and Alter, 2010). Por lo cual, cuando se está frente a un caso de sospecha de aplasia medular congénita usualmente se inicia con el estudio de AF (Shimamura & Alter, 2010).

El fallo de médula ósea a menudo causa una significativa morbilidad y mortalidad, y muchos pacientes requieren transfusiones sanguíneas de por vida, tratamiento de infecciones, factores de crecimiento y TPH. Debido a los problemas hematológicos y no hematológicos presentan alto riesgo de predisposición a desarrollar cáncer y una mayor toxicidad relacionada con el tratamiento y una reducida esperanza de vida (Dror, Yigal, 2011; Shimamura and Alter, 2010).

A continuación se comentaran algunos de estos síndromes implicados en fallo medular congénito.

1.9.2.1. Disqueratosis congénita

El segundo síndrome a tener en cuenta frente a un caso de anemia aplásica es la Disqueratosis congénita (DC, MIM 305000, 127550, 224230). Esta patología que inicialmente fue considerada como una displasia ectodérmica y llamada síndrome de “Zinsser- Cole–Engman” desde 1910 hasta 1960. Solo hasta los años de 1960 fue asociada a problemas hematológicos y a partir su nuevo concepción ha venido evolucionando (Shimamura and Alter, 2010).

Es una enfermedad de patrón recesivo autosómico y ligado al cromosoma X y autosómico dominante. La relación entre hombre:mujer se ha estimado en 3.2:1 entre los 550 casos reportados en la literatura (Shimamura and Alter, 2010). Clínicamente el 75% de los pacientes presentan anomalías congénitas. La tríada del diagnóstico, incluye distrofia ungueal, pigmentación poiquilodérmica y leucoplasia de la mucosa oral (ver figura 42). Estas anomalías comprenden en la literatura un 70%, 67%, y 47%, respectivamente, y 75% de los pacientes reportados tienen por lo menos uno de estas malformaciones, el 46% tenían las 3. Otros de los problemas clínicos que presentan en menor frecuencia es la estenosis del conducto lagrimal, estenosis esofágica, osteopenia, anomalías en la dentición, escaso cabello o cabello gris tempranamente y retraso en el desarrollo. Hay dos subconjuntos muy graves de DC.



Figura 42. Tríada clínica de los pacientes con AF. (A) Pigmentación poiquilodérmica a nivel del cuello de un paciente con DC. **(B)** y **(D)** Leucoplasia de la lengua y de la mucosa oral, respectivamente. **(C)** Distrofia ungueal a nivel de un pie. Imágenes tomadas de la publicación “*Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes*” (Shimamura & Alter, 2010).

Los pacientes con el Síndrome de *Hoyeraal-RHeidarsson* (HH, MIM 300240) tienen hipoplasia cerebelosa con una ataxia y retraso en el desarrollo, así como microcefalia, inmunodeficiencia, retraso del crecimiento intrauterino, y la aparición de la anemia aplásica severa a temprana edad. Los pacientes con el síndrome de *Revesz* (RS, MIM 268130) presentan retinopatía exudativa bilateral, retardo del crecimiento intrauterino, anemia aplásica, y calcificaciones del sistema nervioso central (SNC) (Dokal & Vulliamy, 2008; Shimamura & Alter, 2010).

La edad media de diagnóstico de la DC es de 14 años, con un rango desde el nacimiento hasta los 75 años. Los pacientes con DC no presentan un edad pico para el inicio de la anemia aplásica, pero se ha visto que el riesgo de padecer esta se incrementa en 1% a los 20 años y del 10% a los 50 años. estos pacientes también tiene una predisposición a desarrollar cáncer, siendo la edad media de vida libre de cáncer ha sido determinada por lo casos reportados en 68 años siendo más frecuentes los tumores sólidos (Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010).

A nivel molecular la DC se caracteriza por un acortamiento acelerado de los telómeros que lleva a disfunción o muerte celular. Esto es debido a que las mutaciones génicas que causan la enfermedad están implicadas en el mantenimiento y estabilidad de los telómeros, aunque hay un 40% de pacientes sin mutaciones en estos genes (ver tabla 11) (Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010). La figura 51 ilustra la vía de mantenimiento de los telómeros por el complejo protector.

Subtipo DC	% pacientes	Locus	Gen	Exones	Proteína
RLX	30-40	Xq28	<i>DKC1</i>	15	Disqueratina
AD	5	3q26	<i>TERC</i>	1	TERC
	5	5p15	<i>TERT</i>	16	TERT
	10	14q11	<i>TINF2</i>	6	TIN2
AR	1	15q14	<i>NOP10/ NOLA3</i>	2	NOP10
	1	5p15	<i>TERT</i>	16	TERT
	1	5q35	<i>NHP2/ NOLA2</i>	4	NHP2
No caracterizada*	40-50	?	?	?	?

Tabla 11. Subtipos genéticos de la DC. *Es probable que estos representan más de un locus génico. RLX: recesivo ligado al X, AD: autosómico dominante, AR: autosómico recesivo (Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010).

Los telómeros son estructuras especializadas en los extremos de cromosomas que facilitan la replicación del DNA terminal y previenen de reordenamientos cromosómicos resultantes de extremos libres. Los telómeros están constituidos por secuencias repetidas en tándem TTAGGG que se asocian con un complejo de proteínas llamado shelterina para su protección y mantenimiento (ver figura 43). Durante La replicación del DNA, la enzima telomerasa genera secuencias de repetición telomérica en el extremo 3'-hidroxilo utilizando el RNA TERC como plantilla. Cuando los niveles de telomerasa son limitados, con las divisiones celulares repetidas se van acortando secuencial los telómeros (Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010).

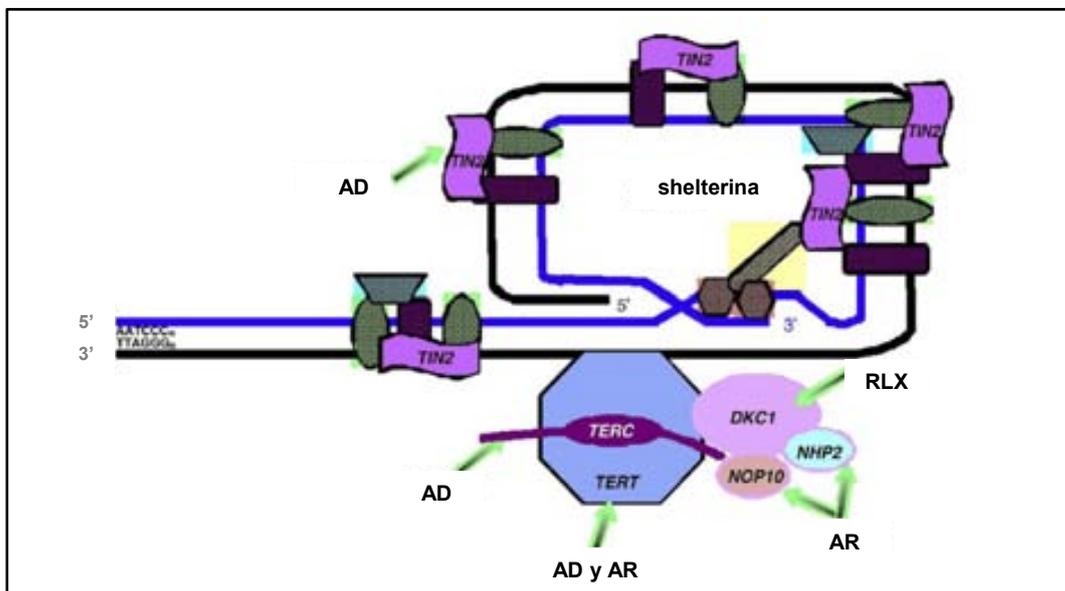


Figura 43. Vía del complejo protector de los telómeros o shelterina y las proteínas implicadas en DC. TERT: enzima telomerasa, TERC: RNA plantilla, DKC1, NHP2 y NOP10: proteínas asociadas al complejo protector. TIN2 codifica la proteína TIN2, involucrados en el mantenimiento de shelterina. Imagen tomada de la publicación “*Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes*” (Shimamura & Alter, 2010).

El diagnóstico se basa en la identificación de los hallazgos clínicos patognomónicos de la DC (triada clínica) y otras anomalías tanto hematológicas como de cáncer. Sin embargo en el porcentaje de pacientes sin malformaciones congénitas se hace necesario un estudio de acortamiento de telómeros en leucocitos de SP (Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010; Vulliamy et al., 2004).

Se sabe que cuando los telómeros se acortan por debajo de una longitud crítica, la senescencia replicativa se activa y limita la capacidad de proliferación

de las células. Los tejidos con una alta proliferación tales como de los del sistema hematopoyético, y la mucosa epitelial están más a menudo clínicamente afectados en DC (Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010). Otra manifestación crítica de la enfermedad, un fenómeno conocido como anticipación de la enfermedad, se observaron en las generaciones sucesivas con mutaciones en TERC o TERT. Esta anticipación de la enfermedad lleva a heredar telómeros cada vez más cortos en cada generación subsiguiente (Armanios et al., 2005; Vulliamy et al., 2004).

El manejo médico de la DC incluye dependiendo del compromiso y respuesta al mismo de transfusiones de sangre, tratamiento de infecciones, factores de crecimiento y TPH (Dokal & Vulliamy, 2008; Shimamura & Alter, 2010).

1.9.2.2. Anemia de Diamond-Blackfan

La anemia de Diamond-Blackfan (ADB, MIM 105650) a diferencia de otros síndrome fue identificada por primera vez sólo a causa de un anemia pura, que presentaba un paciente en el nacimiento o poco después, y que requirió tratamiento temprano. Actualmente cerca de 1,000 casos ya han sido reportados en la literatura, y aproximadamente el 25% de los pacientes reportados en la literatura tenían al menos un malformación congénita. La ADB es una enfermedad de patrón autosómico dominante con una relación hombre:mujer 1:1. La anomalía más frecuentemente es la baja estatura seguida de las anomalías del pulgar. Anomalías craneofaciales entre las que están labio leporino, paladar hendido y cuello corto se han reportado en menor frecuencia (Dokal & Vulliamy, 2008; Shimamura, 2008; Tsangaris et al., 2011). La figura 44 ilustra algunas de las manifestaciones clínicas de la ADB.

La mediana de edad para el diagnóstico es de 3 meses, con un rango desde el nacimiento hasta los 64 años de edad, siendo el 98% diagnosticado en el primer año de vida (Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010).

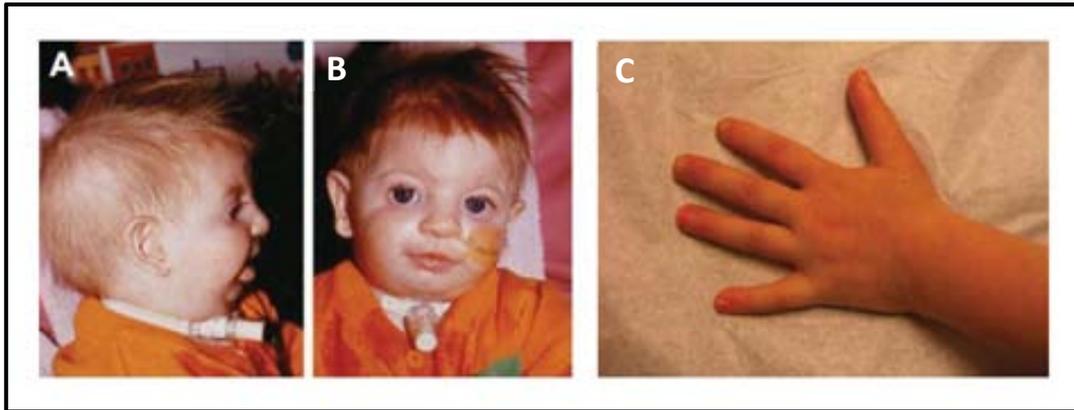


Figura 44. Pacientes con ADB. (A) y (B) Ilustra las anomalías craneofaciales características de este síndrome. En este paciente presenta ausencia de pestañas inferiores, orejas dismórficas y micrognatia. (C) Muestra un ejemplo del pulgar trifalángico en un paciente con ADB. Imágenes tomadas de la publicación “Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction” (Narla and Ebert, 2010).

La ADB es causada por mutaciones heterocigotas en los genes que codifican los componentes de la proteína de cualquiera de las subunidades ribosomales tanto pequeña 40 S (RPS19, RPS17, RPS24, RSP7, RSP10 y RSP26) o grande 60 S (RPL35A, RPL5, y RPL11) (ver tabla 12). Las mutaciones en muchos de estos genes han demostrado que afectan el procesamiento del RNA ribosómico. Alrededor del 45% de los pacientes con ADB carecen de mutaciones en estos genes identificados (Dokal and Vulliamy, 2010a; Shimamura and Alter, 2010).

El diagnóstico de ADB a nivel clínico no es tan claro. Los recuentos sanguíneos generalmente demuestran una anemia macrocítica con reticulocitopenia, así como la Hb F y la adenosina desaminasa en glóbulos rojos elevadas en más de 85% de los pacientes. A nivel de médula ósea tienen una celularidad normal o hipocelularidad de un linaje celular o de múltiples linajes, aunque lo más frecuente es la eritroblastopenia solamente. El principal diagnóstico diferencial es la eritroblastopenia transitoria de la infancia, aunque otros síndromes de fallo medular deben tenerse presente (Shimamura & Alter, 2010).

Subtipo DC	% pacientes	Locus	Gen	Exones	Proteína
AD	25	19q13.3	<i>RPS19</i>	6	RPS19
AD	2	10q22-23	<i>RPS24</i>	7	RPS24
AD	1	15q25	<i>RPS17</i>	5	RPS17
AD	7	1p22.1	<i>RPL5</i>	8	RPL5
AD	5	1p36.1-35	<i>RPL11</i>	6	RPL11
AD	3	3q29-qter	<i>RPL35A</i>	5	RPL35A
AD	1	2p25	<i>RPS7</i>	7	RPS7
AD	7	6p21.31	<i>RPS10</i>	6	RPS10
AD	3	12q13	<i>RPS26</i>	4	RPS26
No caracterizada*	40-50	?	?	?	?

Figura 12. Subtipos genéticos de la ADB. * Es probable que representan más de un locus genético. AD: autosómico dominante (Dokal & Vulliamy, 2010; Shimamura & Alter, 2010).

La incidencia acumulada para SMD, la LMA y algunos tumores sólidos (osteosarcoma, linfoma de Hodgking) han sido estimada en 20% a los 46 años según los reportes de pacientes con ADB, lo que sugiere un aumento de la predisposición a tumores malignos. Los casos de leucemia o un tumor seguidos en el tiempo demuestran que más de la mitad de los pacientes que sobrevivieron a los 40 años estaban libres de cáncer (Vlachos et al., 2012).

A nivel de manejo médico, aunque muchos de los pacientes con ADB requieren transfusiones sanguíneas, o en ocasiones TPH, responden bien a bajas dosis de corticosteroides (Dror, Yigal, 2011).

Finalmente es probable que los defectos genéticos en esta patología aceleren la apoptosis de las células progenitoras eritroides, ya que se ha demostrado que MDM2 (un regulador central de p53, que actúa como una ubiquitina ligasa que conduce a la degradación de p53) se une específicamente a varias proteínas ribosomales libres, incluyendo RPL5, RPL23, RPL11, RPS7, y RPL26. Una hipótesis alternativa o complementaria implica un desequilibrio entre la producción de hemo y globina lo cual deriva a hemolisis celular, apoptosis y anemia (Narla & Ebert, 2010).

1.9.2.3. Síndrome de Shwachman-Diamond

La primera descripción del síndrome de Shwachman-Diamond (SDS, MIM 260400) fue motivada por la observación de que varios niños con mala absorción debido a la insuficiencia pancreática también presentaban neutropenia. Aunque la herencia es autosómica recesiva, hay un alto número de casos masculinos estadísticamente significativo (hombre:mujer 1.48:1, $p < 0.001$) (Shimamura & Alter, 2010).

Clinicamente se han observado anomalías físicas en un 55% de los 560 casos descritos. La más frecuente es la baja estatura en un 50%, seguido por la evidencia radiográfica de disostosis metafisiaria en un 25%, seguidas por anomalías torácicas y retraso en el desarrollo. La edad media a la que se ha diagnosticado la mala absorción está en 2 semanas de edad, con un rango desde el nacimiento hasta 11 años. La neutropenia fue a menudo observada algo más tarde, y por lo tanto la edad en el momento del diagnóstico pudo tener algún retraso. El diagnóstico actual de SDS se basa en la combinación de la disfunción pancreática exocrina más un signo de fallo de la médula ósea (Dokal & Vulliamy, 2008; Shimamura & Alter, 2010).

La disfunción pancreática es sospecha por la evidencia de heces grasosas, y puede ser confirmada por ecografía o tomografía (imágenes de un páncreas graso), o por la medición de las enzimas duodenales, o el contenido grasas en las heces; la recomendación actual es la documentación de los niveles séricos bajos de tripsinógeno y isoamilasa pancreática (Rothbaum et al., 2002). A nivel hematopoyético se requiere la demostración de la neutropenia en más de una ocasión, a veces asociado a anemia, macrocitos, Hb F elevada, y/o trombocitopenia. En ocasiones el estudio de la médula suele mostrar hipocelularidad, con una disminución de precursores mieloides (Shimamura & Alter, 2010).

La anemia aplásica ha sido reportada en el 20% de los pacientes con una mediana de 3 años de edad (rango desde el nacimiento hasta los 35 años). La complicación hematológica más grave de SDS es el SMD y LMA con una edad media de diagnóstico de 8 años (rango desde 6 meses a 42 años). Interesantemente más de 15% de los informes descritos con SMD mostraron alteraciones citogenéticas clonales en médula ósea, siendo la más frecuente

las alteraciones del cromosoma 7 (Dokal & Vulliamy, 2008; Shimamura & Alter, 2010).

A nivel molecular, el 90% de los pacientes con SDS albergan mutaciones bialélicas en el gen *SBDS* (locus 7q11). La proteína SBSD está altamente conservada a través de la evolución, y su *mRNA* se expresa de forma ubicua. Es una proteína multifuncional, con una evidencia creciente que sugiere que el gen desempeña un papel en la biogénesis de ribosomas, el procesamiento del RNA y en la estabilización del huso mitótico (Ceci et al., 2003; Moore et al., 2010).

Las principales causas de mortalidad en SDS son las complicaciones hematológicas de insuficiencia medular y la malignidad. Los pacientes con Neutropenias severa están en mayor riesgo de infecciones. Por lo tanto el manejo médico incluye dependiendo del compromiso y respuesta al mismo de tratamiento específico de las infecciones y factores de crecimiento. El TPH está indicado para fallos de médula ósea severa o citopenias sintomáticas (Dokal & Vulliamy, 2008; Shimamura & Alter, 2010).

1.9.2.3. Otros síndromes de fallo medular congénito

Aunque se han quedado sin comentar otros síndromes que están dentro de esta categoría como es el caso de la neutropenia congénita severa, la trombocitopenia amegacariocítica, la trombocitopenia con ausente radio, entre otros, son síndromes menos frecuentes pero que siempre se deben tener en cuenta en el momento de tener un caso con aplasia medular de tipo congénito. Es evidente que el solapamiento clínico refleja en alguna medida la interconexión entre las vías que se ha demostrado estar implicadas en fallo de médula ósea. Estas vías son claramente las implicadas en la reparación del DNA, la biogénesis del ribosoma y el mantenimiento telomérico. En la figura 45 se ilustra gráficamente un posible interacción entre estas rutas.

Interesantemente, el entendimiento de estas patologías permitirá en un futuro comprender mejor la patofisiología hematopoyética con el fin de brindar un mejor manejo médico a los pacientes que padecen estos trastornos clínicos. Además, como estas patologías se asocian generalmente con anomalías en el

desarrollo y una predisposición a desarrollar algún tipo de cáncer su comprensión también proporcionará conocimientos sobre el desarrollo humano y la génesis del cáncer (Dokal and Vulliamy, 2010b).

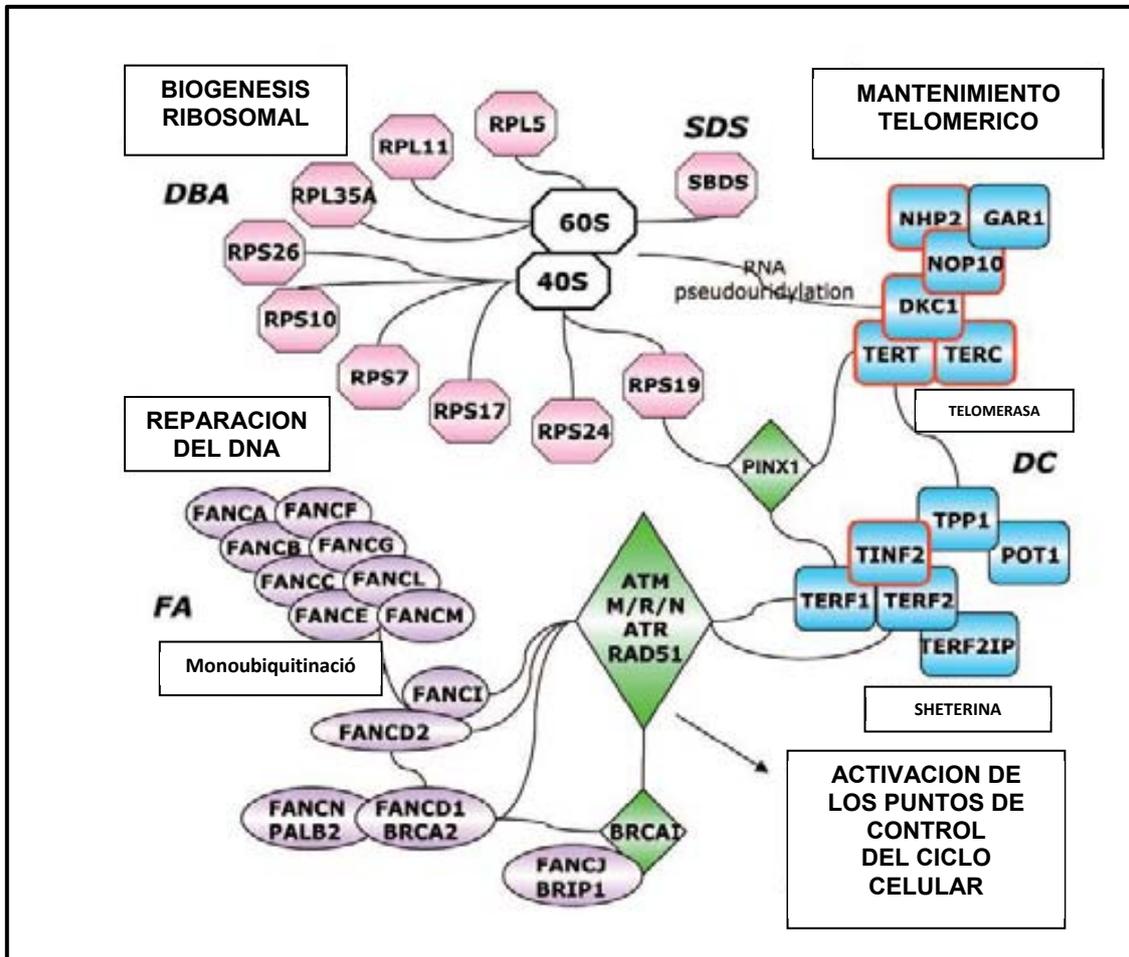


Figura 45. Modelo de interconexión de la vías que causan fallo de médula ósea. Los genes mutados en tres vías diferentes derivan a fallo medular, anomalías del desarrollo y predisposición a cáncer. A su vez todas están implicadas en la regulación de la apoptosis y del ciclo celular. Modelo tomado de la publicación “*Inherited bone marrow failure syndromes*” (Dokal & Vulliamy, 2010a)

1.10. MANEJO MEDICO DE LOS PACIENTES AF

Aunque muchas veces las diferentes publicaciones hacen énfasis en el manejo hematológico del paciente con AF, debido a que representa la mayor y más temprana causa de mortalidad, no es la única morbilidad que pueden presentar estos pacientes. Por lo cual tal como lo comentaremos en los siguientes apartados es muy importante la valoración integral de estos pacientes y el

diagnóstico temprano y manejo precoz de estas morbilidades, ya que de ellas dependerán en una gran medida su calidad de vida.

1.10.1. Manejo hematológico

El momento de la aparición de la insuficiencia medular es muy variable, aún entre hermanos como se comentó en un capítulo de las manifestaciones clínicas de AF. Por lo cual se hace fundamental hacer un estricto seguimiento en los pacientes diagnosticados con AF.

1.10.1.1. Seguimiento hematológico

La vigilancia de la médula ósea es muy importante en AF no solo para detectar los primeros signos de fallo medular sino también para identificar procesos de malignidad hematológicas. Sin embargo es imposible someter a un paciente a repetidas aspiradas de médula ósea se utiliza de rutina el seguimiento de los conteos sanguíneos de manera más rutinaria. El fallo medular se manifiesta clínicamente con conteos sanguíneos por debajo de los valores normales para la edad debido a una disminución de la eficacia de la hematopoyesis medular. Aunque muchos pacientes desarrollan una anemia aplásica manifiesta, otros pueden permanecer a niveles ligeramente anormales indefinidamente. Es aquí donde la vigilancia clínica y el manejo terapéutico deben ser guiadas por la severidad de las citopenias, la estabilidad de los conteos sanguíneos, la presencia de anomalías medulares morfológicas y citogenéticas (anomalías clones), y por los genotipos potencialmente peligrosos (como las mutaciones en el gen *FANCD1/BRCA2*). En la figura 46 se esquematiza un protocolo de vigilancia para los pacientes AF (Shimamura, 2008).

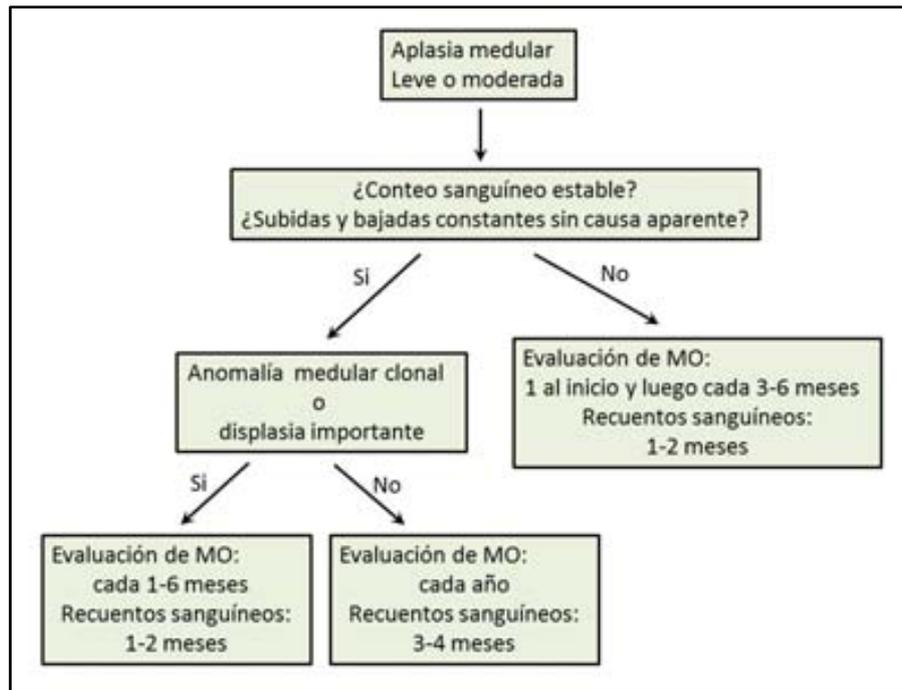


Figura 46. Vigilancia clínica del fallo medular. Anomalías clonales justifican una vigilancia estricta o una intervención inmediata. Tomado de la publicación “Lineamientos para diagnóstico y manejo de la AF”, tercera edición (Shimamura, 2008).

1.10.1.2. Tratamiento con andrógenos

Los andrógenos se han utilizado ampliamente para el tratamiento de citopenias en la AF. Los efectos de los andrógenos son más pronunciados sobre los glóbulos rojos y las plaquetas, pero también pueden mejorar el recuento de neutrófilos, aunque, actualmente no está claro el mecanismo por los cuales los andrógenos elevan los conteos sanguíneos. Se ha visto que la mejoría en la Hb se da antes de ver una respuesta de las plaquetas. Además del beneficio hematológico disminuye el riesgo de mortalidad relacionada con el tratamiento. Entre sus efectos secundarios está la masculinización, alteraciones hepáticas (adenomas, ictericia colestásica o transaminitis, pielosis), cierre prematuro de los anillos de osificación ósea e hipertensión arterial. La andrógenoterapia debe considerarse cuando la Hb del paciente cae por debajo de los 8 g/dL o si el recuento de plaquetas es inferior a 30.000/mL (Shimamura, 2008). Aunque inicialmente el andrógeno habitualmente recomendado era la oximetolona, con una dosis inicial de 2-5 mg/kg/día, los estudios actuales indican una buena efectividad del danazol con unas dosis similares de inicio y al mismo tiempo menos masculinizante que la oximetolona. (Scheckenbach et al., 2012).

Si el paciente responde a la dosis inicial con una estabilización o un aumento de la concentración de Hb, la dosis diaria puede ir reduciéndose progresivamente a partir del tercer mes en intervalos de 2 a 4 meses. Si por el contrario el paciente no mejora, el tratamiento debe suspenderse después de 4 meses de uso (Shimamura, 2008).

1.10.1.3. Transfusiones sanguíneas

Ante la presencia de un paciente con AF sintomático (astenia, adinamia, taquipnea o taquicardia) asociado a anemia en el servicio de urgencias, la transfusión de glóbulos rojos es el tratamiento estándar.

Hay que tener en cuenta en pacientes continuamente transfundidos con glóbulos rojos la sobrecarga férrica secundaria. Debido a que el cuerpo humano carece de mecanismos para eliminar activamente el exceso de hierro (cada mL de glóbulos rojos transfundido contiene cerca de 0.7 mg de hierro). El hígado es una ubicación primaria para la acumulación de hierro, aunque el tejido cardíaco también puede afectarse. Los niveles de ferritina se usan con frecuencia como marcador de la carga férrica total del cuerpo, pero su interpretación se complica por factores adicionales como la inflamación aguda o crónica e infección como la hepatitis, por lo cual la biopsia hepática se ha establecido como mejor marcador de la carga férrica total del cuerpo. El hierro elevado en el hígado $>15\text{mg/g}$ de peso seco se asocia con un riesgo elevado de toxicidad cardíaca (Brittenham et al., 1994). En estos pacientes con valores de sobrecarga férrica (7-15 mg/g de peso seco) deben instaurarse la terapia de ferroquelantes de acuerdo los protocolos establecidos para pacientes con insuficiencia medular (Scheckenbach et al., 2012).

En cuanto a las trombocitopenias, la caída de las plaquetas por debajo de 50,000/mL es un criterio para TPH, aunque la androgenoterapia también está indicada. La transfusión de plaquetas está indicada en pacientes con evidencia de lesiones o hemorragias graves, o que requieren someterse a procedimientos invasivos (Scheckenbach et al., 2012).

1.10.1.4. Tratamiento con citoquinas

Los pacientes AF suelen pueden presentar neutropenia leve a severas, como parte de su cuadro de aplasia medular. En estos casos se puede considerar el tratamiento con citoquinas como el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) cuando los recuentos absolutos de neutrófilos disminuyan de modo continuado por debajo de 500/mL o si no se eleva como reacción a una infección. El G-CSF se inicia por lo general con una dosis de 5 µg/kg/día y para GM-CSF la dosis inicial recomendada de es de 250 µg/m²/día. Si después de 8 semanas de iniciado el tratamiento el recuento de neutrófilos no mejora, este tratamiento debe suspenderse (Guinan et al., 1994; Rackoff et al., 1996). De todos modos, se recomienda una biopsia o un aspirado de médula ósea con citogenética antes del inicio del tratamiento con citoquinas, dado el riesgo teórico de estimulación del crecimiento de un clon leucémico.

1.10.1.5. Trasplante de médula ósea

El trasplante de células madre hematopoyéticas o de progenitores hematopoyéticos (TPH) actualmente es el único tratamiento curativo para la insuficiencia medular que presentan los pacientes con AF. Debido a la patología, los pacientes con AF sufren una toxicidad extrema a la quimioterapia y la radiación utilizadas en los regímenes habituales de acondicionamiento para los trasplantes. Por lo cual se han elaborado regímenes de acondicionamiento y mielosupresión por quimioterapia modificada con donante emparentado compatible, así como la introducción del agotamiento de células T para trasplantes de donante emparentado compatible y donante alternativo, que han arrojado resultados excelentes en los pacientes con AF post-trasplantados (Gluckman et al., 1995; Guardiola et al., 2000; MacMillan et al., 2000; Medeiros et al., 1999; SociÉ et al., 1998). De todas maneras, existe el riesgo de que el tratamiento quimioterapéutico y/o la irradiación pueda acelerar el desarrollo de neoplasias secundarias en estos pacientes, por lo cual se hace necesario se seguimiento médico. Otras complicaciones que se pueden presentar a corto

plazo es la enfermedad de injerto contra el huésped (EICH, puede incluir varias manifestaciones y en diferentes tejidos u órganos) e infecciones (por bacterias, hongos o virus). A largo plazo un TPH puede una EICH crónica, infertilidad, anomalías endocrinas, nutricionales o neurológicas y un alto riesgo de malignidades, así un efecto psicosocial de la cronicidad de su enfermedad (MacMillan et al., 2008).

Por todo lo comentado anteriormente, es importante que los pacientes afectos de AF con cualquier grado de insuficiencia medular sean derivados a un centro de trasplantes con experiencia en AF para su manejo adecuado. Se recomienda la tipificación HLA temprana tanto de paciente y miembros de la familia para evaluar la disponibilidad de donantes de MO potenciales (MacMillan & Wagner, 2010). Adicionalmente, las familias que deseen tener más hijos pueden interesarse por un diagnóstico genético preimplantacional (DGP) con tipificación del antígeno leucocitario humano (HLA) con el fin de tener un hijo donante sano de progenitores hematopoyéticos y HLA idéntico para el hermano afecto con AF. Esta alternativa ha beneficiado a aquellos pacientes que no cuentan con donante adecuado (Kuliev et al., 2005).

La sugerencia de un TPH preventivo es muy controvertida ante una insuficiencia medular leve o subtipos con alta predisposición a malignidades (como por ejemplo un paciente FA-D1), pero está claramente indicada ante una insuficiencia medular moderada a severa. El TPH de donante emparentado compatible (HLA idéntico) con un mínimo de transfusiones sanguíneas, sin tratamiento con andrógenos, sin evidencia de infecciones (o infecciones controladas), sin malignidades hematológicas presentes (SMD o LMA) y a una edad temprana, no siempre es posible. Con el mejoramiento de los resultados de TPH en pacientes AF independientemente de la fuente del donante y dependiendo de la urgencia del caso se puede realizar un TPH de donante no emparentado (MacMillan & Wagner, 2010). Actualmente se está haciendo énfasis en mejorar la calidad de vida en el post-TPH, dirigiendo los esfuerzos hacia la reducción de los efectos tardíos, en particular el riesgo de malignidad, esterilidad y endocrinopatías.

1.10.1.6. Terapias en el futuro: Terapia génica

Aunque en las últimas décadas los avances médicos han logrado progresos notables en los resultados de TPH en pacientes con AF, no todos los pacientes puede recibir un trasplante debido a su estado médico o ausencia de un donante de progenitores hematopoyéticos. Debido a esto se ha creado la necesidad de investigar otras posibilidades que puedan brindar alternativas para la curación del fallo medular en estos pacientes. En este sentido la terapia génica viene dando pasos firmes como una buena alternativa al TPH. La reprogramación celular hacia células madre ofrece otra posibilidad, y en ella también están trabajando actualmente diferentes grupos de investigación (Xu et al., 2013).

En cuanto a la terapia génica, existen dos mecanismos por los cuales puede realizarse. El primero es el reemplazo génico, cuando un gen de interés se inserta en un sitio en el genoma del receptor, tal como se ilustra en la figura 47. El segundo mecanismo de terapia génica es la corrección génica, que se basa en la capacidad de auto-reparación de los genomas utilizando el principio de la RRH. El reemplazo génico se realiza utilizando virus como vectores para este fin. En patologías hematopoyéticas hereditarias, como la AF, la tendencia es realizar la corrección de células madres hematopoyéticas (Tolar et al., 2011).

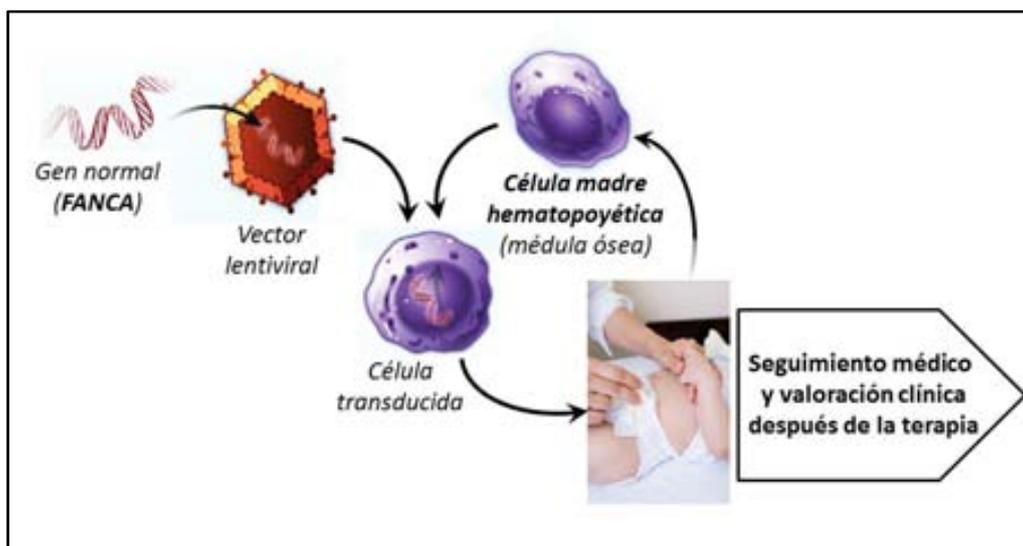


Figura 47. Terapia génica por reemplazo génico. Un niño afecto con AF, subtipo FA-A, puede ser tratado con terapia génica. Después de uno a dos años de tratamiento debería verse mejoría o estabilidad hematológica.

En el primer ensayo clínico de terapia génica (realizado en la inmunodeficiencia severa combinada ligada al X), se empleó vectores retrovirales con resultados exitosos, no obstante, en un 25% de los pacientes se presentaron leucemias. Aunque en análisis posteriores en estos pacientes se confirmó la transactivación insercional del pro-oncogén *LMO2*, es probable que su leucemogénesis fuera debida a mutaciones somáticas adquiridas (inherentes a su enfermedad) también identificadas en estos pacientes (Howe et al., 2008; Qasim et al., 2009). De todos modos, ello llevó a replantear el uso de vectores retrovirales con el fin de evitar complicaciones predecibles como la desregulación del gen inserto en ese nuevo sitio genómico así como una interrupción de los genes ubicados en la región de la inserción o la reactivación de pro-oncogenes (mutagénesis insercional). En ese sentido, el uso de los vectores lentivirales no sólo han mostrado ser más seguro (se puede redirigir su sitio de inserción génica en una región de sitio seguro del genoma), si no que han mostrado tener una transducción más rápida en los ensayos preclínicos llevados a cabo (González-Murillo et al., 2010; Jacome et al., 2009). El trabajo más avanzado en terapia génica en AF está liderado por el grupo de la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT, Madrid. El primer gran avance que dio fue el diseño de un nuevo vector lentiviral, que gracias a sus características ha sido designado por la Comisión Europea como un nuevo Medicamento Huérfano. Actualmente este grupo coordina el Proyecto Eutofancolen (*Gene Therapy Trial of Fanconi anemia patients with a new Orphan Drug*) en él participan un total de 11 grupos de investigación de 4 países europeos, en el que participan investigadores básicos y clínicos, y su objetivo es la realización de un ensayo clínico fase I y II de terapia génica en pacientes españoles con AF. Este proyecto ha dado lugar a dos reuniones de un grupo de trabajo internacional en terapia génica para AF. En estas reuniones se ha discutido temas sobre el diseño del vector lentiviral, criterios para la fabricación a gran escala del vector a nivel clínico, movilización de células madre a SP, preparación de células hematopoyéticas y criterios de elegibilidad para los pacientes AF con más probabilidades de beneficiarse del tratamiento (Tolar et al., 2011; Tremblay et al., 2013). Otros efectos secundarios que se deben tener en cuenta cuando se realiza la terapia génica es el riesgo de infección, de reacción inmunitaria del vector viral o de la

proteína corregida, la expresión inapropiada del gen ya sea secundaria al sitio genómico de inserción o al estado de diferenciación de la célula donde se expresa en gen y la aparición de malignidades.

En cuanto la reprogramación celular a partir de células somáticas afectas de AF para generar células madre hematopoyéticas corregidas hay esperanzadores avances a nivel de ensayos preclínicos. Según los resultados de los diferentes estudios parece ser que para la reprogramación no es indispensable tener una ruta FA/BRCA funcional, pero la corrección del defecto a nivel genético si es crucial para prevenir la inestabilidad genómica en las estas células reprogramadas, tal como se ilustra en el modelo de la figura 48 (Müller et al., 2012; Papapetrou, 2012; Raya et al., 2009). Por lo tanto, la terapia de reprogramación celular pueden proporcionar una alternativa atractiva a la actual terapia de células madre hematopoyéticas en AF (Müller et al., 2012; Papapetrou, 2012).

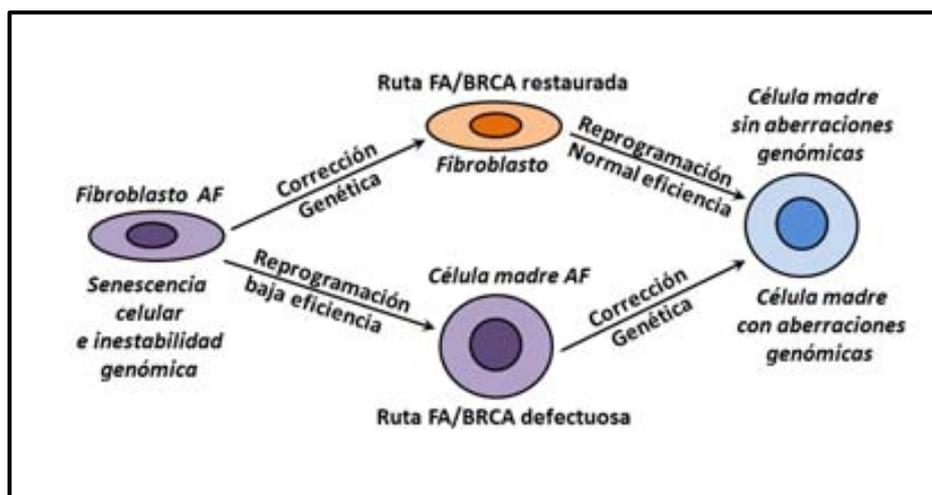


Figura 48. Reprogramación celular de una célula somática AF. La corrección genética restaura el defecto de la ruta FA/BRCA y la eficiencia de la reprogramación. Modelo tomado de la publicación "FA iPS: correction or reprogramming first?" (Papapetrou, 2012).

De todos modos, esta tecnología de terapia celular requiere estudios a largo plazo para analizar los riesgos que pueden implicar el uso de vectores virales, así como sus diferenciales características epigenéticas en la práctica clínica (Rajasingh, 2012; Sohn et al., 2012).

1.10.2. Manejo de anomalías de cabeza y cuello

Unas de las anomalías más frecuentes a nivel de cabeza y cuello en los pacientes con AF son las anomalías oculares y auditivas, las cuales a su vez pueden ser bastante incapacitantes.

En el caso de los problemas oculares tales como los errores refractarios, defectos motores de los músculos oculares, cataratas y ptosis palpebrales deben ser corregidas quirúrgicamente de acuerdo a su gravedad y disfuncionalidad. La intervención quirúrgica más temprana busca ser más favorable, por ello, es importante evaluar el sistema motor ocular y el desarrollo de las diferentes áreas de procesamiento de la información visual para determinar retrasos en el desarrollo y dar el apoyo necesario a los pacientes. Además, en las anomalías que no tienen una opción terapéutica curativa, como la hipoplasia del nervio óptico, es recomendable el seguimiento psicológico (Törnquist et al., 2013).

A nivel auditivo, mientras más temprana sea la identificación de la pérdida de audición, y el inicio de la intervención, menos serios serán los efectos permanentes. A menudo, los niños con problemas auditivos necesitan un apoyo educativo especial. Lo recomendado es una intervención terapéutica temprana adecuada, desde el nacimiento hasta los tres años de edad y durante el transcurso de su educación escolar. Dentro de las alternativas terapéuticas está la amplificación del sonido por medio de audífonos auriculares. Los audífonos para sordera pueden brindar beneficios para todo tipo pérdida de audición (conductiva, neurosensorial o combinada) (Kim et al., 2008).

En el caso de pérdida de audición conductiva dado por malformaciones en los huesecillos del odio medio, la corrección del tejido o su reemplazo por prótesis es la mejor opción (Kim et al., 2008).

1.10.3. Manejo de las alteraciones esqueléticas y estructurales

En el caso de las hipoplasias de los pulgares, el manejo quirúrgico dependerá del compromiso estructural que lo afecte (Papadogeorgou & Soucacos, 2008). Las hipoplasias menos severas (tipo I y II) pueden requerir la corrección de los músculos tenares o liberación del espacio entre el pulgar y el índice o la

reconstrucción del ligamento colateral cubital o combinaciones de estos procedimientos (Papadogeorgou & Soucacos, 2008; Soldado et al., 2013). En cuanto las hipoplasias más severas (tipo III, IV y V) dependiendo del grado de compromiso estructural requerirán su reconstrucción si el pulgar parece funcional o la ablación de este pulgar no funcional y la pulgarización del dedo índice (ver figura 49) (Kozin, 2012; Papadogeorgou & Soucacos, 2008; Soldado et al., 2013).



Figura 49. Pulgarización del dedo índice. Este procedimiento exige una técnica quirúrgica meticulosa para dar la apariencia y función de un pulgar al dedo índice. Imagen tomada de la publicación "Lineamientos para diagnóstico y manejo de la anemia de Fanconi, tercera edición (Kozin, 2008).

En cuanto a la duplicación del pulgar, el tratamiento quirúrgico es complejo en la medida que la duplicación implica más de uno de los elementos óseos. El compromiso de otros tejidos o estructuras como tendones, ligamentos, articulaciones y estructuras neurovasculares repercutirán en la obtención de un buen resultado de movilidad (Tonkin, 2012).

En cuanto al manejo quirúrgico de las anomalías de radio, ello dependerá del grado de severidad y compromiso funcional que genere. Básicamente, el tratamiento busca corrección la desviación radial de la muñeca, el equilibrio de la muñeca con el antebrazo, el mantenimiento del movimiento de muñeca y de los dedos, y el favorecimiento del crecimiento del antebrazo (Launay et al.,

2008). En la figura 50 se ilustra una corrección de la desviación radial del cúbito y la muñeca en ausencia de radio.



Figura 50. Centralización y colocación del corpus sobre el cúbito distal. Radiografía y apariencia clínica después de la centralización del cúbito distal. Imagen tomada de la publicación “Lineamientos para diagnóstico y manejo de la anemia de Fanconi, tercera edición (Kozin, 2008).

1.10.4. Manejo de los problemas gastrointestinales, hepáticos y soporte nutricional

Dentro de las anomalías gastrointestinales esta la atresia esofágica y la atresia duodenal, con diversos grados de severidad, las cuales además de requerir un manejo quirúrgico específico también requieren un soporte nutricional, un seguimiento y manejo clínico de posibles complicaciones (reflujo gastroesofágico, anomalías de la motilidad esofágica y traqueomalacia). En todos los casos, la valoración interdisciplinaria de cirujanos pediátricos experto en el tejido específico así como de gastroenterólogos y nutricionistas pediátricos es fundamental para su adecuado manejo y seguimiento. En el caso de Los trastornos pépticos deben tratarse con inhibidores de bomba de protones (omeprazol o lansoprazol), en lugar de antagonistas de H₂, debido al riesgo de mielosupresión que pueden inducir estos (Schwarzenberg & Yagizi, 2008).

Las hepatopatías en la AF suelen ser una complicación del tratamiento, ya que el uso de la androgenoterapia puede generar o complicar las anomalías hepáticas en estos pacientes. Por lo cual se recomienda en estos pacientes medidas generales de protección. Estas medidas incluyen la detección (pruebas bioquímicas e imagenológicas hepáticas), inmunización (vacunas

contra le hepatitis A y B) y evitar los agentes hepatóxicos (Schwarzenberg & Yagizi, 2008).

Adicionalmente la valoración y seguimiento nutricional también es clave en la evolución clínica de estos pacientes, ya que sus alteraciones endocrinas, anatómicas y metabólicas predisponen al paciente a sufrir diversas alteraciones en su estado nutricional, desde malnutrición y bajo peso hasta sobrepeso y obesidad. En la valoración nutricional de estos niños el índice de masa corporal y la tasa de crecimiento resultan ser herramientas clínicas muy útiles (Schwarzenberg & Yagizi, 2008).

Finalmente, antes de realizar un TPH debe realizarse a los pacientes una evaluación gastrointestinal, hepática y nutricional completa con el fin de garantizar las condiciones óptimas del trasplante y su posterior éxito.

1.10.5. Manejo endocrinológico

Adicionalmente a las diversas anomalías endocrinas que puede presentar un paciente con AF, el TPH puede afectar el sistema endocrino de pacientes con AF (Shalitin et al., 2006). Por este motivo, se debe llevar a cabo una evaluación endocrinológica y metabólica inicial de referencia y un seguimiento médico anualmente en cada paciente con AF.

Cada uno de estos problemas se debe estudiar cuidadosamente para recibir un adecuado manejo, así como tener un adecuado seguimiento. Por ejemplo, si se han encontrado una deficiencia hormonal múltiple, se debe realizar una resonancia magnética computalizada del cerebro, con énfasis en la zona pituitaria e hipotalámica (ante la sospecha de causas hipotalámicas o centrales) (Rose et al., 2008).

En estas patologías no sólo los endocrinólogos con experiencia en AF juega un papel importante sino otros especialistas clínicos deben formar parte del manejo de estas alteraciones. El diagnóstico precoz y el manejo temprano repercurira en la severidad de las secuelas que tenga que soportar el paciente durante su vida. Un ejemplo claro lo representa el hipotiroidismo, la temprana intervención médica no sólo previene la discapacidad intelectual grave e irreversible, sino también su retraso en el crecimiento. Por fortuna, cada vez

más países van adoptando el cribado de hipotiroidismo congénito en todo recién nacido (Rastogi & LaFranchi, 2010).

1.10.6. Manejo ginecológico y de fertilidad

Existen diferencias de género, siendo los hombres los presentan un mayor porcentaje de anomalías del tracto genital e infertilidad (Shimamura & Alter, 2010; Rose et al., 2012). En estos casos, los resultados de los análisis de semen normalmente revelan oligospermias o azoospermias, así como anomalías en las pruebas de la espermatogénesis (Rose et al., 201; Liu et al., 1991;). En cuanto a las mujeres con AF es importante tener en cuenta disfunciones endocrinas, tales como disfunción tiroidea e hipotalámica, lo que puede afectar el ciclo menstrual. Por lo cual se recomienda el seguimiento ginecológico de estas pacientes, no sólo para identificar signos y síntomas de retraso puberal, sino para realizar prevención de cáncer ginecológico a partir de los 13 años. En cuanto a la vacunación contra el virus del papiloma humano (VPH), debido al riesgo que representa la infección por este virus a desarrollar CCE tanto de cabeza y cuello como de tracto genital, se recomienda la aplicación de esta vacuna. A pesar de que la vacuna no trata la enfermedad VPH existente ni todos los subtipos de VPH, puede prevenir el contraer ciertos subtipos de VPH (Stern et al., 2012). Un reciente estudio indica que los genes de AF suprimen la infección y enfermedad por el VPH, lo cual sugiere un mecanismo asociado a la patofisiología de este virus (Hoskins et al., 2012). De todas formas, debido a que estudios hechos en CCE en pacientes con AF no hallaron el VPH, los autores sugieren que la vacuna contra este virus puede no reducir la incidencia de estos carcinomas en los pacientes con AF (Alter et al., 2013).

En las pacientes con AF el uso de anticonceptivos no está contraindicado, en este caso el uso de la androgenoterapia puede ayudar a regular su ciclo menstrual y tener un efecto anticonceptivo. Sin embargo en caso de embarazo los andrógenos deben suspenderse. Otro problema que pueden presentar las pacientes con AF es la menopausia prematura. En dicho caso el médico deberá considerar los riesgos a la salud de la post-menopausia, como son osteoporosis, el cáncer de mama y los problemas cardiovasculares. En este

sentido la hormonoterapia con estrógenos y progestágenos podría brindar protección contra la pérdida ósea, pero con un ligero aumento de riesgo de cáncer de mama e infarto cardiaco como sucede en las mujeres de la población general (Rossouw et al., 2002).

1.10.7. Consejo genético

Todos los pacientes afectados con AF y sus familias deberían de recibir asesoría genética de un experto familiarizado con la AF a partir de su confirmación diagnóstica y en las distintas etapas en el transcurso de la vida.

La consulta de consejo genético debería incluir los antecedentes de salud y familiares, así como sus antecedentes étnicos o de consanguinidad. Una buena anamnesis debe buscar aclarar los patrones de herencia de la AF e identificar características relevantes que permitan orientar la base genética de la enfermedad. En este sentido, si se está frente a una pareja de una determinada etnia, se hace necesario indagar sobre la patología en este grupo de población con el fin de enfocar el estudio hacia un análisis mutacional específico (si hay un efecto fundador en relación con AF) (Zierhut, 2008).

En paralelo el asesoramiento genético debe buscar explicar el proceso del examen genético y aclarar todas las dudas sobre este y su enfermedad a cada paciente y/o sus familiares. Además, la asesoría genética debe incluir información sobre las opciones reproductivas en el futuro y sus implicaciones familiares, así mismo, como las oportunidades de investigación y asociaciones de apoyo que existan en la actualidad (Zierhut, 2008). En el tema de la investigación, debe quedar claro que los datos personales que se recojan sobre cada paciente serán confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley de protección de datos de carácter personal, legislación sanitaria y la relativa a la investigación biomédica vigente. Así mismo, debe quedar claro en el paciente que la negativa a participar en un programa de investigación no repercutirá en su asistencia médica, presente o futura.

A continuación hablaremos de tres temas relevantes en el consejo genético, estas son la valoración de riesgo de desarrollar cáncer, el uso de nuevas tecnologías en el diagnóstico molecular y el diagnóstico prenatal y preimplantacional.

1.10.7.1. Valoración de riesgo de desarrollar cáncer

Como se dijo anteriormente, se debe realizar una buena historia clínica sobre antecedentes familiares de cáncer y enfatizando especialmente en el cáncer de mama, ovario y próstata. La esquematización en el pedigrí facilita el análisis familiar y las estimaciones de riesgo de cáncer familiar y/o hereditario, apoyándose en métodos de cálculos de riesgo como el teorema de bayes (Offit & Brown, 1994). Cuando ya se tiene subtipado el paciente hay que enfocar una especial vigilancia en los subtipos FA-D1, FA-J y FA-N, ya que alteraciones genéticas en sus genes dan susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama y otros cancers. Mutaciones en *FANCI* y *FANCD1* refieren un bajo riesgo de presentar cáncer de mama mientras que mutaciones en *FANCD1/BRCA2* refieren más riesgo de presentar cáncer de mama (Rahman et al., 2007; Seal et al., 2006). Por lo tanto, en cualquiera de estos tres subtipos hay que realizar un consejo genético tanto del paciente como de sus familiares con el fin de identificar portadores y en especial de mutaciones en *BRCA2*. El riesgo estimado para portadores de mutaciones en *BRCA2* para desarrollar cáncer de mama está en 56% a los 70 años, para cáncer de ovario en 16% y para cáncer de próstata en 16% (Struewing et al., 1997). Las mutaciones en *FANCD1/PALB2* se asocian con un aumento de cerca del doble del riesgo de cáncer de mama, así mismo, las mutaciones en *FANCI* confieren un riesgo de 2.0 (Rahman et al., 2007; Seal et al., 2006). Para portadores de mutaciones en estos genes deben se recomienda ingresar en un programa de vigilancia clínica e imagenológica de acuerdo al sexo y a la edad de incremento de riesgo para cada tejido u órgano a vigilar. Para mujeres la mamografía y examen pélvico debería iniciarse a los 25 años, la ecografía transvaginal y la medición del CA 125 en sangre a los 35. Para los hombres el antígeno prostático y el examen rectal dirigido debería iniciarse a los 40 años (Zierhut, 2008).

1.10.7.2. Diagnóstico molecular

Los resultados de los análisis genéticos enfocados al diagnóstico de la enfermedad resultan de gran utilidad en la toma de decisiones posterior. Sin

embargo, todo procedimiento al que se desea someter el paciente debe ser previamente explicado de manera clara, accesible y transparente. Se debe explicar el objetivo, metodología, beneficios y riesgos, exponiendo las distintas opciones diagnósticas, terapéuticas o preventivas que se puedan considerar, así como sus ventajas e inconvenientes. Todo ello de forma imparcial y respetando la autonomía del paciente. Otro punto que se debe resaltar, es el no utilizar un mismo consentimiento informado para estudios de secuenciación dirigidos como los estudios de secuenciación masiva, ya que en el último caso no sólo hay que informar al paciente las recomendaciones anteriormente comentadas, sino que adicionalmente, se debe informar sobre la cantidad de datos que se puede obtener de este estudio, dejando en el paciente la decisión de querer saber toda la información relevante obtenida (hallazgos incidentales) o sólo centrarse en lo que se relaciona con su patología o sencillamente poder renunciar al proceso de estudio en cualquier etapa del mismo. Además, también se debe acordar con el paciente el almacenamiento de información para uso futuro (Ayuso et al., 2013). En todos los casos la información de se debe manejar de manera confidencial entre el paciente y el clínico.

1.10.7.3. Diagnóstico prenatal y preimplantacional

Ante el antecedente en una familia de tener un hijo afecto con AF y el deseo de esta pareja de tener un segundo hijo, el médico encargado del asesoramiento genético debe recopilar una historia clínica familiar muy detallado con el fin de determinar el patrón de herencia y la base genética de la enfermedad, importante para poder orientar el subtipo AF que pueda estar afectando al paciente (el subtipo FA-B es el único que está ligado al X, otros subtipos tiene predisposición a cáncer familiar, hay unos subtipos específicos de algunos grupos étnicos, etc.).

Frente a una pareja con hijos afectados de AF y con un embarazo en curso, las herramientas utilizadas en un diagnóstico prenatal dependerán de los siguientes factores: si sólo se tiene en el paciente la confirmación de AF a nivel citogenético, si ya se conoce el grupo de complementación afectado y las mutaciones implicadas en la enfermedad. En el primer caso, no es necesario saber el subtipo AF, ni las mutaciones implicadas en la patología para realizar

el cribado de AF en la etapa prenatal. Gracias al claro fenotipo celular de las células AF se puede realizar un ensayo de fragilidad cromosómica en células de las vellosidades coriónicas (10 a 12 semanas de embarazo) o en células de líquido amniótico (≥ 15 semanas de embarazo) (Auerbach et al., 1986, 1985). En el segundo caso se podrían realizar de tres formas diferentes a partir del análisis mutacional de DNA extraído de líquido amniótico, de vellosidades coriónicas y en un futuro próximo de sangre materna. Esta última posibilidad parece ser tan confiable como las anteriores gracias a las nuevas tecnologías de análisis mutacional a partir de DNA aislado de la sangre materna aunque actualmente sólo podría aplicarse sin mayores complicaciones para el estudio de mutaciones del gen *FANCB* (a partir de la 7 semana de embarazo), ya que para las enfermedades autosómicas recesivas aún hay inconvenientes técnicos por resolver (Fan et al., 2012; Lo and Chiu, 2012). En cuanto a la decisión de la interrupción del embarazo dependerá de la legislación del país en el que vivan y de la decisión que tome la pareja al respecto. De todos modos, si han tenido un adecuado consejo genético, los padres de individuos con AF deben estar conscientes de la posibilidad de que en futuros embarazos existe el riesgo de tener hijos afectados con AF.

Con respecto a las parejas con un hijo afecto que deseen quedar embarazadas, dependerá del motivo por el cual han tomado esa decisión. Si lo que desean es sólo tener un hijo libre de enfermedad podrán realizar un DGP solamente, pero si lo que desean es darle una opción a su hijo afecto de tener un donante compatible para su TPH se hará necesario un DGP con tipificación HLA. El DGP es un examen génico que se usa en combinación con la fertilización in vitro para brindar a los padres la oportunidad de elegir embriones libres de una enfermedad genética o anomalías cromosómicas. El primer paso es realizar una estimulación ovárica, con una posterior fecundación *in vitro* (FIV). Los embriones resultantes son biopsiados (de un cuerpo polar o de una o dos blastómeros, tal como se ilustra en la figura 51). En el caso del estudio de enfermedades monogénicas como la AF, son analizados mutacionalmente *in vitro*, seleccionándose sólo aquellos libres de estas alteraciones genéticas. Los embriones seleccionados se transfieren al útero de la madre con la esperanza de que la pareja tenga un embarazo y luego que el embarazo llegue a término con un hijo sano. (Basille et al., 2009; Ogilvie et al., 2005).

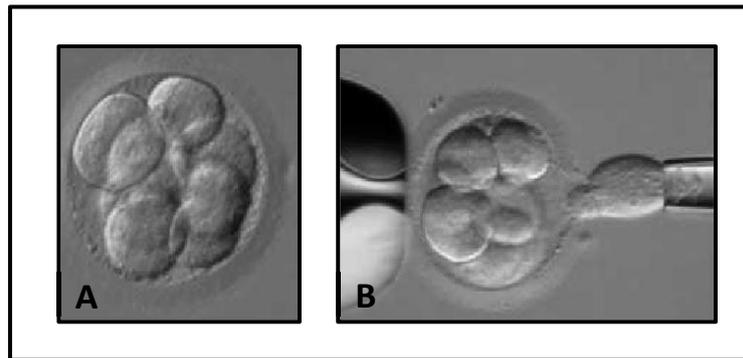


Figura 51. Biopsia de un blastómero de un embrión humano en estadio de división celular. (A) Embrión humano de 6 a 8 células. **(B)** Biopsia de un embrión, 72 horas después de la fertilización, mediante succión de un blastómero tras la apertura de la zona pelúcida. Imagen tomada de la publicación “*Preimplantation Genetic Diagnosis-An Overview*” (Ogilvie et al., 2005).

El primer DGP con tipificación HLA fue hecho en una pareja que tenía un hijo afecto de AF (subtipo FA-C), el cual permitió a la familia tener un hijo sano y HLA idéntico con su hermano y el posterior TPH y la curación hematológica del paciente AF (Verlinsky et al., 2001), y a su vez demostrando la utilidad de preseleccionar embriones no afectados y HLA compatibles para el TPH de un hermano con una patología de este tipo.

Actualmente, el proceso de DGP combinando con la tipificación HLA aumenta las posibilidades de seleccionar un potencial donante de progenitores hematopoyéticos para un paciente que requiere un TPH (enfermedades hematológicas e inmunológicas) y no tiene hasta ese momento un donante adecuado (Ingerslev & Hindkjær, 2012; Kuliev & Verlinsky, 2004). Sin embargo, el camino para llegar a un resultado positivo es largo, costoso y no siempre es técnicamente factible. Además, existe la posibilidad de que ocurra un error que conlleve un diagnóstico equivocado en las pruebas genéticas de cribado o una alteración genética en el proceso embriológico. Aunque la mayoría de parejas son fértiles, son parejas añosas, por lo cual, el resultado exitoso de los ciclos de reproducción asistida es altamente dependiente de edad de la mujer y su reserva ovárica (Ingerslev & Hindkjær, 2012; KaRHaman et al., 2011).

A nivel técnico, es de crucial importancia saber que la probabilidad teórica de la búsqueda de un embrión HLA idéntico en los casos de enfermedades adquiridas es del 25% (1/4) y la probabilidad de encontrar tanto un embrión HLA idéntico y libre de mutaciones patogénicas, en los casos de enfermedades

monogénicas recesivas es del 18.75% (3/16). Sin embargo, la tasa de embarazo clínico por ciclo iniciado es mucho menor que lo observado normalmente en la fertilización *in vitro*, debido a una alta tasa de cancelación del ciclo (por aneuploidías, disomías uniparentales, recombinaciones y poliploidías), pero la tasa de éxito es sólo algo inferior cuando se mide por transferencia (Ingerslev & Hindkjær, 2012; KaRHamam et al., 2011). En este aspecto, se ha visto como limitante asociada a la técnica, además de la edad materna avanzada, la alta prevalencia de aneuploidías y anomalías cromosómicas las cuales están directamente relacionadas y pueden estar afectando el resultado de la técnica (KaRHamam et al., 2004, 2011; Rechitsky et al., 2006). Aunque la mayoría de las aneuploidías observadas puede seleccionarse durante el cultivo *in vitro* prolongado, no todos los cromosomas son analizados, y por ende, no todas las aneuploidías cromosómicas son eliminados, lo cual plantea la posibilidad de aneuploidías presentes en la población de embriones seleccionada para su transferencia. Es por ello, que los nuevos enfoques incluyen también un análisis simultáneo de las anomalías cromosómicas en los casos de edad materna avanzada (Wells et al., 2002; KaRHamam et al., 2004; Rechitsky et al., 2004). La figura 52 muestra el resultado que se obtuvo en un estudio en el cual cuantificaron el número de aneuploidías halladas en los diferentes cromosomas (Alfarawati et al., 2011).

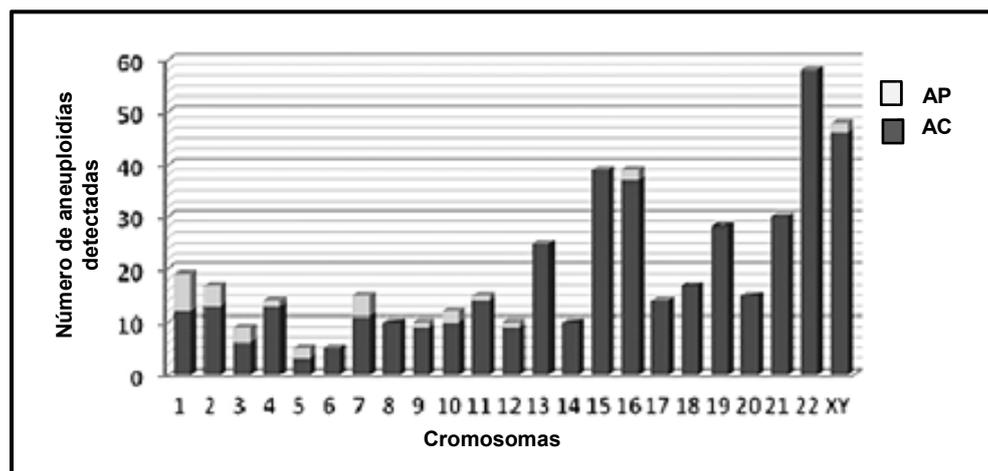


Figura 52. Número de anomalías cromosómicas. Evidencia de aneuploidías en todos los cromosomas, con un incremento marcado en unos más que en otros. Resultados del análisis de la biopsia de embriones por hibridación genómica comparativa de mujeres con una media de 38.5 años de edad. AP: aneuploidías parciales dada por anomalías estructurales (barras claras). AC: aneuploidías completas identificadas en cada cromosoma (barras oscuras) (Alfarawati et al., 2011).

Los escasos estudios publicados hasta la fecha sobre DGP con tipificación HLA y cribado para aneuploidías sugieren que las pruebas de análisis de aneuploidías mejoran el resultado de las tasas de embarazo a través de la mejora de la implantación y reducción de la tasa de abortos espontáneos, a pesar de un menor número de embriones transferidos. Los resultados mostrados en la literatura indican que aproximadamente la mitad de los embriones transferidos libres de aneuploidías después del cribado por DGP y compatibilidad HLA resultó en embarazo y en nacimientos niños vivos, en comparación con la tasa de embarazo de un 28.5% después de la transferencia embriones HLA compatibles no evaluados para aneuploidías. Cabe resaltar que los cribados de anomalías cromosómicas esperaban identificar al menos un 50% de anomalías cromosómicas (KaRHaman et al., 2011; Rechitsky et al., 2006). En un estudio hecho para correlacionar morfología de blastocitos y aneuploidías, por ensayos de hibridación genómica comparativa, observaron que más de la mitad (56.7%) de todos los blastocitos analizados presentaba anomalías cromosómicas. Adicionalmente, una fuerte asociación entre la edad materna y las aneuploidías fue observada, pasando de 51% en los embriones de pacientes entre 31 a 37 años (con una media de 34.6 años de edad) a 60.7% en los embriones de mujeres entre los 38 a 47 años (con una media de 41 años de edad), interesantemente, aunque la mayor parte de los cromosomas muestran un aumento en la probabilidad de aneuploidías con la edad avanzada, el efecto de ciertos cromosomas fue mucho más dramático como el caso del cromosoma 21 (que mostró un aumento de 10 veces en la tasa de aneuploidías en el grupo de los pacientes de mayor edad) (Alfarawati et al., 2011). Otros factores importantes asociados con aneuploidías parece ser la blastulación y el tipo de estimulación ovárica. En cuanto a la blastulación, en un estudio realizado recientemente, la ausencia de blastulación se asoció con un aumento de aneuploidías. Por lo tanto, los autores sugieren de que a la hora de elegir una mórula para la transferencia en el día 5, puede haber algún beneficio en esperar un día más a la posibilidad de que se produzca la blastulación (una blastulación tardía no se ha asociado a aneuploidías) (Kroener et al., 2012). En cuanto al tipo de estimulación ovárica, las estimulaciones suaves con antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina y menores dosis de gonadotrofinas (mejor aproximación al ciclo natural) mostraron una menor tasa

de aneuploidías y mosaicismo comparada con protocolos que usaban dosis hormonales más altas (Baart et al., 2007; Verberg et al., 2009). Actualmente la tendencia es la de usar protocolos de estimulación ovárica más suaves. Por otra parte, parece ser que ni los ciclos sucesivos de estimulación ovárica, ni el intervalo entre los mismos afectan la cantidad ni calidad de los ovocitos de las mujeres (Van Blerkom & Davis, 2001).

Finalmente, los aspectos éticos de este procedimiento han sido objeto de intensos debates. Está claro que este procedimiento está indicado cuando no hay un donante adecuado para un paciente de una enfermedad letal que requiere un TPH o cuando el trasplante de un hermano HLA idéntico se considera la mejor opción, pero el tener que descartar un alto número de embriones durante el procedimiento y la selección genética de un nuevo ser humano siguen siendo tema de debate (Basille et al., 2009; Ingerslev & Hindkjær, 2012; Zierhut et al., 2013). Actualmente, este procedimiento sólo se ofrece en un número limitado de centros europeos, entre los que están España. En realidad, este es un procedimiento difícil, en el cual, muchas parejas requieren de varias rondas de FIV y DGP para conseguir un embarazo clínico que resulte en un recién nacido vivo sano e histocompatible. En donde, la experiencia de cada centro de IVF y de DGP también repercutirán en la efectividad de este procedimiento.

1.10.8. Soporte psicosocial

El diagnóstico de AF marca un cambio en el ambiente familiar, generando primero un proceso de aceptación y asimilación del diagnóstico en los padres y luego una marea de angustia para buscar los mejores cuidados médicos de su hijo, intentando conservar la esperanza y una vida familiar normal.

Debido al curso natural de la enfermedad, el niño afectado de AF podrán permanecer estable o asintomático por periodos de tiempo prolongado, periodo en el cual se conserva la esperanza de que el niño no se vea afectado con severidad. Sin embargo, cuando la AF inicia su manifestación hematológica, y se genera una secuencia catastrófica de eventos, los padres están a la espera de la siguiente cosa mala que va a suceder (Cincotta, 2008). Algunas de las decisiones difíciles que los padres deben tomar para y con sus hijos son

irreversibles, por lo cual existe siempre la preocupación que nunca aprenderán lo suficiente de la enfermedad para poder tomar la mejor decisión. Por lo tanto, cada decisión importante requiere que las familias y los pacientes de más edad estén lo suficientemente informados hasta el momento antes de tomar una decisión en cualquier procedimiento.

Una de las situaciones más difíciles para las familias es cuando el paciente se encuentra a las puertas de la muerte. En esos momentos críticos tanto el paciente como la familia necesitan un claro respaldo emocional, asistencia psicológica y una enorme comprensión. Tras la muerte del paciente, las relaciones con las familias no pueden terminarse abruptamente durante el periodo de duelo, ya que atraviesan una fase sumamente difícil. Resulta muy útil la ayuda psicosocial que se pueda brindar a las familias con el fin que no se sientan que se han quedado solas y puedan rehacer nuevamente su ambiente familiar (Cincotta, 2008).

Por todo ello, tanto los padres como el paciente con AF deben enfrentar a una desafiante enfermedad que les ofrece un futuro lleno de incertidumbres y situaciones médicas potencialmente complejas. En este sentido es importante resaltar la labor de un adecuado asesoramiento genético, así como el respaldo y las buenas relaciones de todo el personal médico con la familia, y el apoyo psicosocial que está tenga. En este último aspecto no solo es beneficioso el asesoramiento psicológico de los padres y el paciente en sus diferentes etapas de la vida, sino el apoyo hacia el paciente de sus padres, hermanos y amigos.

Un buen ejemplo de estas relaciones constructivas queda reflejado en el cuento de divulgación hecho por una madre de un niño con AF, cuyo libro se titula "Arnau tiene una enfermedad escondida" (ver figura 53).

Por otra parte, la existencia de una asociación en AF le brinda a la familia con un hijo con AF la oportunidad de no solo compartir sus experiencias, sino de escuchar la de otras familias y aprender de ellas. Otro aspecto importante es el respaldo mutuo que pueden brindarse estas familias en toda esta odisea (Cincotta, 2008).

Por otra parte, la asociación o las mismas familias orientan a otras para contactar los diferentes expertos clínico-quirúrgicos de acuerdo a las diferentes anomalías clínicas que presenten sus hijos afectados, así mismo, para organizarse y reclamar sus derechos frente al Estado.

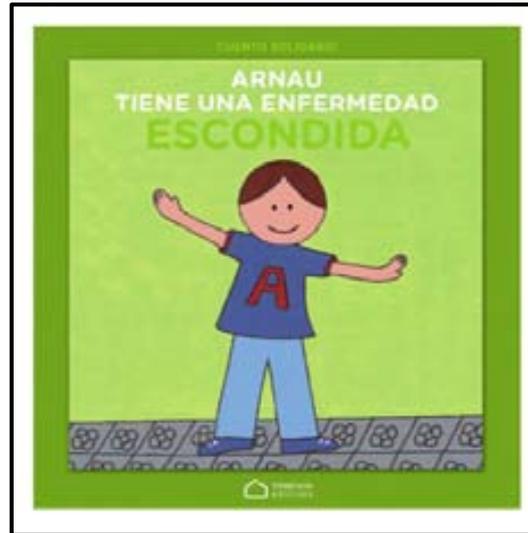


Figura 53. Cuento solidario: Arnau tiene una enfermedad escondida. Es un cuento escrito por una madre (Xènia Cid) en castellano y catalán que relata las ganas de vivir de un niño afectado por una enfermedad rara. “Arнау es un niño con una enfermedad. Pero no se esconde, es valiente y pregunta”. Sus padres le contestan mediante este cuento infantil a su hijo afecto las dificultades que deberán afrontar por su enfermedad y las ganas de vivir que tienen (<http://enfermedadescondida.com>).

En el campo de los grupos de investigación, tanto clínico como básico, es importante ayudar a las familias a desarrollar y mantener un conocimiento actualizado, mediante la incentivación a participar en actividades conjuntas. Ello a su vez, brinda a las familias un papel activo y permite obtener el respaldo para apoyar la investigación. Este apoyo se obtiene gracias a la divulgación de los avances que se van consiguiendo en la búsqueda de mejores opciones para ayudar a sus hijos y las buenas relaciones entre el grupo de clínicos y básicos con las familias afectadas (Cincotta, 2008). Un ejemplo a nivel internacional lo representa la *Fanconi Anemia Research Fundation*, la cual no sólo brinda asesoría, información y respaldo a las familias, y financiación y colaboración con los diferentes grupos de investigación en AF, sino que además promueve la integración de las familias con los investigadores. Pero el mejor ejemplo lo representa la red española en AF, la cual no solo mantiene activas las actividades y colaboración entre los diferentes grupos de investigación en AF, sino que organiza e incentiva la participación de la asociación española de enfermos y familias con AF la cual ha creado una relación bastante funcional y de mutuo enriquecimiento.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización genética y clínica de los pacientes AF principalmente de la población AF española, de algunas poblaciones americanas y de otros países europeos.

Para la recolección de muestras biológicas y datos clínicos se hace necesario la colaboración de los profesionales clínicos, otros investigadores básicos y de las familias con un hijo afecto por esta enfermedad. Dentro de la finalidad de este trabajo también está la proposición de pautas de diagnósticas de la población AF, pautas de análisis y seguimiento a nivel clínico, citogenético y medular, así como de datos que permitan mejorar el consejo genético para las familias con un hijo afecto.

Los objetivos específicos planteados son:

1. Caracterización genética de la población de pacientes AF.
 - 1.1. Determinación del subtipo y espectro mutacional de la población de pacientes AF española.
 - 1.2. Determinación del subtipo y espectro mutacional de pacientes AF de algunos países americanos y europeos.
 - 1.3. Identificación de los portadores sanos en la población en riesgo.
 - 1.4. Correlación del genotipo-fenotipo en los pacientes FA-J.
2. Análisis del fenotipo clínico-celular de los pacientes Fanconi-*like*.
3. Estudio del gen *FAN1* como un gen candidato AF.
4. Análisis clínico-molecular de la evolución hematológica a largo plazo en los pacientes AF mosaicos por reversión mutacional.
5. Determinación de la tasa de efectividad del proceso de DGP y tipificación HLA en las familias con un hijo afecto de AF.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN Y MUESTRAS

3.1.1. Obtención de datos clínicos y muestras biológicas

Para la recolección de datos clínicos y muestras biológicas de los pacientes AF, así como para los individuos no AF, se ha contado con la colaboración de los diferentes profesionales clínicos tanto españoles como de otros países y se ha realizado con previo consentimiento informado de los pacientes y los individuos control. Para el análisis clínico hematológico de los pacientes AF mosaicos se obtuvieron los datos clínicos de 35 pacientes AF mosaicos y 2 pacientes AF clásicos (no mosaicos), previa autorización de los respectivos centros médicos.

Se ha obtenido de cada paciente, una muestra de sangre en heparina para la realización del ensayo de fragilidad cromosómica y la obtención de una línea celular linfoblastoide (LCL) mediante la transformación por el virus Epstein-Barr (EBV). En el caso de sospecha de mosaicismo, se ha obtenido muestra de biopsia de piel, de la cuál, se ha derivado un cultivo de fibroblastos primarios.

Las muestras del DNA de los pacientes han sido extraídas de sangre periférica en EDTA y de mucosa oral (en el caso de pacientes ya trasplantados).

Por otra parte las muestras del DNA utilizadas como control en este estudio, pertenecen a individuos sanos españoles, facilitadas por el grupo de investigación en el que se realizó el presente trabajo.

Con el fin de preservar la confidencialidad de los individuos durante el estudio, todas las muestras se van codificando a medida que se van recibiendo.

3.1.2. Obtención de líneas celulares

Para la obtención de una LCL inmortalizada mediante la transformación por el virus EBV, se parte de 5-10 ml de sangre periférica en heparina sódica. Se realiza un aislamiento de linfocitos mediante la separación con Ficoll y centrifugación durante 25 minutos a 2100 rpm. Se recupera la fase de linfocitos (anillo formado justo por encima del ficoll) y se lava 2 veces con PBS para eliminar restos de ficoll de la muestra. Si el botón celular contiene eritrocitos (botón celular de color rojo), se procede a la eliminación de estos mediante un tampón de lisis de eritrocitos (150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA,

pH=7,3 ajustado con HCl) durante 10 minutos en hielo. Seguidamente, se recuperan los linfocitos mediante centrifugación y se realiza un lavado adicional con PBS. Una vez recuperados los linfocitos puros, se resuspende el botón de linfocitos en un medio RPMI + 20% de suero + 2% fitohemaglutinina + 1% antibiótico (penicilina/streptomina). Sobre estas células, se añade 1 mL de medio que contiene el EBV (obtenido del medio de cultivo de las células productoras del virus B95-8, derivadas de linfocitos de mono tití) y se deja en el incubador de células. Pasados 15 días, todas las células que se encuentran en el cultivo estarán inmortalizadas.

Para la obtención de una Línea de fibroblastos primarios, se parte una pequeña muestra de biopsia. Esta muestra es trozada en tamaños pequeños, y puesta en un frasco de cultivo celular en el incubador, con la justa cantidad de medio DMEM + 15% de suero + 1% antibiótico (penicilina/streptomina). El volumen usado debe ser sólo el necesario para cubrir solo la superficial inferior del frasco, que permite a las células adherirse al frasco fácilmente. Pasado 10 a 15 días se podrán observar las primeras células y a los 45 días ya se tendrán las suficientes células para expandir la línea y trabajar.

3.1.3. Extracción del DNA

La extracción del DNA a partir de sangre periférica se ha realizado mediante un protocolo estándar que inicia con una lisis de los eritrocitos mediante una solución hipotónica, continua con unos centrifugados de lavado y recuperación del botón de linfocitos que posteriormente es lisado con un tampón específico y SDS e incubado a

37° durante 16h con ProteinasaK para la digestión de las proteínas, siendo en los últimos 30 minutos adicionado ARNasa para garantizar la pureza del DNA a extraer. El DNA es recuperado mediante la adición de NaCl y separado de la proteína y demás restos celulares mediante la adición de cloroformo. Finalmente, el DNA es precipitado con etanol y resuspendido en dH₂O.

La extracción del DNA de mucosa oral, hecha en pacientes ya trasplandados, se ha realizado utilizando el kit de extracción Oragene DNA. Este protocolo de purificación permite extraer la mayor cantidad de DNA presente en la saliva. Inmediatamente después de la recolección de 2 mL de saliva del paciente, se

mezcla con la solución Oragene DNA que esta almacenada en la tapa del frasco y que es liberada al sellar completamente el frasco con la tapa. Luego incuba toda la muestra a 50°C por mínimo 1 hora. Posteriormente se adiciona 20 µL del purificador Oragene DNA por cada 500 µL de saliva/Oragene DNA, incubándolo en hielo por 10 minutos. Después de centrifugar se recupera el sobrenadante, al cual se adiciona el mismo volumen de etanol al 100% para precipitar el DNA. Finalmente el DNA es resuspendido en dH₂O.

Las muestras del DNA son cuantificadas y evaluadas en cuanto a su pureza mediante espectrofotometría, utilizando un NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer). La estimación de la pureza de la muestra se valora por medio de la relación de longitud de onda 260/280 (DNA/proteínas) y 260/230 (DNA y solventes orgánicos). Para considerar una muestra de DNA pura, la relación 260/280 debe estar en 1,8. Valores menores indican contaminación con proteínas y mayores a 2,0 indican contaminación con fenol, EDTA u otros solventes. En cuanto a la relación 260/230 debe estar en 2,0; si esta relación es apreciablemente menor que la esperado, puede indicar la presencia de contaminantes que están interfiriendo con la absorbancia a 230 nm.

3.2. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

3.2.1. Ensayo de fragilidad cromosómica

El ensayo se basa en el análisis de rupturas cromatídicas después de la exposición de las células a agentes inductores de enlaces cruzados en el ADN. El agente preferiblemente usado es el Diepoxibutano (DEB), debido a que otros agentes utilizados han mostrado altas tasas de resultados con falsos positivos o falsos negativos. El ensayo se lleva a cabo en sangre periférica tratada con heparina y el protocolo es muy similar al planteado inicialmente por la Dra. Auerbach, tal como se muestra a continuación:

- Para cada paciente se establecen 3 cultivos con un volumen final de 5ml cada uno: 0,5ml de sangre + RPMI + 15% de suero bovino fetal + 1% de antibióticos penicilina/estreptomina + 1% de L-Glutamina + 1% de Fitohemaglutinina.

- A las 24h, se tratan dos de los cultivos con 0,1µg/ml de DEB. El cultivo restante será utilizado como control de daño espontáneo en el paciente.
- A las 48-72h del tratamiento se procede a la preparación de metafases, habiendo añadido 2h antes, colcemide a una concentración final de 0,1µg/ml.

Las preparaciones de metafases se realizan según el protocolo habitual:

- El botón de células es resuspendido en solución hipotónica (0,075M KCl) y se deja actuar durante 25min a 37°C.
- Se fijan las células mediante 3 lavados con metanol:ácido acético, en una proporción 4:1.
- El material obtenido es goteado sobre portaobjetos y posteriormente, se tiñe con Giemsa.

Para el recuento de aberraciones, se cuentan 25-50 metafases de cada cultivo: el cultivo no tratado y 2 réplicas del cultivo tratado con DEB. Se cuentan solo metafases completas (46 cromosomas). Se registra el número de roturas que observamos en cada metafase y el tipo de aberraciones, cromosómicas y cromatídicas. A partir de este recuento se calculan varios índices que serán posteriormente utilizados en los diferentes análisis.

Otro agente utilizado para este test es la MMC. Sin embargo, las dosis empleadas no están del todo estandarizadas como en el caso del DEB.

- En este caso se necesitan 4 cultivos celulares por paciente o individuo.
- En cada grupo de cultivos adicionar las dosis de MMC de 0, 50, 100, 150 y 300nM.
- A las 72h del tratamiento se añade colcemide por unos 40 minutos a una concentración final de 200 ng/mL.
- Finalmente se hacen las preparaciones de las metafases, haciendo la tinción con Giemsa y el análisis por microscopia, tal como ya se ha comentado.

3.2.2. Western blot

El análisis de las proteínas implicadas en la ruta AF/BRCA se lleva a cabo por inmunoblot ((Western blot).

Para la preparación de extractos de proteína se lisan las células en solución RIPA (Upstate, Cat. No. 20-188) con la adición de un cóctel de inhibidores de proteasas (CompleteMini-EDTA free, Roche, Cat. No. 1836170001) e inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP, Roche, Cat. No. 04906837001), después de un lavado de las células en PBS. Para la degradación de la cromatina, se añade a la muestra 25U/ml de Benzonsa (Novagen, Cat. No. 70746) y se incuba a temperatura ambiente (TA) durante 10min.

La concentración de proteína obtenida es determinada mediante el sistema Bio-Rad Protein Assay (Biorad, Cat.No. 500-0001), según las instrucciones del fabricante.

La cantidad deseada de proteína, es cargada en un gel desnaturizante SDS-PAGE a la concentración de acrilamida apropiada y se procede con un protocolo de WB estándar, con transferencia en sistema Transblot Semi-Dry de Bio-Rad, 1h a 20V, en filtro de nitrocelulosa. Posteriormente, se realiza la inmunodetección con el anticuerpo primario incubado en solución de bloqueo (5% de leche en polvo en TBS + Tween) durante 16h a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados son: anti-FANCA (Fanconi Anemia Research Fund, Eugene, Oregon, EUA) a una dilución [1:500], anti-FANCD2 (Abcam, ab2187) a [1:2500], anti-FANCJ (Abcam, ab16608) a [1:2500], anti-FAN1 (lab de) a [1:1000], anti-VINCULIN (Abcam, ab18058) a [1:5000], y los anticuerpos anti-FANCB generado en conejo por nuestro laboratorio a través de la compañía Genosphere Biothechnologies, a una dilución [1:500] cada uno. Se incuba posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP), durante 1h a TA y se detecta la señal después de incubar el filtro con la solución sustrato Pierce ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Cat. No, 32106).

3.2.3. Análisis del bloqueo del ciclo celular en G2/M

El análisis del bloqueo en la fase G2 del ciclo celular se analiza después de tratamiento del cultivo celular con MMC a 50nM durante 72h. Se siembra inicialmente, 10^6 células de LCL en 5ml de medio o 3×10^5 fibroblastos en 15ml. Se establece también un cultivo no tratado para la evaluación del ciclo celular en condiciones basales. Pasadas las 72h se realiza el recuento de las células para evaluar la viabilidad y verificar que las células han proliferado durante este tiempo. Seguidamente, las células se fijan mediante adición de etanol 70% frío durante 30min a 4°C.

El ciclo celular se evalúa mediante citometría de flujo, midiendo la cantidad total de ADN en cada célula. Para ello, se prepara la muestra eliminando el etanol y resuspendiendo 10^6 células en 1ml de una solución de PBS + Ioduro de Propidio (PI) [40µg/ml] + RNAsaA [0,1mg/ml] e incubando la muestra 30min a 37°C. Pasado este tiempo, las células se mantienen en hielo hasta ser pasadas por el citómetro del flujo.

Se utiliza para este análisis un citómetro modelo FACScalibur (Becton Dickinson). Una vez seleccionadas las células con un tamaño adecuado (células enteras) se mide la fluorescencia del PI, mediante excitación a 488nm y emisión en el canal FL2 (585nm). La cuantificación de la fluorescencia nos permite diferenciar las células con contenido 2n (fase G1), 4n (fase G2) o intermedio (fase S). La adquisición de las células en el citómetro se controla mediante el programa informático "CellQuestPro" y el porcentaje de células que se encuentra en cada una de las fases del ciclo celular se determina mediante el programa informático "FlowJo" versión 8.7.

3.2.4. Detección de mutaciones y estudios de segregación

3.2.4.1. MLPA para la detección de grandes deleciones en FANCA

El protocolo de cuantificación y detección de ADN por MLPA se realiza utilizando las recomendaciones dadas por la empresa MRC-Holland-MLPA (<http://www.MRC-Holland.com>), siguiendo los siguientes pasos:

Desnaturalización del DNA e Hibridación de las sondas

Se toma un volumen de 5 μL de cada una de las muestras de ADN (cuya concentración es de 20-30 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y se colocan en los tubos utilizados para el correspondiente termociclador. Se calientan durante 5 minutos a 98°C , y se enfrían a 25°C .

Luego se adiciona 1,5 μL de “SALSA Probe-mix” + 1,5 μL de “buffer” de MLPA a cada muestra, y se mezcla cuidadosamente por pipeteo repetido. Se calientan por 1 minuto a 95°C , y luego se dejan en incubación a 60°C por 16 horas.

Reacción de ligación

Se reduce la temperatura del termociclador a 54°C y manteniendo esta temperatura se añade 32 μL de “Mix Ligasa-65”^{*} a cada muestra y se mezcla cuidadosamente por pipeteo cada muestra. Posteriormente, se dejan las muestras en incubación a 54°C por 15 minutos, y seguidamente se calientan a 98°C por 5 minutos. Para inactivar la enzima de ligación, se pausa el termociclador a 20°C . En este punto las muestras pueden removerse del termociclador para preparar la reacción de PCR.

^{*}“Mix Ligasa-65”: Se mezcla 3 μL de “Ligasa-65 buffer A” + 3 μL “Ligase-65 buffer B” + 25 μL dH_2O y finalmente, se adiciona 1 μL “Ligase-65”. Se mezcla todo cuidadosamente, por pipeteo repetido.

Reacción de PCR

A temperatura ambiente, se adiciona 10 μL de la “Mix de polimerasa”^{*} a cada muestra de ligación.

^{*}“Mix de polimerasa”: se mezcla 2 μL “SALSA PCR primer mix” + 7,5 μL dH_2O + 0,5 μL SALSA Polimerasa, y se mezcla bien por pipeteo, sin utilizar nunca el vortex. A continuación se colocan las muestras en el termociclador y se continúa el programa de PCR. Las condiciones de la PCR que se utilizan son: 35 ciclos: 30 segundos a 95°C ; 30 segundos a 60°C ; 60 segundos a 72°C .

Se termina con 20 minutos de extensión a 72°C .

Los “Primers” de PCR utilizados son:

“primer Forward” (marcado): 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3'

“primer Reverse” (sin marcar): 5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'

En la figura 54 se esquematiza todo el proceso de la MLPA.

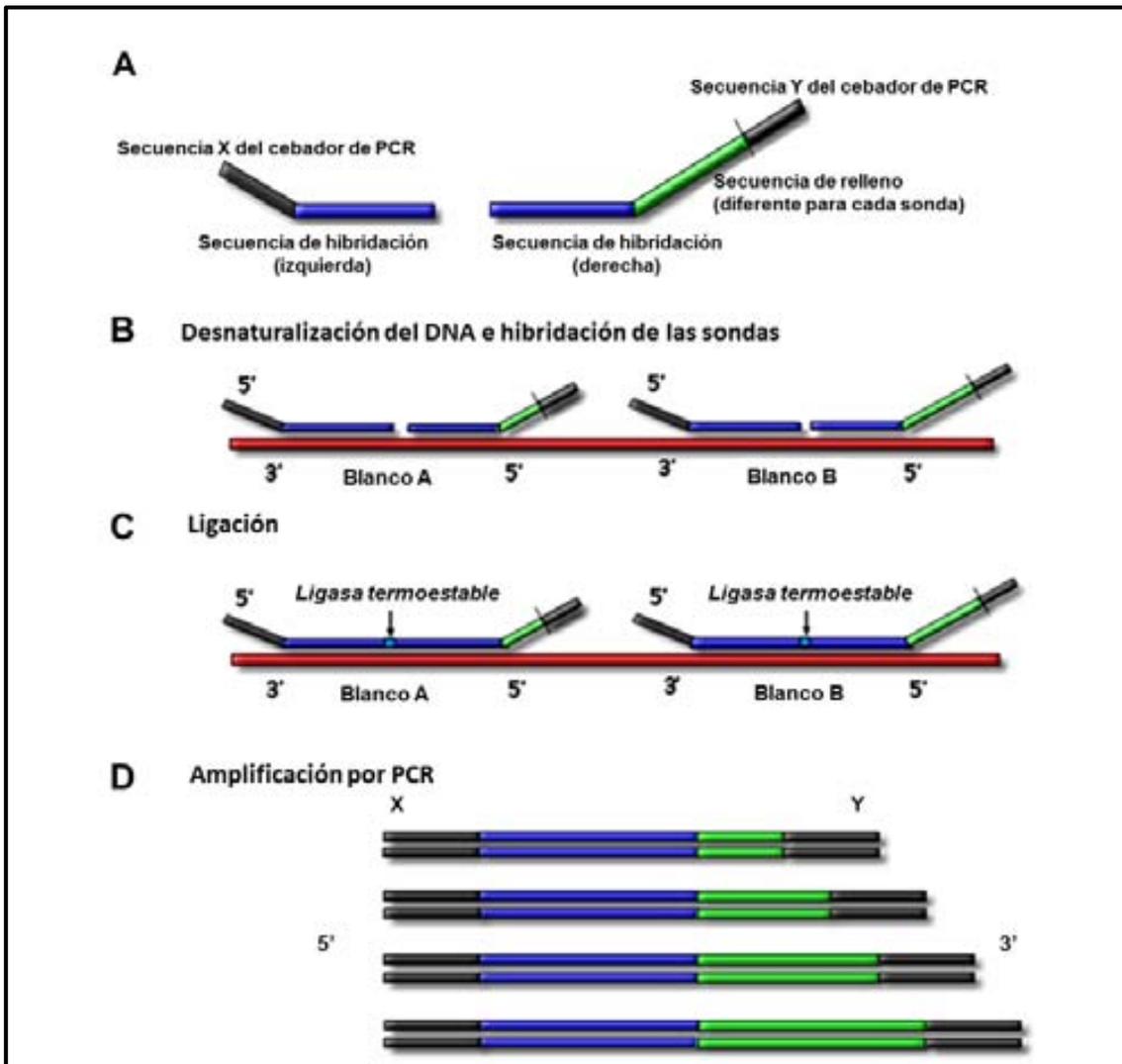


Figura 54. Proceso de la MLPA. (A) Componentes de las sondas de hibridación de la MPLA. Cada sonda se compone de dos secuencias de hibridación. (B) Para la hibridación de las sondas se requiere previa desnaturalización de las cadenas de DNA. (C) Para la ligación de las dos secuencias de la sonda se requiere la correcta hibridación de las misma a la cadena de DNA y el uso de una ligasa termoestable. (D) La amplificación se realiza con un mismo par de cebadores y solamente se amplificaron las sondas correctamente hibridadas y ligadas. Cabe destacar que la secuencia de relleno le confiere a cada sonda una longitud de amplificación específica.

Comprobación de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa

Posterior a la amplificación del producto de ligación de MLPA por PCR, se procede a realizar una comprobación del correcto amplificado de dicho MLPA utilizando un gel de agarosa al 2,5%, usando como colorante del ADN el "SYBR safe" y como marcador de peso molecular un "Ladder" de 100pb.

En el corrido electroforético se espera observar un corrido homogéneo y difuso de ADN (en pincelada), y ubicado entre las bandas de 100 a 400pb. En la figura 55 se muestra un ejemplo de un corrido electroforético de los productos

de MLPA. La muestra de carga para el corrido electroforético se prepara con 4 μL de cada muestra de ADN de la MLPA y 1 μL de tapón de carga 5X, para un volumen final de 5 μL .

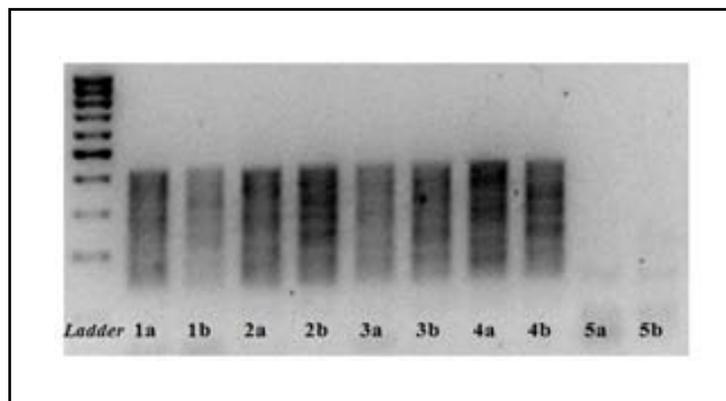


Figura 55. Comprobación por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% del producto amplificado de MLPA. La letra **a** representa las muestras que contienen la sonda P031, y la letra **b** representa las muestras que contienen las sonda P032. 5a y 5b corresponden a las muestras de dH_2O .

Electroforesis capilar del producto de MLPA amplificado

El análisis por electroforesis capilar se realizó en el servicio de genética molecular del departamento de Veterinaria de la UAB, el cual dispone de secuenciadores automáticos ABIPRISM 3730 de 48 capilares y ABIPRISM 3100 *Avant* de 4 capilares. Por lo tanto el software de análisis de fragmentos utilizado es el del sistema de *Applied Biosystems sequencers GeneScan*TM y el marcador de peso molecular usado es el 500ROXTM.

La solución *master* de inyección es: 0.7 μL de PCR de MLPA + 0.3 μL de ROX + 9 μL de formamida. Posteriormente se escogen el juego de filtros compatibles con el colorante fluorescente usado. Para capilares de 36 cm se coloca inicialmente un voltaje de inyección de 1.6 kV con un tiempo de inyección de 15 segundos. Para el polímero POP4 se continúa con un voltaje de corrido de 15 kV y un tiempo de corrido de 1800 segundos. Para el polímero POP6 se usa un voltaje de corrido de 10 kV con un mayor tiempo de corrido. Finalmente para sellar la placa de inyección se incuba por 2 minutos a 80°C y se enfría rápidamente.

Análisis de picos del corrido capilar por el *Peak Scanner Software*

Antes de calcular el ratio de los datos, es esencial evaluar primero la calidad del experimento de la MLPA. Por lo tanto, primero se inspeccionan los datos en

crudo, seguidos por la evaluación de los datos con el tamaño ya asignado, siguiendo las recomendaciones indicadas en el protocolo de MLPA 2012 colgado en la página de la casa comercial MRC-HOLLAND.

El análisis se puede realizar diferentes programas, entre los que están el “*Peak Scanner Software*” o el *Genotyper software* o el *coffalyser software*, en este trabajo los datos fueron analizados el *Peak Scanner Software*.

En la MLPA la normalización de los datos se hace en un proceso de dos pasos. El primero se basa en la determinación de la intensidad fluorescente relativa de cada pico dentro de cada muestra (intranormalización). En el segundo paso, el pico relativo es comparado con otras muestras (internormalización). En este último aspecto, el ratio final para una sonda determinada en una muestra del ensayo se compara con las muestras de referencia para misma sonda. Este ratio final obtenido se denomina cociente de dosis (*Dosage Quotient, DQ*). Para tener una fiabilidad aceptable de los análisis los resultados del cociente de dosis (*DQ*) deben cumplir los siguientes criterios:

- La desviación estándar de todas las muestras de referencia procesadas con las diferentes sondas deben ser de ≤ 0.1 .
- El *DQ* de las muestras de referencia procesadas deben estar entre 0.8 y 1.2.

Por otra parte, para el análisis de un número limitado de muestras puede utilizarse la evaluación visual del perfil de picos obtenidos con la electroforesis capilar. Para ello, se configura en la ventana correspondiente del programa que se esté utilizando para que aparezcan dos colores sobrepuestos y se renombra la muestra y el control. Finalmente se hace la comparación tomando como referencia la muestra control y se busca si hay alguna diferencia entre las dos muestras. Sin embargo, el análisis de nuestras muestras lo hemos venido realizando de acuerdo a una adaptación de este protocolo hecho en nuestro servicio del laboratorio en el momento en que se puso a punto esta técnica.

Debido a la variabilidad que se observó en cada muestra control para cada experimento de MLPA que se realizaba, que influía en la interpretación de los resultados, se hizo necesario introducir por cada experimento 3 muestras de DNA de individuos sanos. A partir del pico promedio de estas muestras control se ha logrado disminuir esta variabilidad y hacer más reproducibles los

resultados. Por lo cual, las muestras de los pacientes en estudio son analizadas en nuestro servicio utilizando el ratio de tres controles en un mismo experimento. Ello hace necesario exportar todos datos a archivos Excel. Luego de exportar los datos al Excel, se pueden normalizar tanto los valores de los picos, como de las áreas, obtenidas de su procesamiento en el *Peak Scanner Software*, tanto de las muestras de los pacientes como de los controles utilizados. Finalmente utilizando el cociente que resulta del ratio la muestra de cada paciente por el ratio del promedio de los controles se elaboran las gráficas en el mismo Excel. El análisis de las gráficas se realiza para una misma muestra revisando cuidadosamente tanto los picos como las áreas obtenidos por ambas sondas (P031 y P032) para las mismas muestras, de acuerdo a los índices de la tabla 13.

Estado del número de copias (<i>Copy number status</i>)	Coefficiente de dosis (<i>Dosage Quotient, DQ</i>)
Normal	$0.85 < DQ < 1.15$
Duplicación heterocigota	$1.35 < DQ < 1.55$
Duplicación homocigota	$1.70 < DQ < 2.20$
Delección heterocigota	$0.35 < DQ < 0.65$
Delección homocigota	0
Número de copia equívoca	Otros valores

Tabla 13. Los valores de los cocientes de dosis (*DQ*) de las sondas se pueden usar como un índice para identificar un número anormal de copias en una muestra de ADN utilizando el ensayo de la MLPA.

Las gráficas de la figura 56 de dos pacientes AF españoles, han sido interpretadas teniendo en cuenta la tabla 13.

Como se puede apreciar en la figura 56, el *kit P031/P032 FANCA* de MLPA está diseñado para detectar la delección de uno a más de los 43 exones que conforman el gen *FANCA*, lo cual permite discernir fácilmente la región que compromete la delección.

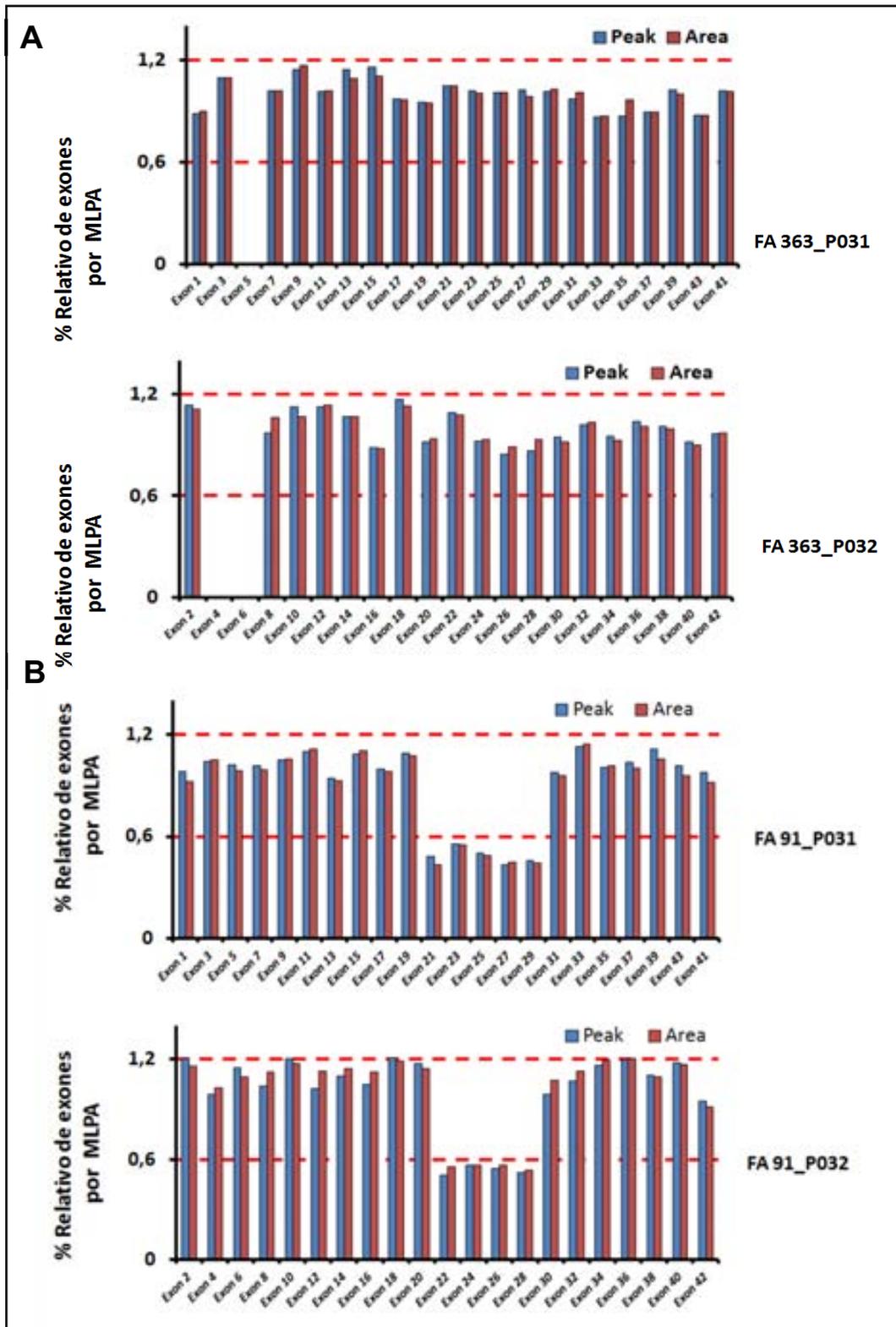


Figura 56. Análisis de grandes deleciones en el gen *FANCA* por MLPA. (A) Determinación de una deleción en homocigosis de los exones 4 al 6. (B) Determinación de una deleción en heterocigosis de los exones 20 al 29.

3.2.4.2. PCR/Secuenciación para la detección de mutaciones en el gen *FANCA*

Para realizar un análisis adecuado de la secuencia genómica del gen *FANCA*, se han tomado cebadores publicados en algunos artículos científicos, y se ha probado su especificidad para amplificar cada una de las regiones de los 43 exones de este gen. En algunos casos se han diseñado y puesto a punto otros cebadores específicos para algunas de estas regiones, debido a problemas con los cebadores que se habían tomado como referencia. Por lo tanto, se han optimizado PCRs para que cumplan con dicha característica. Una vez realizadas las PCRs se procede a la comprobación por medio de electroforesis en soporte de agarosa, identificando y purificando la banda de ADN esperada con un kit específico de purificación de ADN (*NucleoSpin Extract II kit, Macherey-Nagel*). Posteriormente, los productos de amplificación son procesados por un sistema de secuenciación automática para ADN, utilizando el equipo ABI 3730XL de “Applied Biosystems”. El servicio de secuenciación se lleva a cabo por la compañía “*Macrogen Europe Laboratory*” en Amsterdam, Holanda.

Amplificación por PCR de los exones del gen *FANCA*:

Los cebadores han sido diseñados en regiones intrónicas flanqueantes a los exones, de tal manera que permite amplificar las regiones completas de cada exón del gen *FANCA*. Estas regiones incluyen zonas intrónicas (importantes por la presencia de mutaciones de *splicing* en este gen).

El producto de los fragmentos amplificados por estos cebadores oscila en un rango de 150 a 500pb, lo cual le da una mayor fiabilidad al resultado del proceso de secuenciación. En la tabla 14 se muestran los diferentes pares de cebadores diseñados para cada uno de los 43 exones del gen *FANCA*.

Exón	"Forward" (5' - 3')	"Reverse" (5' - 3')	T _m	Tamaño
1	- CAGCCAATAGGAAGGCAG -	- ACCTACCCAGCAGCTCG -	60°C	156pb
2	- GATGGTGGGTTTCTCGCGG -*	- GAACTCCGGGCTCAGGCGAC -*	td	356pb
3	- GAATTTTTAAATGGAGTTT -	- CATTCTACTTAATTTAGCA -	58°C	218pb
4	- GTGAGCTGCTTGGATCATCA -	- TACTCTGCTCCACAGTCA -	58°C	360pb
5	- ACCTGCCGTTGTTACTTTTA -*	- AGAACATTGCCTGGAACACTG -*	td	221pb
6	- GCATTCATAAAGGACTCAG -*	- AGCCAGAAATCAAACCCGTCTGA -*	td	245pb
7	- GGGACATATGGCTCAACTCAATC -*	- GAGACAGGCTTCTGCCTCGC -*	58°C	289pb
8	- CTGAAGTGGATGGTCTGTGCC -*	- CCCGTAATAGGTACAAACAGC -*	58°C	277pb
9	- GCAGTATCACAAAATTACAG -*	- GCACAGTGAAACATACAGAGG -*	58°C	207pb
10	- GTAGAAGTCTTGATGGATGTG -*	- CTGCTGAAGCTCTGGAAGTG -*	58°C	296pb
11	- GATTGGTGGGTTGCGTGCAAGGC -*	- AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC -*	58°C	275pb
12	- CCCACAACTTTTTGTCTCTG -*	- CGTCCACGGCAGGCAGCATG -*	td	221pb
13	- GAGCTGTACAGCTCCATGTG -*	- GTAGGGAAGGGCTTCACTGAG -*	58°C	389pb
14	- GGAATACTTGATCACCAGC -*	- GCTGACAGCAAGGTTGCTCAC -*	td	338pb
15	- GCTTCACACTCTTCTCTCCA -	- TTCTTAGCAGTTGCCTTGAC -	58°C	260pb
16	- CAGCACTGTGGATGTTGGAAG -*	- GAAACAAAGCAGTTTCTGCTGG -*	58°C	249pb
17	- CCATGCCACTCCTCACACC -*	- AAAAGAACTGGACCTTTGCAT -*	td	203pb
18	- CGCACAGCATGTGGGCCTTTACC -*	- GCACACCCTGCAGGCTACAG -*	58°C	333pb
19-20	- GAAACACCGGTCACCGTCTGTG -*	- AGATCCACGATTCTTGCATTGTC -*	58°C	348pb
21	- TAAGCCATAGCTGACTTAATT -	- GCACAAGTCCCAGAGTGACAAG -	58°C	155pb
22	- GTTCACAGCTCTGTATTTGAC -*	- CTACTIONGACTACTAGGAAGAC -*	td	332pb
23	- GCAGGATCCGTGGAATCGTAC -*	- GAGAAGGCTCCATGCGTCTAATG -*	td	326pb
24	- GCTGGCCGGCTTCCCTTC -*	- CGGAGACGAGCTCATGAGTC -*	td	238pb
25	- GCAATGCAGAAGATGGGTTGTC -*	- AAGTAGCAGCCTGGCCCTC -*	58°C	310pb
26	- GAGGGCCAGGCTGCTACTT -	- GACAGATAAAATTTCTGGAAGG -	58°C	434pb
27	- CAGGCCATCCAGTTCGGAATG -*	- CCTTCCGGTCCGAAAGCTGC -*	58°C	274pb
28	- GTGTGGGCTGTTGATGGTCTGTT -*	- CTGTTCTTGCCCCGAGGAGCACA -*	58°C	353pb
29	- GGAACTCTCAGCTGCATTTTC -*	- CAATGAGGACAGAACACAC -*	58°C	214pb
30	- GTCCCAGCCGCCAGTTC -*	- GGGCACCAGCTAGGCCAG -*	td	354pb
31	- CACCGCGCTGGCAATAAATATC -	- CACACTGTGAGCGAAGCACAGCCA -	td	205pb
32	- CTTGCCCTGTCCACTGTGGAG -*	- CTCACTACAAAGAACCTCTAGG -*	58°C	369pb
33	- GACACAGGCCAAGGCTCTG -*	- GGCATTCCAGACACTGTTCC -*	58°C	399pb
34	- GGCCACGCCAAGCCTTAGCG -*	- CAGGAAGCTGACAGGAGGATC -*	td	220pb
35	- GATCCTCCTTGTGAGCTTCTG -*	- TTTCCCTGAGATGGTAACACC -*	td	311pb
36	- GTCATGGCTGGGGCAGCGGAG -*	- TCCCTGCTCACACGAGAGG -*	60°C	310pb
37	- GGTGACAGGTGGGAATAAGGAC -*	- CTTGCTCCAAGCCACATATTTG -*	td	347pb
38	- GGGAGATGATGCTGAGTTGG -	- GTCTGGAACCCCTGACTTGG -	58°C	466pb
39	- TCCAGAGGCCAGTATTACC -*	- GGGCTCGTTCTTAACCATTTG -*	58°C	348pb
40	- CCAGCCTGCTGACAGGTACC -*	- GGACCCAGAGGTGCTGAGATG -*	td	313pb
41	- CCCCATCTCAGCACTTCTGG -*	- CCATAGTCTGCATGCTGTGC -*	58°C	390pb
42	- GCACAGCATGCAGACTATGG -*	- GTCGAGTTGTATTGCCAGCC -*	58°C	281pb
43	- GGCTGGCAATACTCGAC -*	- GGCAGTCCCCTCAGAAGAGAT -*	td	217pb

Tabla 14. Cebadores para la amplificación específica de los diferentes exones del gen **FANCA** por PCR. La T_m es la temperatura de hibridación de los cebadores. La "td" indica que la PCR

se ejecuta bajo el programa de PCR **Touchdown**. *Cebadores diseñados por el grupo de Christophe Mathew.

Para la optimización de las PCRs de los diferentes exones del gen *FANCA*, se utilizaron dos estrategias diferentes. Primero, se han agrupado los pares de cebadores en una de las cuatro rondas de análisis mutacional para este gen, estrategia de rondas sugerida en un trabajo previo llevado a cabo por este grupo de investigación. Segundo, se ha optimizado unas condiciones comunes que permitan a la vez obtener un fragmento de amplificación específico para para cada grupo de exones.

PCR para la amplificación de los 4 grupos de exones en el gen *FANCA*

Para la amplificación específica de estos exones, los volúmenes y concentraciones de los compuestos usados en la solución madre de cada PCR están en indicados en la tabla 15.

	Volumen en μL	Concentración Final
H ₂ O	15,875	
Tampón de Taq a 10X(sin Mg ²⁺)	2,5	1X
dNTPs 1,25 mM	2,5	0,125 mM
MgCl ₂ 25 mM	1,5	1,5 mM
"primer Forward" 20 μM	0,312	0,25 μM
"primer Reverse" 20 μM	0,312	0,25 μM
Taq Polimerasa (5U/ μL)	1	1 U
DNA (100 a 300 ng/ μL)	1	
Volumen total	25 μL	

Tabla 15. Preparación de la solución madre de la PCR: volúmenes y concentraciones de los compuestos de la PCR.

Con el fin de obtener fragmentos de amplificación más específicos, las condiciones del programa de PCR utilizados en el termociclador han sido modificadas para cada una de los grupos de exones.

Para la primera ronda, que incluye los exones 13, 36 y 38, además de la MLPA las condiciones del programa de PCR utilizados en el termociclador han sido las siguientes:

Desnaturalización	94°C x 5 minutos	
Fase de PCR	94°C x 20 segundos 58-60°C x 30 segundos 72°C x 40 segundos	35 ciclos
Fase de extensión	72°C x 5 minutos	
	Dejar a 4°C ∞ .	

Para la segunda ronda, que incluyen los exones 1, 3, 7, 8, 10, 16, 18, 19, 26, 27, 28, 32, 39, 41 y 42, las condiciones del programa de PCR utilizados en el termociclador han sido las siguientes:

Desnaturalización	94°C x 5 minutos	
Fase de PCR	94°C x 20 segundos 58-60°C x 30 segundos 72°C x 40 segundos	35 ciclos
Fase de extensión	72°C x 5 minutos	
	Dejar a 4°C ∞.	

En esta ronda hay que tener en cuenta que la solución madre de la PCR debe modificarse para una concentración final de Magnesio de 4 mM y 3 mM en los exones 3 y 26, respectivamente.

Para la tercera ronda que incluyen los exones 4, 9, 11, 15, 21, 25, 29 y 33, las condiciones del programa de PCR utilizados en el termociclador han sido las siguientes:

Desnaturalización	94°C x 5 minutos	
Fase de PCR	94°C x 20 segundos 58°C x 30 segundos (0,5 °C x ciclo) 72°C x 40 segundos	16 ciclos
	94°C x 20 segundos 55°C x 30 segundos 72°C x 40 segundos	26 ciclos
Fase de extensión	72°C x 5 minutos	
	Dejar a 4°C ∞.	

Para la cuarta ronda que incluyen los exones 2, 5, 6, 12, 14, 17, 20, 22, 23, 24, 30, 31, 34, 35, 37, 40 y 43, las condiciones del programa de PCR utilizados en el termociclador han sido las siguientes:

Desnaturalización	94°C x 5 minutos	
Fase de PCR	94°C x 20 segundos 60°C x 30 segundos (0,5 °C x ciclo) 72°C x 40 segundos	16 ciclos
	94°C x 20 segundos 55°C x 30 segundos 72°C x 40 segundos	26 ciclos
Fase de extensión	72°C x 5 minutos	
	Dejar a 4°C ∞.	

Análisis de los datos de secuenciación

Finalmente el análisis de las secuencias del DNA se lleva a cabo por dos vías en paralelo: el método de alineamiento local y la interpretación de los cromatogramas de las secuencias.

Después de recibir los datos del servicio de secuenciación, se procede a analizarlos por medio de métodos de alineamiento. Primero se busca identificar si la secuencia amplificada no se ha alterado, y si lo está que tipo de variante presenta (mutación o polimorfismo). Por lo tanto, usando el método de alineamiento local, que permite la comparación de pequeños fragmentos de dos secuencias en toda su longitud, se realiza el análisis bajo el mejor alineamiento posible. Para este tipo de alineamientos nosotros hemos venido trabajando con el programa *EMBOSS Matcher - Pairwise Sequence Alignment*: http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/nucleotide.html.

Finalmente los alineamientos son revisados usando la base de datos genética *ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) y *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

En paralelo al análisis por alineamiento, se realiza el análisis visual de las secuencias del DNA. Este análisis es muy importante cuando se trata de identificar y caracterizar una mutación, ya que permite determinar en el caso de mutaciones de cambio de marco de lectura si se trata de una delección o una inserción, así como permite identificar el número de nucleótidos implicados. Adicionalmente, en el caso de tratar de identificar una segunda mutación dentro de una ya existente, el análisis visual y la experiencia del personal encargado se hacen muy relevantes. Con respecto al análisis visual, nosotros hemos usado un software libre y de fácil manejo como es el caso del programa *Chromas Lite 2.01*. Este programa permite tener una visualización de los cromatogramas de las secuencias y de esta manera permite identificar y comparar los picos de las secuencias que estamos estudiando con el fin de darle la mejor interpretación.

3.2.4.3. Implementación de la secuenciación masiva del exoma para el estudio de pacientes AF de difícil subtipaje

Entre las nuevas técnicas de secuenciación de alto rendimiento que se han desarrollado en los últimos años, destacan las técnicas de nueva generación (*Next Generation Sequencing* o NGS), ya que permiten la secuenciación de grandes fragmentos del DNA, (ver tabla 17). Con la puesta en el mercado de nuevos ultrasecuenciadores capaces de secuenciar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de DNA en un único proceso en un menor tiempo y por un coste cada vez más reducido.

Una de estas técnicas es la secuenciación del exoma completo, la cual permite la captura, el enriquecimiento y la resecuenciación dirigida de todas las subsecuencias genómicas codificantes de proteínas. Para la implementación de esta tecnología ha sido contratado la empresa de Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España), los cuales han desarrollado la metodología del proceso sobre la plataforma del ultrasecuenciador SOLiD versión 4 de *Applied Biosystems* y el sistema de enriquecimiento dirigido *SureSelect* para 38Mb. El uso de este secuenciador está basado en la baja tasa de errores que presenta para la secuenciación a gran escala.

Su proceso técnico está dado por:

La construcción de librerías de fragmentos enriquecidos con *SureSelect target Enrichment Human All exon* a partir del genoma humano. Para la obtención de estas librerías se aplican los protocolos y recomendaciones proporcionados por *Applied Biosystems* para la secuenciación en SOLiD v4. La calidad y cantidad de las librerías se valora por análisis con *Qubit* y *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

Cada librería se somete a un proceso de PCR en emulsión para la amplificación clonal de los fragmentos, seguidos de un proceso de enriquecimiento y modificación química para permitir la carga en la cámara de reacción. Finalmente se obtienen unas microesferas para la secuenciación. Para la realización de este proceso se siguen los protocolos y recomendaciones de la casa comercial *Life Technologies* para la secuenciación en SOLiD v4. La calidad y cantidad de las microesferas obtenidas son analizadas teniendo en cuenta los parámetros del análisis del protocolo de trabajo antes de ser secuenciados. Posteriormente se lleva a cabo las

reacciones para la obtención de secuencias de 50 nt +25 nt (*Paired-end*) en SOLiD v4. La calidad de los datos obtenidos se estima mediante los parámetros proporcionados por el software SETS (*SOLiD Experimental Tracking System*).

Finalmente, por una serie de procedimientos bioinformáticos se analizan los datos a de la siguiente forma:

Primero se obtienen las secuencias brutas y los valores de calidad asociados. Las imágenes obtenidas en cada ciclo de ligación son escaneadas con el *software SOLiD Analysis Tools* (SAT) (<http://solidsoftwaretools.com>) para la generación de secuencias en códigos de colores y los valores de calidad generados para grupo de lectura, F3 o F5.

Segundo se hace la determinación de variantes de significado incierto (SNVs, *indels*, variaciones estructurales). Esto se hace en tres fases. En la primera fase se hace el mapeo utilizando la versión hg 18 del genoma humano. Aquí se puede permitir 5 desapareamiento en la lectura F3 (50 nt) y 2 desapareamientos en las lecturas F5 (25 nt). En la segunda fase se realiza el emparejamiento de lecturas, para lo cual las librerías *paired-ends* generan lecturas emparejadas de manera que su distancia relativa y su orientación respecto al genoma de referencia son utilizadas para mejorar la eficiencia del mapeo de lecturas que mapean en múltiples sitios y la detección de variaciones estructurales. En la tercera fase se hace la identificación de variantes, previo a esta fase se deben eliminar las lecturas redundantes que pudieron haberse generado en la PCR de amplificación de las librerías con el fin de reducir el número falsos positivos. A continuación se identifican los SNPs, que gracias a la plataforma SOLiD de códigos por colores el cálculo de SNVs presenta una tasa de detección de falsos positivos muy baja. Luego y tras el emparejamiento de las lecturas se hace la identificación de variaciones estructurales, estas son clasificadas atendiendo a su orientación y distancia que las separan, de manera que la existencia de grupos de lecturas orientadas de forma incorrecta o con un tamaño de inserto superior al establecido en la preparación de la librería (100-300 nt) se identifican como inversiones, translocaciones o grandes deleciones. Posteriormente se hace la identificación de pequeños *indels*, este paso se lleva a cabo mediante un nuevo alineamiento permitiendo huecos en el alineamiento con aquellas lecturas no mapeadas previamente en la primera

fase. Para la identificación de las SNVs se emplea el paquete v0.1.9, el resto del análisis se realiza con *Bioscope* v1.2.1 (<http://solidsoftwaretools.com>) y scripts *in house* escritos en perl.

Tercero se hace la anotación de los resultados y la comparación entre muestras. Las coordenadas de las variaciones identificadas se traducen a la versión hg19 para su posterior anotación. Los SNVs e indels identificados tras el análisis secundario son anotados utilizando los *Application Programming Interfaces* (APIs) del *Ensembl* v59 y varios *scripts* escritos *in house* en *Perl*. Por otra parte, los SNVs e *indels* pueden clasificarse en función de la consecuencia que puedan tener dependiendo de la posición y cambio que produzca en el transcrito. La v59 de *Ensembl* completa varios tipos (ver tabla 16). Posteriormente, se utiliza el programa SIFT para determinar la consecuencia a nivel proteico de las variantes nuevas cuyo efecto a nivel de transcrito hubiera sido previamente clasificado como no sinónimo.

Por lo tanto, la tecnología de secuenciación del exoma completo permite el análisis simultáneo de un gran número de genes facilitando el diagnóstico molecular de enfermedades con gran heterogeneidad en un corto plazo, así como ofrece la oportunidad de identificar nuevos genes asociados a enfermedades genéticas comunes o raras.

SNVs e indels	Consecuencia
Intergenic	SNVs o indels en zonas intergénicas.
Regulatory región variations	Variantes en regiones regulatorias.
Upstream	Variantes en las 5kb anteriores al extremo 5'-UTR.
Complex InDel	Inserción o delección en el límite intron- exón o en el límite UTR-zona codificante.
5prime UTR variations	El cambio identificado se localiza en la region 5'-UTR.
Intronic variations	El cambio identificado se localiza en intrones.
Synonymous	Mutaciones silenciosas. SNVs localizados en la secuencia codificante que no provoca ningún cambio en el aminoácido del que forma parte.
Non-synonymous	SNPs localizados en la secuencia codificante que provoca un cambio de aminoácido que codifica la secuencia proteica.
Splice site	El cambio identificado se localiza a 1-3 nt dentro de un exón o a 3-8 nt dentro de un intrón.
Essential splice site	El cambio identificado se localiza en las dos primeras o dos últimas bases de un intrón.
Frameshift variations	Indel que provoca un cambio en el marco de lectura.
Stop gained	SNVs que provoca un codón de parada.
Stops lost	SNVs que provoca la pérdida de un codón de parada.
3prime UTR variations	El cambio identificado se localiza en la region 3'-UTR.
Downstream	Variantes en las 5kb anteriores al extremo 3' del transcrito.
Partial codón	El cambio identificado se encuentra al final de un transcrito, en un codón incompleto, cuya secuencia codificante ha sido recortada y donde el final es desconocido.
Within mature miRNA	El codón identificado se localiza en un miRNA maduro.
NMD transcript	La variante se localiza en un transcrito que se degrada mediante el mecanismo celular "nonsense-mediated decay" (NMD)*.
Within non-coding gene	SNVs o indels localizados en un gen no codificante.

Tabla 16. Tipos de *Indels* y *SNVs* contemplados en las base de datos de *Ensembl*.

* Los transcritos etiquetados como NMD pasan por una evaluación manual en las bases de datos públicas donde se revisa la literatura disponible y se realizan búsquedas por homología frente a otras proteínas para tratar de evaluar la variabilidad de estos transcritos.

3.2.4.4. Validación de los datos de Secuenciación

En los casos de los pacientes en los que se ha realizado la secuenciación exómica, ha sido necesaria la validación de los datos por medio de secuenciación Sanger y estudios de segregación llevados a cabo en sus respectivos padres. Para el caso de la identificación de un nuevo gen se han llevado a cabo estudios de reversión celular y estudios funcionales de complementación en el contexto de otra tesis doctoral.

Para el caso de la comprobación por secuenciación de Sanger, se seleccionaron los genes que presentaban mutaciones bialelicas. A continuación

se han diseñado los cebadores específicos de la zona donde se ha detectado los cambios de nucleótidos para los genes candidatos y se han realizado las amplificaciones específicas correspondientes (ver tablas 17 y 18). Posterior a la purificación de los fragmentos de PCR obtenidos se han enviado al servicio de secuenciación. Una vez recibidos los resultados se hace el análisis bioinformático y la comparación con los transcritos de referencia correspondientes.

Gen	Exón	“Forward” (5' - 3')	“Reverse” (5' - 3')	Tamaño	T _m
<i>DNAH8</i>	50	-AGATGGTCCTGTGGATGCCA-	-CCAAGAGCTGCATTTTGGGA-	429 pb	58°C
<i>DNAH8</i>	65	-AGTCAAAGACCCCTCAGGGT-	AGCCAGGAGAAAATGGTTCTGCA	548 bp	58°C
<i>HAVCR</i> ₁	3	-TCCACCTAGGGACAGTCTGT-	-CGCATACAACCTGGGAGTTGG-	569 bp	56°C
<i>ALMS1</i>	7a*	-CTCCTTTGATGGCTGTTTCC-	-CCCCTATGTGAGTGGGAACT-	454 bp	55°C
<i>ALMS1</i>	7b*	CACACAGAGAAGCCTGGTAGT-	-GGTTGGTATGCCAGTTGTCTG-	405 bp	58°C
<i>XPF</i>	8	-GGCCTTCTTATTGAGGCTCT-	CATGTAGTACCCTTGTGAGAGC	428pb	58°C
<i>XPF</i>	11	- TTCTCTGTAGGTGGCCAGGA -	- GCACCAGAGAATCCGTAGTCT	402pb	58°C

Tabla 17. Cebadores diseñados para la validación de las mutaciones bialélicas encontrados en genes en la secuenciación genómica del exoma del paciente FA104. *7a y 7b corresponden a la región inicial y final del exón 7 del gen *ALMS1*, respectivamente. La T_m es la temperatura de hibridación de los cebadores.

Gen	Exón	“Forward” (5' - 3')	“Reverse” (5' - 3')	Tamaño	T _m
<i>FANCF</i>	7	- TGGCCACTGTTCTAGGTGCT -	GAAGTTACCGACTACCTCAGGA	244pb	58°C

Tabla 18. Cebadores diseñados para la validación de las mutaciones bialélicas encontrados en genes en la secuenciación genómica del exoma del paciente FA287. La T_m es la temperatura de hibridación de los cebadores.

Una vez descartados los genes que no presenten la doble mutación alélica, se procede con los restantes para realizar el estudio de segregación por medio del análisis de PCR/secuenciación de Sanger en los DNAs de sus respectivos padres.

Solo si es necesario, ya sea porque hay más de un gen con segregación de las dos mutaciones o porque se trata de un gen nuevo, se realizan estudios funcionales a nivel celular.

3.2.5. Otros estudios: ensayo de supervivencia celular a la MMC

Este protocolo permite identificar la sensibilidad de una línea celular a la MMC. Con este ensayo, se puede determinar la concentración de inhibición de crecimiento del 50% (IC50) en cultivos celulares tratados a diferentes concentraciones de MMC. Una línea celular es considerada sensible cuando la IC50 está por debajo de 10nM. Si por el contrario, la IC50 está por encima de 10 nM, la línea celular es considerada resistente, y las líneas celulares transfectadas/transducidas o híbridas son consideradas complementadas.

El ensayo se realiza de manera similar al protocolo del laboratorio de Hans Joenje, con las siguientes modificaciones:

- Por cada línea celular se rotulan 12 frascos de 25 cm².
- Por cada línea celular, se resuspende en un volumen de 60 mL de medio de cultivo con 3×10^6 células (5×10^4 células/mL).
- Dividir la suspensión celular colocando 5 mL de volumen en cada frasco.
- Adicionar las diferentes dosis de MMC a tratar cada línea celular (0, 0.3, 0.6, 1, 3, 6, 10, 20, 40, 60 y 80 ng/mL) en su respectivo frasco rotulado. Dejando dos frasco sin tratamiento (0 ng/mL).
- Dejar en una incubadora a condiciones de 5% de CO₂/aire.
- Uno de los frasco sin tratamiento se usa para monitorear la división celular de cada línea, y después de tener mínimo tres duplicaciones poblacionales (un incremento numérico de 8 campos) se procede a hacer el conteo de todo (entre 4 a 10 días después).
- Con los datos obtenidos se hace una curva y se analizan los resultados.

3.3. PCR CUANTITATIVA ALELO ESPECÍFICA

3.3.1. Amplificación y clonación específica de la región mutante

Utilizando un par de cebadores, se amplificó el exón 11 del gen *FANCA* (región donde esta ubicada la mutación de interés).

Los cebadores utilizados fueron:

<i>Forward</i>	5'- GATTGGTGGGTTGCGTGCAAGGC -3
<i>Reverse</i>	5' - AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC -3'

Las condiciones de la PCR fueron las misma ya explicadas anteriormente. La clonación se realizó a partir de los productos de PCR purificados utilizando el kit TOPO TA Cloning® (pCR®4-TOPO vector de invitrogen, 45-0071). Se implementó el protocolo descrito por el proveedor en su página de internet (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topotaseq_man.pdf).

El esquema de trabajo está ilustrado en la figura 57.

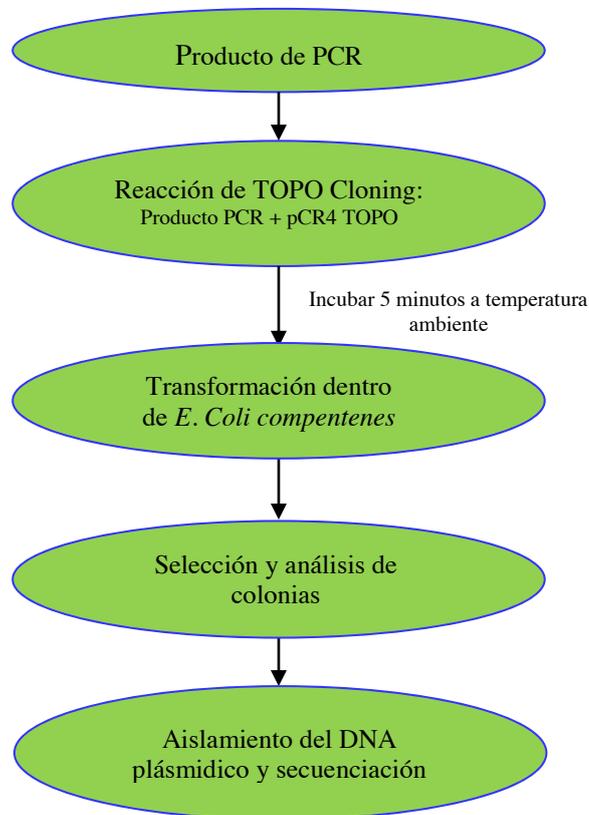


Figura 57. Pasos experimentales necesarios para la clonación de un producto de PCR, utilizando el kit TOPO TA Cloning®.

Básicamente se insertó el DNA amplificado por PCR de cada muestra (FA110_SP, FA110_0nM, FA110_3nM y FA110_10nM) en un plásmido (DNA vector) mediante un proceso de ligación, que requirió previa linealización por medio de una digestión con una enzima de restricción. Posteriormente esta

construcción se amplificó *in vivo* por medio de células *E. coli* competentes (*Library Efficiency*® DH5 α ™ Competent Cells, cat. No. 18263-012), esto favorece la entrada del DNA recombinante. Finalmente en un medio de cultivo selectivo, sólo crecieron aquellas células que tenían dicho fragmento de DNA inserto. Estas colonias fueron seleccionadas y recuperadas y posteriormente procesadas para la purificación de estos fragmentos de DNA insertos. Luego de cuantificar las concentraciones de DNA y analizar su calidad fueron enviadas al servicio de secuenciación. Finalmente fueron analizadas por alineamiento local y revisión de sus cromatogramas. En la figura 58 se esquematiza parte del proceso realizado.

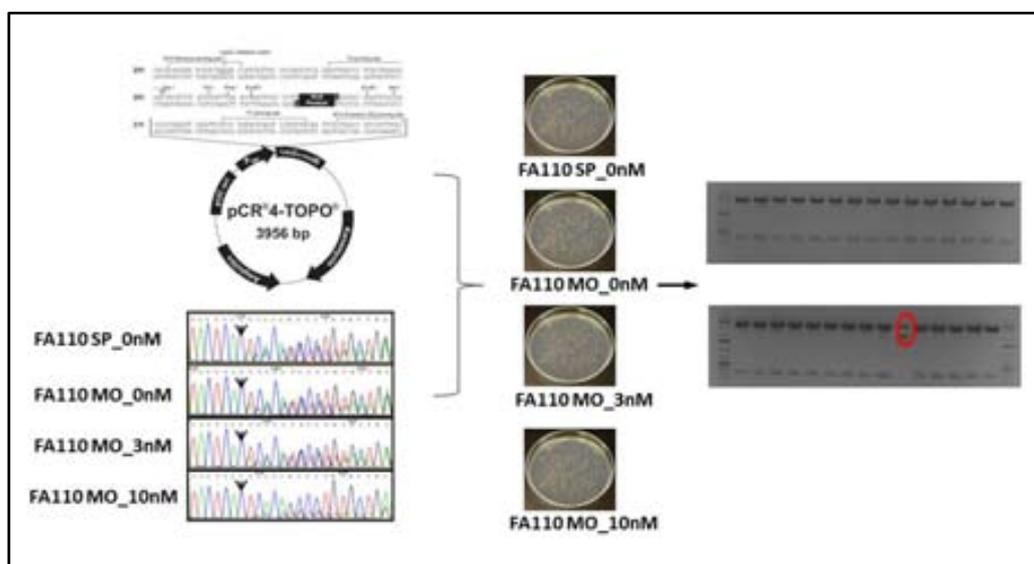


Figura 58. Proceso de clonación de los alelos del exón 11 del paciente FA110. Los diferentes alelos del exón 11 amplificados por PCR de las diferentes muestras del paciente FA110 se insertaron con el plásmido (pCR4-TOPO) y se clonaron por medio de células *E. coli* competentes. Luego de comprobar la correcta inserción se analizaron las secuencias de estos alelos.

3.3.2. Cuantificación de dosis alélica mediante PCR en tiempo real

Para realizar esta técnica se diseñó un par de cebadores específicos tanto para el alelo normal como para el alelo mutado en la región del exón 11 del gen *FANCA*. Estos cebadores fueron testados para evaluar su especificidad de amplificación usando dos clones diferentes, uno cuyo inserto corresponde a la secuencia del alelo normal y otro cuyo inserto corresponde al alelo mutado (microdelección c.987_990delTCAC). Todos los pares de cebadores

amplificaban para un fragmento menor a 200 pb y sus secuencias están descritas en la tabla 19.

El termociclador utilizado fue el modelo *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* de Roche y el programa usado fue:

Desnaturalización	94°C x 5 minutos	
Fase de PCR	94°C x 20 segundos 68 °C x 30 segundos 68°C x 40 segundos	16 ciclos
Fase de extensión	68°C x 5 minutos	
	Dejar a 4°C ∞.	

Cebadores	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
WT11F	- ACTCAGATACTCACTCACAGCC -	- AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC -
4DeIF1	- CCTGACTCAGATACTCACAGCC -	- AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC -
4DeIF2	-TCCACCTAGGGACAGTCTGT-	- AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC -
WT11R	- ACAGGGCTGTGAGTGAGTATCTG -	- AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC -
4DeIR1	-CACACAGAGAAGCCTGGTAGT-	- AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC -
4DeIR2	- GCACAGGGCTGTGAGTATCTGAG -	- AGAATTCCTGGCATCTCCAGTC -

Tabla 19. Cebadores diseñado para la amplificación específica de alelos en el exón 11 del gen *FANCA*.

La solución utilizada se preparó tal como se especifica en la tabla 20.

Componentes	Volumen
H ₂ O MilliQ	4 µl
DNA muestras	0,5 µl
Cebadores (5 µM)	0,5 µl (0,25 µM final)
<i>SYBRGREEN</i>	5 µl
Volumen final	10 µl

Tabla 20. Solución master para la amplificación de los alelos en el exón por PCR en tiempo real.

Para comprobar la especificidad alélica de los diferentes pares de cebadores diseñados se usaron tres diferentes diluciones de las muestras con cada uno de los diferentes pares de cebadores, y a su vez, con triplicados cada una. Con

estos ensayos de comprobación se seleccionaron los mejores pares de cebadores. Estos cebadores fueron el WT11F (específico para el alelo normal) y el 4DelR1 (específico para el alelo mutado).

Posteriormente, todas las muestras (FA110_SP, FA110_0nM, FA110_3nM y FA110_10nM) fueron amplificadas, por triplicados de PCR, con estos dos pares de cebadores. Para la recta patrón, se hicieron 4 diluciones de la muestra FA110_SP y se amplificaron usando los dos pares de cebadores, ver figura 59. Este ensayo se replicó tres veces con el fin de comprobar su reproducibilidad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
											A
WT11F	1:1	1:2	1:4	1:8	4DelR1	1:1	1:2	1:4	1:8		B
WT11F	1:1	1:2	1:4	1:8	4DelR1	1:1	1:2	1:4	1:8		C
											D
WT11F	SP	MO_0nM	MO_3nM	MO_10nM	4DelR1	SP	MO_0nM	MO_3nM	MO_10nM		E
WT11F	SP	MO_0nM	MO_3nM	MO_10nM	4DelR1	SP	MO_0nM	MO_3nM	MO_10nM		F
WT11F	SP	MO_0nM	MO_3nM	MO_10nM	4DelR1	SP	MO_0nM	MO_3nM	MO_10nM		G
											H

Figura 59. Plantilla para la cuantificación alelo específica por qPCR de las 4 muestras (FA110_SP, FA110_0nM, FA110_3nM y FA110_10nM) en estudio. Las filas B y C corresponden a las muestras usadas para construir la recta patrón. Las muestras de los pocillos 2 a 5 fueron amplificadas con el par de cebadores WT11F y la de los pocillos 7 a 10 con el par de cebadores 4DelR1.

3.4. ESTUDIO DE LA INACTIVACION DEL CROMOSOMA X

3.4.1. Búsqueda de marcadores próximos a la isla CpG de *FANCB*

Debido a que el estudio de inactivación se debe evaluar sobre la región promotora donde está la isla CpG, región muy distante a la mutación que se deseaba estudiar, fue necesario hacer un rastreo de la región adyacente a esta isla (se tomó como límite el inicio del exón 3 de este gen) con el fin de identificar los SNPs presentes. Para ello se diseñaron diferentes pares de cebadores que amplificaran por PCR, de manera solapante, la región de

interés. Los cebadores diseñados y utilizados fueron están descripta en la tabla 21.

Cebadores	Forward	Reverse	Programa
FAB 1ipromt	5'-TTGCATCAACCCGCTTACCCT-3'	5'-AGGATGTTTGGCAGCTTCC-3'	PCR
FAB 1SNP	5'-GTATCCTTCCCTCATGAATG-3'	5'-GGAATCAACCCAAGTGTCC-3'	PCR
FAB 2SNP	5'-CAGAGAGTGGGAAACCACA-3'	5'-CTGCCATGAAGTAGGAAGGGT-3'	PCR
FAB 1Fpromt	5'-CTACTTGCATCAACCCGCT-3'	5'-CTGCCATGAAGTAGGAAGGGT-3'	LR-PCR
FANCB 1	5'-GGGCTCTCTGCTTTCACAAC-3'	5'-GTCCTGGGAAGGGAAGACTC-3'	PCR
FANCB 1b	5'-GTGAACCAGAGCATTGTAC-3'	5'-CCTTCCCTCATGAATGTATCC-3'	PCR
FANCB 2a	5'-TTCATGGCAGTTTTTCCTCA-3'	5'-TCCAGTGGACTTCTGAACAAAT-3'	PCR
FANCB 2e	5'-TGCCCTTACTCGAAAGAATCA-3'	5'-TCTGAGACCACCAACTGAATTA-3'	PCR
FANCB 10	5'-TCCTTGTCCAGAATCAACAGC-3'	5'-TGCTCTAGAAGCTCACTGTGC-3'	PCR
FANCB 11	5'-CCTTAACACTGTCACCAGGA-3'	5'-TCTAGCCTATGGGCTATTTGAC-3'	PCR
FANCB 11.1	5'-TGTATCTTCTGCAGCCACTGT-3'	5'-TACGATCTCCAGGCAGAAAGC-3'	PCR
FANCB 12	5'-GGTGCAGACATCTCTTTGACA-3'	5'-TGACAAAGGTGCCAAGAACCA-3'	PCR
FANCB 13	5'-GGCTATTAGGGTCTTTTGTGG-3'	5'-TCAGCAATGGTGTCTAGTTTGG-3'	PCR

Tabla 21. Cebadores empleados para el cribado de SNP en FANCB. Pares de cebadores diseñados y empleados para la amplificación de la región comprendida entre la región promotora y el inicio del exón del gen *FANCB*.

La solución *master* de la PCR convencional y *Long Range* PCR fueron:

PCR convencional	Volumen en μL	Concentración Final
H ₂ O	15,875	
Tampón de Taq a 10X(sin Mg ²⁺)	2,5	1X
dNTPs 1,25 mM	2,5	0,125 mM
MgCl ₂ 25 mM	1,5	1,5 mM
"primer Forward" 20 μM	0,312	0,25 μM
"primer Reverse" 20 μM	0,312	0,25 μM
Taq Polimerasa (5U/ μL)	1	1 U
DNA (100 a 300 ng/ μL)	1	
Volumen total	25 μL	

Tabla 22. Solución *master* empleada para la PCR convencional.

Long Range PCR	Volumen en μL	Concentración Final
H ₂ O	32	
Tampón de Taq a 5X (con Mg ²⁺)	10	1X
dNTPs 10 mM	2,5	500 μM
Cebador Forward 20 μM	0,75	0,3 μM
Cebador Reverse 20 μM	0,75	0,3 μM
DMSO 100%	2,5	5%
Long Range Taq Polimerasa (3,5U / 50 μL)	0,5	1 U
DNA (100 a 300 ng/ μL)	1	
Volumen total	50 μL	

Tabla 23. Solución *master* empleada para la Longe Range PCR. Se utilizó el Kit de Roche *Expand long Range dNTPack* (Ref. 04 829 034 001).

El programa empleado en el termociclador para la PCR convencional fue:

Desnaturalización	94°C x 5 minutos	
Fase de PCR	94°C x 20 segundos 58-60°C x 30 segundos 72°C x 40 segundos	35 ciclos
Fase de extensión	72°C x 5 minutos	
	Dejar a 4°C ∞.	

El programa empleado en el termociclador para la *Long Range* PCR fue:

Desnaturalización	94°C x 5 minutos	
Fase de PCR	94°C x 20 segundos 65°C x 30 segundos 68°C x 40 segundos	10 ciclos
	94°C x 20 segundos 60°C x 30 segundos 68°C x 40 segundos	20 ciclos
Fase de extensión	68°C x 7 minutos	
	Dejar a 4°C ∞.	

3.4.2. Cribado de marcadores alelo-específicos de la mutación

Por medio de la secuenciación de los productos de PCR de los diferentes fragmentos amplificados en el gen *FANCB* se buscó los posibles SNPs que reunieron los criterios para ser utilizados como marcadores específicos de alelo portador de la mutación en este gen. Los criterios de selección de estos SNPs fueron: frecuencia de heterocigosidad >10% y demostrar que estaban ligados al alelo que portaba la mutación c.2268delT. Para este análisis de SNPs se utilizó las páginas web *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) y *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu>).

Este ensayo se llevó a cabo inicialmente en las muestras de dos de los pacientes FA-B, dos familiares portadores y dos familiares no portadores de dicha mutación. Después de identificar el marcador del alelo portador de la mutación, se realizó el cribado de este en todos los individuos de esta familia que eran portadores de la mutación.

3.4.3. Metodología del análisis del gen *FANCB* por PCR anidada

Para realizar correctamente el ensayo de caracterización del patrón de inactivación del cromosoma X en el gen *FANCB*, se requirió poner a punto un

sistema de PCR anidada que incluyera la región promotora (con su isla CpG) y el sitio donde estaba el SNP marcador del alelo portador de la mutación. Para esta estrategia se diseñaron dos tipos de PCRs una para amplificación de fragmentos grandes (*Longe Range PCR*, PCR4) y una PCR ubicada sobre el marcador de la mutación (PCR3), ver figura 71.

Antes de continuar con el ensayo se realizó la confirmación del fragmento amplificado por la PCR4. En este punto se aprovecharon PCRs anteriormente puestas a punto para el cribado de los SNPs (PCR1 y PCR2), tal como se esquematiza en la figura 60.

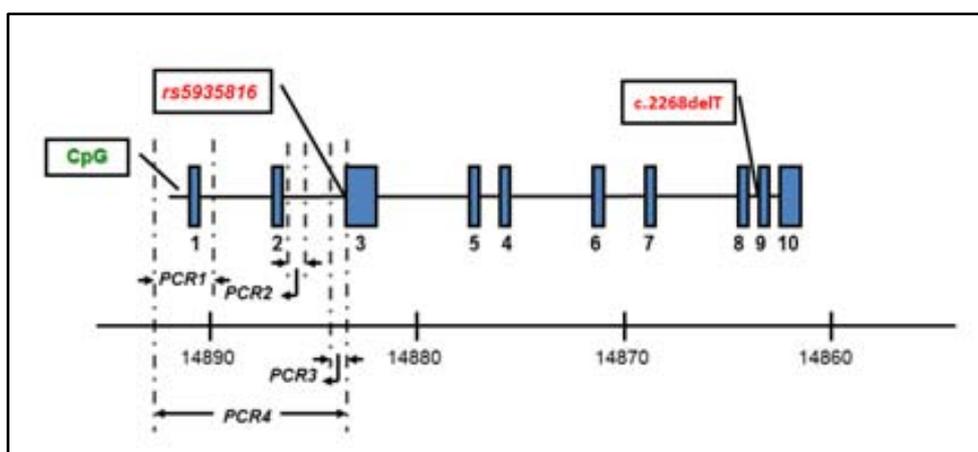


Figura 60. Estrategia de amplificación del SNP marcador de la mutación c.2268delT en el gen *FANCB*. La PCR1 fue realizada usando el par de cebadores FAB 1ipromt (amplificaba para un fragmento de 1149 pb), la PCR2 fue realizada usando el par de cebadores FAB 1SNP (amplificaba para un fragmento de 497 pb), la PCR3 fue realizada usando el par de cebadores FAB 2SNP (amplificaba para un fragmento de 354 pb) y PCR4 fue realizada usando el par de cebadores FAB 1Fprompt (amplificaba para un fragmento de 8055 pb), ver tabla 20.

3.4.4. Ensayo de caracterización del patrón de inactivación del cromosoma X en el gen *FANCB*

Teniendo identificado el marcador alélico de la mutación, se procedió a realizar este ensayo por medio de la enzima de restricción *CfoI/HhaI* de Roche (Producto No. 10688541001) que es sensible de metilación (no corta regiones metiladas). Este ensayo se realizó tal como se hizo en otros estudios de caracterización del patrón de inactivación del cromosoma X (Meetei et al., 2004). La Temperatura de incubación fue de 37°C por 18 horas y la temperatura de inactivación fue 90°C por 12 minutos.

La solución de digestión fue la siguiente:

<i>CfoI</i> (Roche):	1,5 μL
Buffer 1:	2,0 μL
DNA genómico:	--- μL (1 μg)
H₂O:	--- μL
Volumen total:	20 μL

En la figura 61 se esquematiza el principio por el cual se hace la digestión del alelo no metilado y la posterior amplificación del alelo metilado.

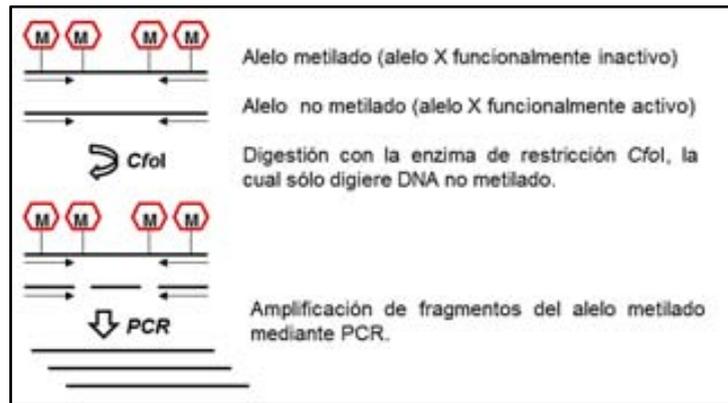


Figura 61. Ensayo de caracterización del patrón de inactivación del cromosoma X. Por medio por la digestión del DNA genómico con la enzima de restricción *CfoI* y posterior amplificación de la región de interés por la PCR4 y la reamplificación anidada con la PCR3.

Posteriormente a la digestión de DNA genómico, se realiza la amplificación de la región de interés con el sistema de PCR anidada y se procesan por secuenciación Sanger. Finalmente se analizan los resultados de secuenciación, para determinar el patrón de metilación de los alelos, ver figura 62.

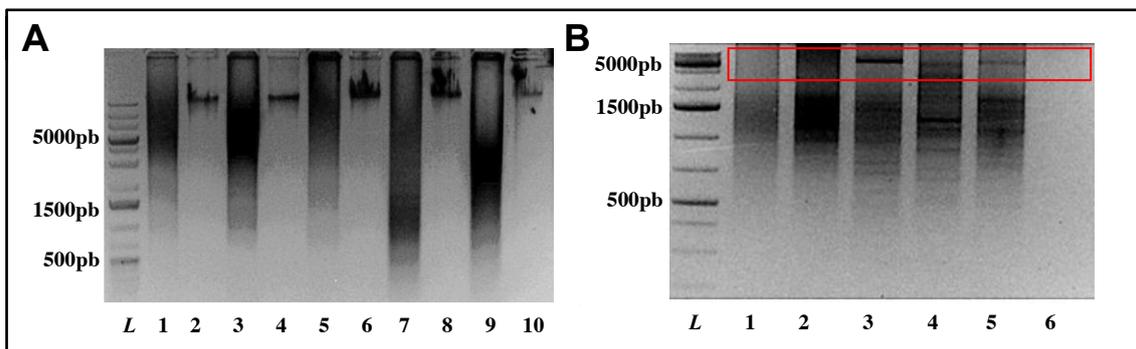


Figura 62. Ensayo de análisis de la inactivación del alelo X metilado. **A.** Digestión de DNA genómico con *CfoI*. Los números impares hace referencia al DNA genómico digerido y los pares hace referencia al DNA no digerido. **B.** Amplificación por el sistema de PCR anidado del DNA genómico digerido previamente. Los carriles 1 y 2 contienen el DNA digerido de dos pacientes masculinos FA-B. El fragmento de DNA de 8000 Kb amplificado incluye la región promotora de *FANCB* y el SNP utilizado como marcador alélico de la mutación presente en este gen.

3.5. DATOS CLINICOS DE PACIENTES AF MOSAICOS ESPAÑOLES

Para este trabajo se contó con la colaboración de diferentes centros hospitalarios, así como diferentes especialistas clínicos en su mayoría del área de Barcelona. Entre los hospitales que participaron estuvieron el Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona), el Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona), el Hospital Universitario de Sant Pau (Barcelona), el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid) y el Hospital Universitario de Canarias (islas Canarias).

Fue un estudio de tipo retrospectivo y descriptivo cuyo objetivo era caracterizar la evolución hematológica de este tipo de pacientes AF con mosaicos somático a nivel hematopoyético.

3.5.1. Elaboración gráfica de la evolución hematológica de pacientes mosaicos

La elaboración de las gráficas se realizó en formato Excel, donde los datos fueron recopilados de la historia clínica en un proceso que requirió previa autorización del centro hospitalario y del especialista médico. Esta recopilación de los datos fue un proceso bastante laborioso ya que muchas historias clínicas aún no estaban digitalizadas y supuso su recuperación del registro de historias así como la búsqueda de todos los datos de evaluación hematológica (datos del hemograma: hemoglobina, VCM, leucocitos, neutrófilos absolutos y plaquetas) y evolución clínica relevante, y su paso a formato Excel de manera manual. Una vez se tuvieron estos datos digitalizados se procedió a la elaboración de las gráficas siguiendo dos modelos diferentes. Un primer modelo consistió en convertir los datos absolutos a datos relativo, lo cual fue hecho teniendo en cuenta los valores normales de cada parámetro tanto para la edad como el sexo de cada paciente. Los datos de cada paciente fueron normalizados a un valor relativo tomando los valores normales como el 100%, de este modo dichos datos relativizados permitieron su representación en una misma gráfica para cada paciente.

El segundo modelo consistió en la elaboración de las gráficas independientes para cada uno de los parámetros recogidos en cada paciente respetando sus valores reales y sus unidades de medición sin ningún tipo de modificación.

3.6. RECOPIACIÓN DE DATOS DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL CON TIPIFICACIÓN DE HLA

Previo consentimiento informado y bajo la colaboración de las diferentes familias españolas con hijos afectados con AF que habían iniciado un proceso de DGP con tipificación HLA se llevó a cabo un estudio piloto de recogida de datos y experiencias de manera retrospectiva para valorar la efectividad de esta tecnología en la obtención de donantes sanos y HLA idénticos a sus hermanos AF. En este estudio retrospectivo y descriptivo se buscó determinar la edad media de las mujeres sometidas al procedimiento, la tasa de embriones transferibles y la tasa de embarazo y nacidos vivos obtenida en esta cohorte de parejas. Así mismo se buscó valorar el impacto de los diferentes factores, como la edad materna, porcentajes de ploidías identificadas y tasa de abortos, en la efectividad de este procedimiento.

Para ello se elaboró una encuesta que permitían recoger estos datos, preguntando de forma sencilla. Adicionalmente dichas parejas de manera voluntaria nos facilitaron los informes genéticos de los centros especializados en donde llevaron a cabo dichos procedimientos. Se consiguió la colaboración en el estudio de 7 parejas, cuyos datos fueron codificados y digitalizados en formato Excel para mantener su confidencialidad.

Una vez digitalizados los datos, se procedió al análisis de las diferentes tasas y la graficación de los datos con el fin de remarcar la relación entre el número ovocitos logrados, de embriones conseguidos, de embriones transferibles y/o transferidos, de embarazos conseguidos y nacidos vivos obtenidos. Para ello se necesitó indagar en datos precisos como el número de ovocitos logrados tras las estimulaciones ováricas, el número de embriones obtenidos, el cribado de los embriones para la obtención de embriones sanos y HLA compatibles (cribado de mutaciones, HLA y aneuploidías), el número de embriones transferidos, embarazos obtenidos y nacidos vivos.

3.7. ANÁLISIS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA POR TERMINAL RESTRICTION FRAGMENTS-SOUTHERN BLOT (TRF- SOUTHERN BLOT)

El *TRF- Southern blot* es un método para evaluar la longitud de los telómeros usando la técnica del *Southern blot*. La técnica se realizó con el *Kit DIG DNA Labeling and Detection* (Cat. No. 11 093 657 910) de Roche siguiendo las recomendaciones del fabricante. Requiere tres días, por lo que separamos el proceso en tres fases (una fase para cada día):

Fase 1:

Primero se midió la concentración del DNA y se valoró su calidad. Luego se diluyó 1 µg de DNA en un volumen final de 17 µl. Para ello se mezcló la cantidad de DNA requerida de cada muestra a analizar y se añadió agua miliQ hasta alcanzar el volumen final. En el caso de los DNA controles del kit se añadió 10 µl del control a 7 µl de agua. Luego se preparó la mezcla enzimática de *Hinfl* y *Rsal* mezclando cantidades iguales de ambas enzimas.

Posteriormente a cada muestra se añadió 1 µl de la mezcla enzimática y 2 µl del tampón de digestión A y se incubó 2 horas a 37°C. Una vez finalizado, se paró la digestión y se añadió 4 µl de tampón de carga. Se cargó todo el volumen y 15 µl de marcador en un gel de agarosa al 0.5%. Se puso el gel a correr por electroforesis a 35 V con una temperatura ambiente de 4°C hasta que el frente del colorante avanzó unos 10 cm (aproximadamente 20-21 horas).

Fase 2:

Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó el gel durante 15 minutos con *Sybr safe*. Se hizo una foto del gel para comprobar que la digestión se hubiera hecho correctamente. Luego se puso el gel en una solución 0.25 M de HCl durante 10 minutos hasta que el colorante azul se tornó amarillo. Desde este paso y hasta los lavados con la solución de neutralización se realizaron con agitación suave. Luego de sacarlo de la solución amarilla, se lavó el gel dos veces con agua destilada. Luego se hicieron dos lavados con la solución de desnaturalización (tabla 24) de 15 minutos cada uno. Luego se hicieron otros dos lavados con agua destilada y otros dos lavados con la solución de neutralización (tabla 25) de 15 minutos cada uno. Finalmente, se dejó transfiriendo entre 12-24 horas.

El montaje de la transferencia se realizó con el método tradicional clásico de bloques de papel absorbente.

Fase 3:

Una vez finalizada la transferencia se desmontó la transferencia y se puso el filtro en la solución de 6X SSC durante 5 minutos (es importante que el filtro siempre se manipula con pinzas). Luego se puso el filtro entre 2 papeles *whatman* y dejarlo 30 minutos. Posteriormente se fijó el DNA en el filtro irradiándolo 3 minutos con el transiluminador, para ello se colocó el filtro con la cara que contenía el DNA boca abajo. Luego se puso el filtro 2 minutos en 2X SSC y se depositó en un cilindro de hibridación asegurándose que la cara que continúa el DNA quedara mirando hacia el interior del tubo. Luego se añadió 10 mL de la solución *DIG Easy Hyb* (viene con el kit), previo precalentamiento en el cilindro. Posteriormente se incubó 1 hora a 42°C en el horno, con el rotor encendido. Luego se eliminó la solución de prehibridación (tabla 26) y se añadió la solución de hibridación (tabla 27) y se incubó 3 horas a 42°C. Luego se hicieron dos lavados del filtro con el tampón de lavado I (tabla 28) durante 5 minutos cada lavado y otros dos lavados del filtro con el tampón de lavado II (tabla 29) durante 20 minutos cada lavado a 50°C y en agitación. Posteriormente se puso el filtro en 100 mL de tampón I (tabla 30) durante 5 minutos con agitación suave y se pasó luego a 100 mL de tampón II (tabla 31) durante 30 minutos con agitación suave. Luego se incubó el filtro con la solución anti-DIG-AP (tabla 32) durante 30 minutos con agitación suave y se pasó a 200 mL de tampón I durante 15 minutos con agitación suave. Luego se incubó el filtro con el tampón de detección (tabla 33) durante 5 minutos con agitación suave. Luego se puso el filtro sobre un papel *whatman* para eliminar el exceso de líquido pero sin dejar secarlo. Posteriormente se puso el filtro en la bodega del equipo *GeneGnome* (equipo para la toma de imágenes de quimioluminiscencia), previa preparación con una solución de quimioluminiscencia durante 5 minutos y posterior eliminación del exceso de líquido. Se revelaron las imágenes con el *GeneGnome*, con un tiempo de exposición entre 5 a 40 minutos. Finalmente las imágenes se procedieron a analizar a partir de los datos obtenidos del procesamiento de estas con el programa *Quantity One*®, el cual se comentará más adelante.

Soluciones utilizadas:

Solución de desnaturalización	
NaOH	9.99 g
NaCl	43.83 g
Volumen final	Enrasar con agua destilada hasta los 500 mL

Tabla 24. Composición de la solución de desnaturalización.

Solución de neutralización	
NaCl	87.66 g
Tris base	30.27 g
Volumen final	Ajustar a pH 7.5 con HCl y enrasar con agua destilada hasta los 500 mL.

Tabla 25. Composición de la solución de neutralización.

Solución 20X SSC	
Citrato Sódico	88.2 g
NaCl	175.3 g
Volumen final	Ajustar a pH 7 con ácido cítrico anhidro, enrasar con agua destilada hasta 1L. Autoclavar.

Tabla 26. Composición de la solución de prehibridación (20X SSC).

Solución de hibridación	
Sonda telomérica kit	1.6 µl
DIG Easy Hyb	8 mL

Tabla 27. Composición de la solución de hibridación.

Tampón de lavado I	
20X SSC	25 mL
SDS 10%	2.5 mL
Volumen final	Enrasar con agua miliQ autoclavada hasta los 250 mL

Tabla 28. Composición del tampón de lavado I.

Tampón Lavado II	
20X SSC	2.5 mL
SDS 10%	2.5 mL
Volumen final	Enrasar con agua miliQ autoclavada hasta los 250 mL

Tabla 29. Composición del tampón de lavado II.

Tampón I	
Tampón ácido maleico 10X	30 mL
Tween 20	900 µl
Volumen final	Enrasar con agua miliQ autoclavada hasta los 300 mL.

Tabla 30. Composición del tampón I.

Tampón II	
Tampón ácido maleico 10X	20 mL
Agente Bloqueante	2 g de agente bloqueante diluido en 20 mL de agua miliQ autoclavada.
Volumen final	Enrasar con agua miliQ autoclavada hasta los 200 mL.

Tabla 31. Composición del tampón II.

Solución anti-DIG-AP	
Anticuerpo anti-DIG-AP	10 µL
Volumen final	100 mL

Tabla 32. Composición de la solución anti-DIG-AP.

Tampón de Detección	
Tris-HCl 0.5M pH=9.5	25 mL
NaCl 5M	2.5 mL
MgCl·6 H ₂ O	62.5 mL
Volumen final	Enrasar con agua miliQ autoclavada hasta los 125 mL.

Tabla 33. Composición del tampón de detección.

Análisis de la Imagen

Una vez obtenida la imagen se procedió a analizarla con el programa informático *Quantity One*®. Este programa construye una línea en cada carril (ver figura 74). Dentro de estas líneas crea unos puntos, cuya cantidad viene definida por la longitud de la línea creada. Cada uno de estos puntos es a su vez la media de los puntos contenidos en una línea perpendicular de 4 mm de ancho. A cada uno de los puntos de la línea se le asigna un valor de movilidad relativa (*Rf*) así como un valor de densidad óptica (OD). A estos valores de OD el programa les resta el valor basal de cada carril. Como resultado del trabajo del programa se obtuvo una tabla de Excel con valores de *Rf* y de OD's.

Luego de tener estos valores en Excel se representaron en una gráfica de datos para los diversos marcadores del peso molecular utilizados en el *Southern blot* poniendo en el eje de las X los valores de R_f y en el eje de las Y los valores de OD (ver figura 63). El marcador de peso molecular (*Ladder*) utilizado en nuestro experimento contenía trece bandas distintas (ver figura 64). De las gráficas R_f vs OD se toman los valores de R_f que correspondan a los picos de máxima OD de cada una de las trece bandas, obteniendo así trece valores de R_f que estarán asociados a una longitud en pb.

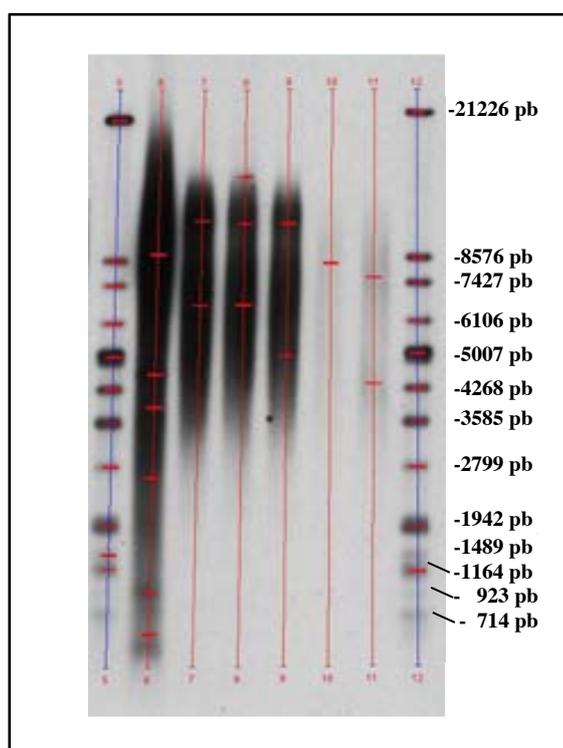


Figura 63. Análisis del DNA procesado por TRF-Southern blot por el programa Quantity One®. Este programa construye una línea en cada carril y crea unos puntos de acuerdo a la longitud construida. Tanto al inicio y el final de las muestras debe ir flanqueadas por un marcador de peso molecular.

Utilizando el programa de análisis estadístico *SPSS* se graficaron estos puntos (Gráfica R_f vs pb del *ladder*) y se calculó una función matemática que permitió una aproximación a la forma más adecuada de estos puntos. Después de probar diversas funciones matemáticas se concluyó que la que mejor se aproximaba a los puntos era la función cúbica.

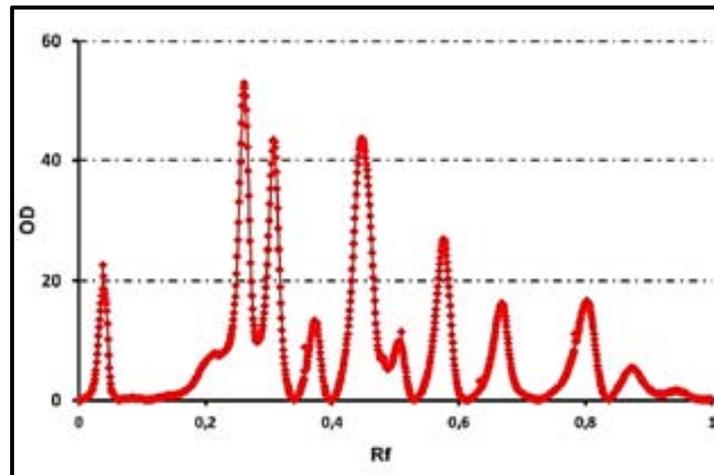


Figura 64. Gráfica Rf vs. OD del Ladder 1.

El cálculo de la función cúbica se realizó para cada uno de los marcadores del peso molecular utilizados. Seguidamente, para el resto de carriles y para cada uno de los puntos se calculó el cociente entre el valor de OD y el valor de Rf . Una vez obtenido este cociente se calculó, para cada carril el sumatorio de los valores de OD así como el sumatorio del cociente OD/Rf de cada punto, excluyendo los valores que estaban fuera de los marcadores del peso molecular. A continuación se muestra la fórmula matemática utilizada para calcular del valor de Rf medio (\overline{Rf}) para cada uno de los carriles:

$$\overline{Rf} = \frac{\sum OD}{\sum \left(\frac{OD}{Rf} \right)}$$

Este valor de \overline{Rf} fue sustituido en las fórmulas de las funciones cúbicas de cada uno de los marcadores del peso molecular que rodeaban al carril analizado. De cada uno de ellos se obtuvo un valor de peso molecular en forma de pb. Por último, se realizó la media de ambos valores obtenidos para conseguir el resultado final en pb.

4. RESULTADOS

4.1. DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN MUTACIONAL DE PACIENTES AF ESPAÑOLES

La función del diagnóstico molecular en AF es la identificación del gen alterado y la caracterización de su alteración (análisis mutacional). La identificación de estas mutaciones en nuestra población de pacientes hace parte de la caracterización genética global de esta enfermedad.

En España gracias a la Red Nacional en AF se ha podido crear un trabajo interdisciplinario entre diferentes grupos de investigación traslacional en esta enfermedad, el cual ha desarrollado una estrategia de subtipaje de pacientes AF que ha permitido al día de hoy llegar al 90% de identificación del grupo de complementación en la población estudiada. Sin embargo, dicha tarea resulta muchas veces laboriosa y complicada de finalizar, primero por el número de genes implicados en la enfermedad y segundo por el espectro mutacional en cada uno de estos. Esto crea la necesidad de adaptar el análisis mutacional a las actuales tecnologías de alto rendimiento con el fin de mejorar la estrategia de subtipaje y disminuir el tiempo de diagnóstico molecular.

4.1.1. Implementación del WB y de la complementación retroviral para el subtipaje de pacientes AF

En España el subtipaje de pacientes AF se lleva a cabo mediante un trabajo conjunto entre del grupo de la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT (Madrid) y nuestro grupo de investigación. Ello ha permitido desarrollar un protocolo eficiente que ha llevado al subtipaje de la mayoría de pacientes AF españoles. El primer paso de esta estrategia, después de realizar la confirmación del diagnóstico en nuestro laboratorio por el ensayo de fragilidad cromosómica, es llevar a cabo los ensayos de complementación con vectores retrovirales de los grupos más comunes (FA-A, -C, -G, -D2, -E y -F) en linfocitos de sangre periférica y en el caso de los pacientes mosaicos en fibroblastos primarios, proceso que se realiza en el CIEMAT, Madrid. Por lo tanto, la mayor parte del subtipaje la ha realizado el grupo del CIEMAT. No obstante, no siempre resulta fácil este proceso, sobre todo en el caso de subtipos poco comunes, en los se ha hecho necesario el uso de diversas técnicas. En estos casos el análisis de expresión de la proteína

por WB y el estudio mutacional ha resultado muy útil. En esta parte del trabajo es en la que nuestro grupo se ha venido enfocando. En estos casos ha sido relevante indagar en la historia clínica de los pacientes así como en sus antecedentes familiares en busca de pistas que nos oriente el trabajo (consanguinidad paterna, etnia, historia de cáncer, análisis de pedigrí, etc.). De esta manera, el subtipaje realizado ha resultado muy laborioso, y sólo en algunos casos ha resultado poco fructífero ya que aún no se ha podido identificar su grupo de complementación.

Hasta la fecha del 31 de Julio del 2013 se han confirmado 157 pacientes AF por el ensayo de fragilidad cromosómica en nuestro servicio, de los cuales solo 15 pacientes aún no han sido asignado su grupo de complementación (10%). Interesantemente entre los grupos de complementación más frecuentes no figura el grupo FANCC, siendo los más frecuentes el FA-A (76%), el FA-D2 (4%) y FA-G (4%), seguidos por FA-E (2%) y FA-J (2%), y finalmente por FA-C, -D1 y -Q en menor porcentaje (ver figura 76). Adicionalmente no se han identificado pacientes de los grupos de complementación FA-B, -F, -I, -L, -M, -N, -O y -P, tal como se puede apreciar en la figura 65.

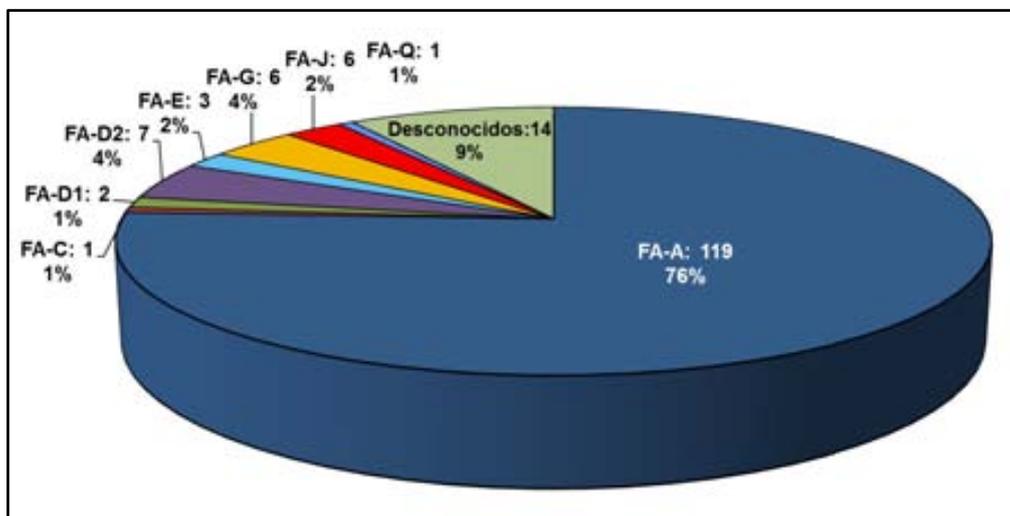


Figura 65. Porcentaje de los grupos de complementación en la población AF española. Pacientes AF subtipados mediante complementación con vectores retrovirales en linfocitos de SP, fibroblastos o líneas linfoblastoides, expresión proteica por WB, y análisis mutacional hasta el 31 de Julio del 2013.

En cuanto a los 15 pacientes sin subtipar algunos ya fallecieron en el proceso de la confirmación del diagnóstico por lo cual no se alcanzó a obtener muestra para extracción de DNA, tales fueron los casos de los pacientes FA474 (se

descartó por complementación retroviral los grupos FA-A, -C y -G) y FA569 (se descartó por complementación retroviral los grupos FA-A y -C y el grupo FA-G quedo pendiente de confirmar). En otros casos quedaron incompletos sus estudios por no disponer de más muestra, estos casos fueron el FA136 (se descartó por complementación retroviral los grupos FA-A, -C y -G), el FA158 (se descartó por análisis mutacional los genes *FANCA*, *FANCC*, *FANCF* y *FANCG*) y el FA 280 (se descartó por complementación retroviral y/o WB los grupos FA-A, -C, -G, -E, -F, -L, -D1, -D2 y -J). En otros casos recientemente se hizo su confirmación diagnóstica y están en el paso inicial del proceso de subtipaje como son los casos de los pacientes FA654 y FA663.

Finalmente sólo están pendientes de continuar el proceso de subtipaje 8 de estos pacientes (ver tabla 36), de los cuales, el FA609 está en proceso de análisis mutacional por secuenciación del exoma completo y los demás están pensados para ser procesados por este sistema de secuenciación con el fin de identificar el gen afecto en cada caso (ver tabla 34).

Paciente	Estado	Sexo	Sensibilidad ICLs	MonoUb. FANCD2	Subtipos descartados	Material disponible	Trabajo pendiente
FA124 [^]	Vivo	F	Test DEB: +	ND	No FA-A,-C,-G*	DNA	Pendiente S. exomica
FA326	Vivo	F	Test DEB: +	No	No FA-A,-C,-G, -E,-F,-D2, B y L**	DNA y FB	Pendiente S. exomica
FA331 [^]	Vivo	M	Test DEB: +	No	No FA-A,-C,-G*, -B y L**	DNA y FB	Pendiente S. exomica
FA357	Vivo	F	Test DEB: +	ND	No FA-A,-C,-G, -E,-F,-D2	DNA	Pendiente S. exomica
FA531	Vivo	F	Test DEB: +	ND	No FA-A,-C,-G, -E,-F,-D2	No	Pendiente conseguir muestra
FA574 [^]	Vivo	M	Test DEB: +	ND	No FA-A,-C,-G*	DNA y FB	Pendiente S. exomica
FA609	Vivo	M	Test DEB: +	No	No FA-A,-C,-G, -E,-F,-D2 y -B [#]	DNA y FB	En proceso S. exomica

Tabla 34. Pacientes AF españoles pendiente de subtipaje. Pacientes en los que se ha descartado los grupos más comunes de AF por medio de la estrategia de subtipaje planteada por la Red española de AF. [^]pacientes con mosaicismo por reversión mutacional, *complementación con vectores retrovirales en fibroblastos de piel, **presencia de banda de FANCB y FANCL en WB, [#]presencia de banda de FANCB en WB y ausencia de mutaciones en este gen por secuenciación de *Sanger*, S: secuenciación.

En resumen, el proceso de subtipaje llevado a cabo hasta ahora arrojó unos resultados positivos, producto de más de 10 años de trabajo y tres tesis doctorales. En el primer paso, se logró subtipar el 81% de los pacientes AF. Ello se llevó a cabo mediante complementación con vectores lenti-retrovirales normalmente en linfocitos de SP, pero en los casos de mosaicismo por

reversión mutacional, se ha realizado en fibroblastos de piel. El proceso de subtipaje en ese 19% restante resultó más laborioso y en algunos casos aún no se han podido tener el subtipar. El trabajo de la segunda etapa dependió, en parte, del material disponible de cada paciente. En aquellos casos en los que se disponía de línea celular, ya sea de linfocitos o de fibroblastos, se procedió a realizar el estudio de activación de la ruta FA/BRCA por WB para detectar la FANCD2-Ub. En los casos en los que sólo se disponía de DNA genómico, se continuó el subtipaje mediante análisis mutacional como fue el caso del paciente FA121 el cual se descartaron mutaciones en *FANCA* y se identificó una mutación en el gen *FANCE* sugiriendo con una alta probabilidad que este sea su grupo de complementación (es un paciente mosaico en SP y tal vez esta condición explique porque no se halló la segunda mutación). Otro buen ejemplo lo tenemos en el paciente FA609 en el cual a pesar de haber realizado complementación retroviral de los grupos FA más frecuentes (FA-A,-C,-G,-E,-F,-D2), de haber realizado el estudio de expresión de las proteínas FANCD2 y FANCB por WB, así como de haber realizado secuenciación de los exones del gen *FANCB* (ya que por indagación clínica sugiere un patrón de herencia ligada al X) aún no se ha podido identificar el grupo de complementación (ver figura 66). Actualmente está en proceso de análisis mutacional por secuenciación del exoma completo en una empresa privada (Sistemas Genómicos, Valencia).

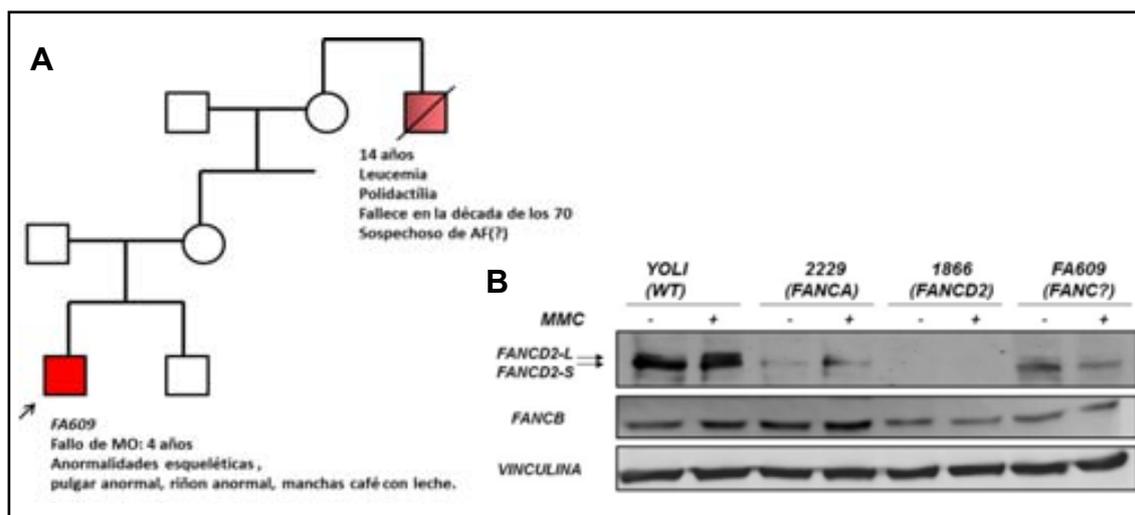


Figura 66. Proceso de subtipaje del paciente FA609. (A) Pedigrí del paciente donde se sugiere haber tenido un hermano de su abuela materna sospechoso de ser afecto de AF. **(B)** WB de FANCD2 y FANCB en fibroblastos primarios del paciente, se evidencia banda de FANCB y FANCD2 no monoubiquitinado.

4.1.2. Implementación de la estrategia del cribado mutacional en *FANCA*

En este caso y dada la particularidad de la población AF española, en donde claramente se identificó un aumento de los pacientes FA-A debido al hecho de la presencia de una mutación fundadora (c.295C>T) en la etnia gitana, se implementó dos estrategias de cribado mutacional para este gen.

Para el caso de la etnia gitana, después de la confirmación del diagnóstico, se realizó una PCR sobre el exón 4 del gen *FANCA* y mediante secuenciación de *Sanger* se hizo el cribado de dicha mutación. En este caso cuando se encontraba la mutación en homocigosis se realiza directamente el subtipaje del paciente. Hasta la fecha se han identificado 23 pacientes AF de esta etnia gitana española y sólo en un paciente AF (FA363), cuyo origen gitano puede ser de otro país, presentaba una delección de los exones 4 a 6 en homocigosis en el gen *FANCA*. Queda pendiente el análisis mutacional de un paciente AF de esta etnia, el cual tiene un ensayo de fragilidad cromosómica positiva con DEB, pero por problemas técnico-logísticos aún no se dispone de muestra de DNA para su análisis mutacional.

Adicionalmente y en paralelo, se identificaron portadores sanos dentro de esta población en riesgo (familiares con alto grado de consanguinidad, ver tabla 35). En uno de los casos se hizo el diagnóstico molecular de un paciente cuyo ensayo de fragilidad cromosómica realizado en un laboratorio externo había resultado negativo (falso negativo).

Etnia Gitana	Mutación	Ensayo de fragilidad cromosómica
21	c.295C>T, homocigosis	Positiva con DEB
1	Delección exones 4-6, homocigosis	Positiva con DEB
1	No había muestra de DNA	Positiva con DEB
5	c.295C>T, heterocigosis	Negativa con DEB

Tabla 35. Cribado de la mutación c.295C>T. Pacientes AF españoles de la etnia gitana, así como de hermanos sanos y/o asintomáticos cribados tanto a nivel citogenético como mutacional durante el periodo 2009 a 2013.

Para el caso de los pacientes de la población española no gitana la estrategia de cribado mutacional resultó ser más laboriosa. Posterior a la realización del subtipaje por complementación con vectores retrovirales de los genes FA comunes (*FANC-A,-C,-D2,-E,-F,-G*), se implementó la estrategia de la MPLA y la PCR/secuenciación de *Sanger* en aquellos pacientes identificados como del

grupo de complementación FA-A. Para el cribado de las mutaciones en *FANCA* se planteó una estrategia de estudio de acuerdo a las mutaciones más frecuentes encontradas (por secuenciación de los exones en donde se localizaban) en la población española no gitana y considerando todas las grandes deleciones como un mismo tipo de mutación ya que se detectan en la misma reacción de MLPA. Por lo tanto en una primera ronda se realizó la MLPA y la PCR/secuenciación de los exones 13, 36 y 38. En las siguientes rondas se continuó con la estrategia de PCR/secuenciación de los exones restantes agrupados de acuerdo al porcentaje de frecuencia en que han sido halladas en la población AF española. Para ello se propuso la realización de 3 rondas más, las cuales agrupaban los exones de acuerdo a este porcentaje de frecuencia. Utilizando esta estrategia para los pacientes FA-A se identificaron la mayor parte de las mutaciones en la primera ronda, seguidas por mutaciones identificadas en la segunda ronda.

Del total de 96 pacientes FA-A no gitanos identificados hasta la fecha, 6 pacientes no se pudieron estudiar por problemas técnico-logísticos, estos pacientes fueron el FA60, FA95, FA96, FA96, FA97, FA97 y FA187. Adicionalmente los pacientes FA 616, FA620 y FA625 están pendientes de recibir muestra para extraer DNA, y el paciente FA409 falleció antes de recibir muestra para extraer DNA. Por otra parte los pacientes FA23 y FA 90 no habían sido analizados mutacionalmente y se inició su estudio con esta serie de pacientes.

Por lo tanto, de los 98 pacientes AF españoles no gitanos analizados mutacionalmente en esta serie, en 7 no fue posible realizar su estudio a nivel mutacional por falta de muestra de DNA y en 3 están pendientes recibir la muestra para su estudio. Finalmente, en 69 de los 88 pacientes FA-A estudiados se identificaron una o las dos mutaciones con la primera ronda (78.4% del total de pacientes). Si lo analizamos por alelos mutados se identificó el 51.1% de las mutaciones (90 mutaciones de los 176 alelos mutados) en la primera ronda. Por el contrario, en esta primera ronda no se identificó ninguna mutación en el 21.6% de los pacientes (19 de los 88 pacientes estudiados). En cuanto a las demás rondas, cabe resaltar que en los pacientes que aún no se ha identificado una o las dos mutaciones quedaron en las diferentes etapas del proceso de estudio. En la tabla 36 se resumen los dos resultados obtenidos por

esta estrategia al final de los dos periodos de tiempo en los que se implementó el análisis mutacional de los pacientes.

Pacientes AF	1ª ronda	2ª ronda	3ª ronda	4ª ronda
54*	62 mutaciones	36 mutaciones	8 mutaciones	0
88**	90 mutaciones	40 mutaciones	9 mutaciones	Pendiente

Tabla 36. Cribado de mutaciones para el gen *FANCA*. Número de mutaciones identificadas en pacientes españoles no gitanos del subtipo FA-A (subtipados por complementación con vectores retrovirales) y analizados mutacionalmente utilizando la estrategia de rondas de la MLPA y la PCR/secuenciación. * Periodo desde 1999 al 2009. ** Periodo desde 1999 a 2013.

En cuanto a las mutaciones identificadas cabe destacar que se encontraron nuevas mutaciones, entre las cuales se destaca la mutación c.4253delT (p.V1418Gfs*15) la cual es claramente patogénica debido a que genera un codón de parada prematuro que trunca la proteína. Adicionalmente se identificaron 4 nuevas grandes deleciones: deleción de los exones 27 a 30 (FA395), deleción de los exones 19 a 22 (FA630), deleción de los exones 25 a 27 (FA537) y deleción de los exones 27 a 30 (FA404).

También se identificaron mutaciones que aun que ya han sido reportadas a nivel mundial no habían sido identificadas en la población AF españolas, tales son los casos de las mutaciones c.258T>A (FA438), c.1164_1165delAG (FA395 y FA404) y c.2233dupT (FA438).

Por otra parte se identificó un segundo paciente con la mutación c.3348+5 G>A y c.3335 T>G (FA434), cuyo estudio de segregación mostró que aunque es una mutación compuesta está en el mismo alelo. Esta mutación compuesta sólo se ha reportado en población AF española.

También es importante resaltar que aunque los cebadores diseñados para la amplificación por PCR de los diferentes exones incluyen entre 15 a 20 pb de las regiones intrónicas flanqueantes (región que incluye las secuencias consenso de reconocimiento de los sitios donantes (5') o aceptores (3') en el proceso de corte y empalme de los exones), existe la posibilidad que se nos estén escapando la identificación de mutaciones intrónicas profundas. Un ejemplo claro se observó en el caso de un paciente FA145, en quien se identificó una mutación de *splicing* en heterocigosis en una posición más profunda a nivel intronico (c.893+920C>A). En este aspecto es importante

resaltar que las mutaciones de *splicing* representaron el 6.5% de las mutaciones identificadas en *FANCA* (9 de las 139 mutaciones identificadas).

Por otra parte, las 139 mutaciones identificadas en la población FA-A no gitana estuvo representada por 57 distintos tipos de mutaciones. Las microinserciones/microdelecciones representaron el 56.1% (78 de las 139 mutaciones), mientras que las grandes delecciones representaron el 18.7% (26 de las 139 mutaciones), y las mutaciones de cambio de base representaron el 18.7% (26 de las 139 mutaciones identificadas).

4.1.2. Incorporación de las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento en el subtipaje de pacientes AF e Identificación de nuevos genes AF

Actualmente con el auge de la secuenciación de alto rendimiento o de nueva generación y su amplia aplicabilidad como herramienta en el diagnóstico molecular de patologías monogénicas con una alta heterogeneidad genética se han venido cambiando las estrategias de subtipaje, como en el caso de la AF que permite el análisis mutacional de todos los genes en paralelo. Actualmente, con la progresiva reducción de costos y la puesta en el mercado de un mayor número de diseños metodológicos, así como el mejoramiento de la eficiencia en la obtención de datos que estas nos proporcionan, estas nuevas tecnologías han permitido rediseñar la estrategia para el subtipaje de los pacientes AF en muchos grupos de trabajo.

En esta dirección nuestro grupo de investigación se ha introducido en la secuenciación de exoma completo con el fin de identificar el gen mutado en dos pacientes en los cuales la estrategia de subtipaje mencionada anteriormente no había arrojado resultados positivos hasta el momento.

Estos dos pacientes que se beneficiaron de esta tecnología fueron el FA104 y FA287, en los cuales se logró finalmente su subtipaje.

Paciente FA104

En cuanto al paciente FA104, en el cual se descartaron los subtipos FA-A,-C,-D2,-E,-F y -G por complementación retroviral, los subtipos FA-D1 y FA-N por la

formación de focos de RAD51 normales, con evidencia de FANCD2-Ub por WB y por secuenciación de Sanger se habían descartado mutaciones en *FANCI*, *FANCP* y *FANCO*. Por lo tanto eran un paciente cuyo gen alterado estaba por debajo del complejo ID y se planteaba como un buen candidato para identificar un nuevo gen AF. Con el proceso de secuenciación del exoma completo llevado a cabo por el servicio de secuenciación de Sistemas Genómicos en Valencia (<https://www.sistemasgenomicos.com/>), se obtuvieron un total de 208'265,974 millones de lecturas, de las cuales el 62.48% eran lecturas emparejadas mapeables y 11.77% eran lecturas no emparejadas mapeables. Se identificaron 24636 SNVs, de los cuales tras su anotación se identificaron 1966 como no descritos. También se identificaron 1139 *indels*, de los cuales 589 (38 *indels* complejos) no estaban descritos. La identificación de genes candidatos que cumplieran con el modelo genético de recesividad de la enfermedad se llevó a cabo de dos formas tomando diferente grupos de datos: una tomando su localización en regiones codificantes y en zonas de *splicing* (96 genes) y la otra tomando su localización en regiones codificantes, en zonas de *splicing*, regiones intrónicas y regiones UTR (258 genes). Luego del filtrado bioinformática se redujeron a sólo 17 genes (tabla no mostrada). De estos genes se seleccionaron los que presentaban un valor de calidad del número de lecturas no redundantes (NRR) ≥ 70 para al menos una de las dos alteraciones. Finalmente quedaron con 5 genes (*ALMS1*, *DHX38*, *DNAH8*, *HAVCR1* y *ERCC4*) de los cuales el gen *ERCC4/FANCO* llamó desde el principio la atención por el conocimiento que se tenía de estar implicado en la ruta. Otros dos genes que llamaron la atención fueron el gen *BRIP1/FANCI* y el gen *FAN1/KIA1018*. Estos genes aparecieron inicialmente dentro de los genes identificados como candidatos y aunque el análisis bioinformático los descartó, eran genes que podían ser buenos candidatos, ya que uno (*BRIP1/FANCI*) era un gen claramente AF y el otro (*FAN1/KIA1018*) estaba en ese momento siendo discutido como posible gen AF. Por lo tanto se decidió validar los datos obtenidos de todos estos genes por secuenciación de Sanger, siendo sólo confirmada en la mayoría de los casos una de las dos alteraciones de estos genes (ver tabla 37). Sólo en el caso del gen *HAVCR1*, se identificaron las dos alteraciones y hubo una correcta segregación, pero después de una búsqueda detallada de información se confirmó que una de las alteraciones era un SNP

ya reportado (rs79176821). Finalmente después de la validación de los datos, sólo en el gen *ERCC4/FANCO* se reconfirmaron las dos alteraciones identificadas (ver tabla 37).

Chr	Posición genómica	Gen	Referencia alélica	Alteración alélica	Tipo de alteración	Tipo de validación	Resultado de validación
2	73675227	<i>ALMS1</i>	-	CTC	NFC	S. Sanger	Confirmado
2	73678183	<i>ALMS1</i>	G	R	NFC	S. Sanger	No confirmado
5	156479444	<i>HAVCR1</i>	TTG	-	SNP: rs79176821	S. Sanger y segregación, LCL revertida	Confirmado y segregación paterna, presente en LCL revertida
5	156479568	<i>HAVCR1</i>	-	GTT	NFC	S. Sanger y segregación, LCL revertida	Confirmado y segregación materna, presente en LCL
6	38840915	<i>DNAH8</i>	A	R	NSC	S. Sanger	Confirmado
6	38879340	<i>DNAH8</i>	A	T	NSC	S. Sanger	No confirmado
15	31197015	<i>FAN1</i>	T	G	SNV	S. Sanger	Confirmado
15	31206160	<i>FAN1</i>	AATGGAA	-	Delección	S. Sanger	No confirmado
16	72137553	<i>DHX38*</i>	C	S	SNV	S. Sanger	No confirmado
16	72142141	<i>DHX38*</i>	A	R	SNV	S. Sanger	Confirmado
16	14029271	<i>ERCC4</i>	AACTC	-	Delección	S. Sanger y segregación, LCL revertida	Confirmado y segregación paterna, ausente en LCL revertida
16	14041518	<i>ERCC4</i>	A	R	SNV	S. Sanger y segregación, LCL revertida	Confirmado y segregación paterna, presente en LCL revertida
17	59760631	<i>BRIP1*</i>	T	A	SNV	S. Sanger	Confirmado
17	59885911	<i>BRIP1*</i>	T	-	Delección	S. Sanger	No confirmado

Tabla 37. Validación de los datos de la secuenciación del exomica completo del FA104. Sólo en los casos de los genes *HAVCR1* y *ERCC4* se identificaron ambas alteraciones y su respectiva segregación, pero sólo en el caso de *ERCC4* se confirmó una tercera mutación en la línea celular lifoblastoide revertida. *Su validación fue hecha en el mismo servicio de secuenciación externa. S: secuenciación, NFC: codón no *frameshift*, NSC: codón no sinónimo, SNP: polimorfismo de único nucleótido, SNV: variante de significado incierto.

En la figura 67 se esquematiza el estudio de segregación, como parte del estudio de la validación mutacional del paciente FA104.

Adicionalmente del paciente FA104 se tenía una línea celular lifoblastoide, inmortalizada por EBV, la cual reversionó espontáneamente su fenotipo de hipersensibilidad a la MMC en cultivos celulares. Esta línea celular (FA104R) sirvió para identificar la mutación reversora en *ERCC4*, una tercera mutación de tipo compensadora. La identificación de una tercera mutación compensadora en el exón 8 del gen *ERCC4* era una confirmación más de la

patogenicidad de la mutación inicial en este gen y su implicación con el fenotipo AF de este paciente (ver figura 68).

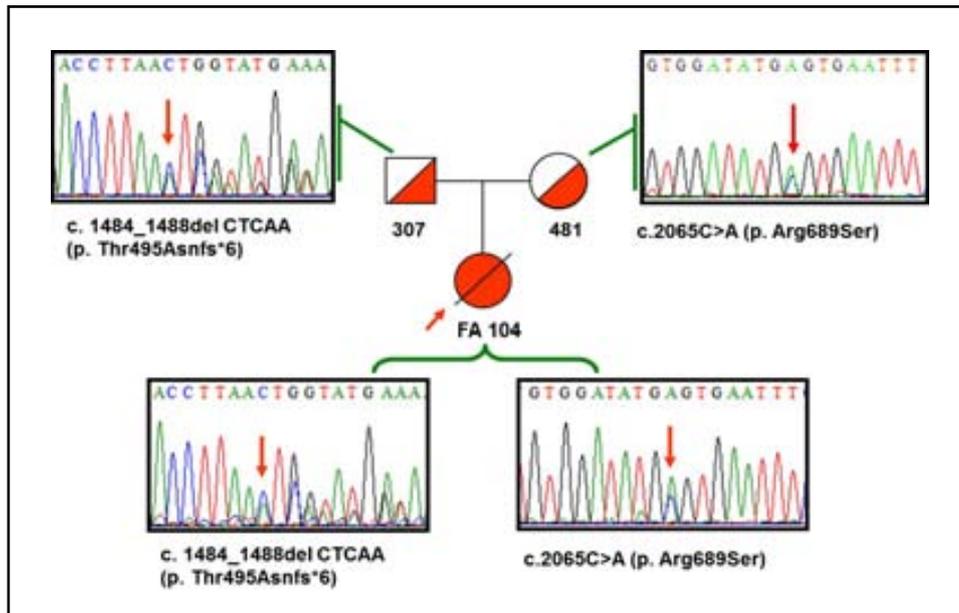


Figura 67. Estudio de segregación del paciente FA104. Este estudio fue realizado en ADN genómico tanto del paciente como de sus padres.

En esta línea celular también se confirmó la presencia del SNP rs79176821 (en el gen *HAVCR1*) y de la persistencia de la mutación en *FAN1*, lo cual confirmaba su no participación en el fenotipo celular AF.

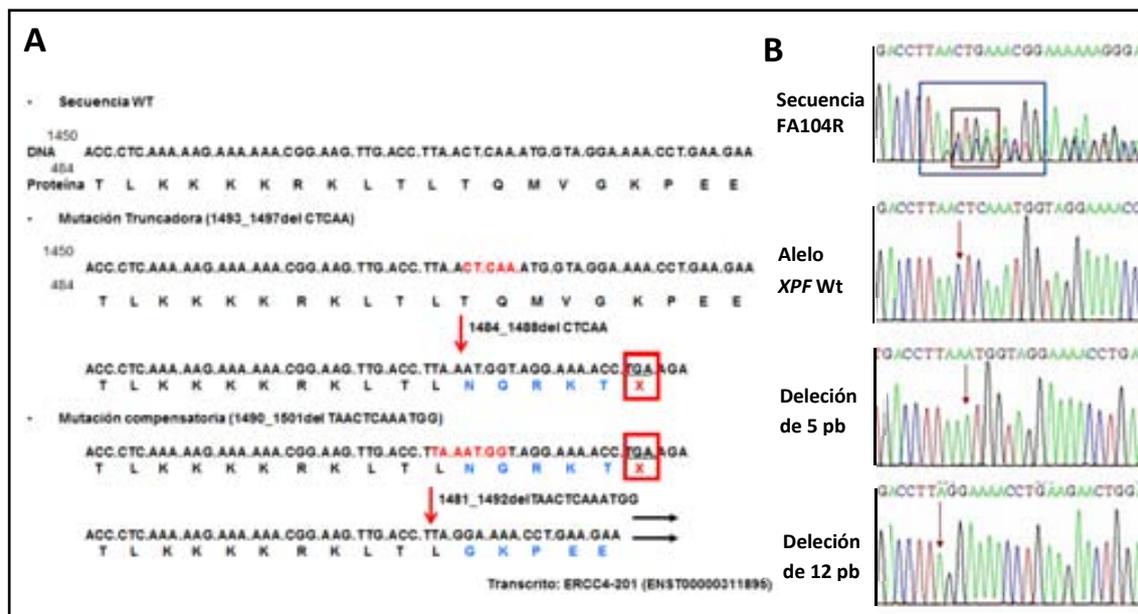


Figura 68. Análisis de la microdelección en el exón 8 del gen XPF en la línea celular FA104R. (A) Análisis de los eventos ocurridos en la mutación y los cambios en el marco de lectura, en la delección de 5 pb se genera un codón de parada y en la mutación compensadora o reversora se cambia el marco de lectura y desaparece el codón de parada prematura. (B) Análisis de los diferentes alelos mediante clonaje alelo específico de la mutación.

Con respecto a la historia clínica de este paciente, mostraba un cuadro clásico de AF, con múltiples malformaciones congénitas (como orejas dismórficas de implantación baja, microsomía, ano anterior, agenesia bilateral de pulgares e hipotiroidismo) enmarcado dentro de una asociación VACTERL, con un ensayo de fragilidad cromosómica por DEB positivo y sin síntomas reportados de fotosensibilidad, quien debutó con alteraciones hematológicas a los 2 años de edad y evolucionó en 2 años a aplasia medular con afectación de las tres series hematológicas. Por la evolución de su patología se decidió trasplantar de donante no emparentado y finalmente falleció en el transcurso del trasplante por un shock hemorrágico. Entre sus antecedentes familiares cabe destacar que por vía paterna, tenía dos tíos de su padre (hermanos de su abuelo) que padecieron de cáncer. Uno de ellos presentó un carcinoma de cabeza y cuello a los 40 años y el otro presentó un cáncer hepático no especificado a la edad de 60 años. Adicionalmente parece ser que su bisabuelo fallecido a edad temprana de cáncer de riñón.

Tratar de correlacionar un gen implicado en patologías distintas como era el caso de *ERCC4* (Xeroderma pigmentoso y Síndrome progeriodes XFE) en un paciente que no presentaba dicha clínica resultaba todo un reto. Sin embargo, el hecho de que este paciente presentaba una clínica típica de AF enmarcada dentro de una asociación VACTERL, así como de tener unos antecedentes familiares de cáncer de cabeza y cuello hacía no dudar del diagnóstico. Además ya existía en la literatura algunos estudios publicados que indicaban que modelos murinos con mutaciones en el gen *ERCC1*, gen socio de *XPF*, debutaban con aplasia medular clínicamente similar a un paciente AF (Prasher et al., 2005).

Paciente FA287

En cuanto al paciente FA287 era un paciente en el cual se habían descartado los grupos de complementación FA-A,-C,-D2,-E,-F y -G por complementación retroviral, con normal FANCD2-Ub por WB y por expresión proteica en WB y/o secuenciación se habían descartado FA-J, -D1 y -N. Por lo tanto se trataba de un paciente cuyo gen alterado estaba por debajo del complejo ID y como se habían descartado la mayoría de genes AF se manejaba la hipótesis que fuera

la alteración de un nuevo gen AF la responsable de su fenotipo clínico. Es así como se decidió realizar el análisis mutacional de este paciente por secuenciación del exoma completo llevado a cabo por la empresa de secuenciación de Sistemas Genómicos (<https://www.sistemasgenomicos.com/>). Entre los resultados que se obtuvieron figura un total de 367.775.686 millones de lecturas, de las cuales el 69.20% eran lecturas emparejadas mapeables y 7.85% eran lecturas no emparejadas mapeables. Se identificaron 24253 SNVs, de los cuales tras su anotación se identificaron 1482 como no descritos. También se identificaron 1250 indels, de los cuales 662 (32 *indels* complejos) no estaban descritos. La identificación de genes candidatos que cumplieran con el modelo genético de recesividad de la enfermedad se llevó a cabo de dos formas tomando diferentes grupos de datos: una tomando su localización en regiones codificantes y en zonas de *splicing* (82 genes) y la otra tomando su localización en regiones codificantes, en zonas de *splicing*, regiones intrónicas y regiones UTR (198 genes). Dentro de estos 198 genes identificados figuraban 4 genes con función helicasa (*BRIP1*, *CHD5*, *HLTF* y *SKIV2L*) y 2 genes ubiquitina ligasa E3 (*UBR4* y *HUWE1*) (tabla no mostrada). Sin embargo, desde el principio llamó la atención el gen *BRIP1/FANCI* ya que se trataba de un gen AF y el paciente tenía importantes antecedentes familiares de cáncer familiar y/o hereditario, como se comentará más adelante. Por lo tanto, se enfocó todo el trabajo de validación en este gen. La validación de los datos obtenidos se hizo por secuenciación de Sanger, confirmándose ambas alteraciones. Adicionalmente el estudio de segregación mostró la segregación de una mutación diferente de cada uno de sus padres. En paralelo se identificó uno de sus hermanos sanos como portador de sólo una de las dos mutaciones (ver figura 69). De esta manera se confirmó que este era un gen alterado en este paciente y no hubo la necesidad de seguir analizando los demás genes.

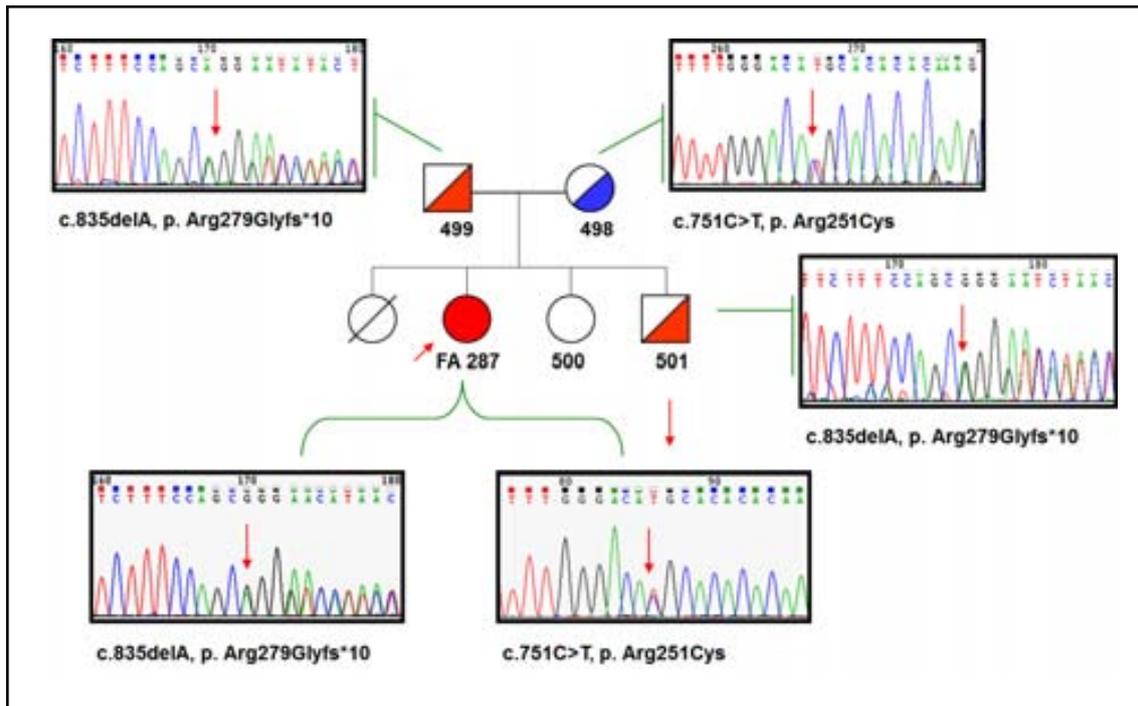


Figura 69. Estudio de segregación del paciente FA287. Este estudio fue realizado en DNA genómico tanto del paciente como de sus padres y hermanos.

Con respecto a la historia clínica de este paciente, resultó bastante interesante tanto su fenotipo clínico como sus antecedentes familiares de cáncer. Estos dos aspectos serán comentados a continuación de manera separada.

Análisis del fenotipo clínico del paciente FA287 y otros pacientes FA-J

El paciente FA287 resultó ser un caso interesante de analizar por su fenotipo clínico atípico comparado con el de los otros pacientes FA-J reportados.

Este paciente nació el 31 de Diciembre de 1970, hijo de padres no consanguíneos y durante toda su vida ha estado prácticamente asintomático. No tiene ninguna anomalía somática ni orgánica detectada hasta ahora, salvo una corta estatura reportada.

Actualmente tiene 42 años y su evolución clínica ha sido bastante estable. Fue por primera vez a la consulta médica especializada cuando ya tenía 19 años de edad, momento en el que se documentó una pancitopenia leve con una anemia macrocítica. Inicialmente se creyó que se trataba de una hepatopatía y/o mielodisplasia incipiente. Sin embargo ante la sospecha de AF se confirmó el diagnóstico con un ensayo de fragilidad cromosómica por DEB que dio positivo, el 20 de Julio de 2004, ensayo llevado a cabo por el laboratorio del hospital de

referencia de ese momento. El ensayo de fragilidad con DEB en SP mostró un número de 1.55 roturas/célula y se observaron imágenes radiales en las metafases. Posteriormente en el CIEMAT mientras se descartaban los grupos de complementación más comunes se observó que los linfocitos de SP mostraban una alta sensibilidad a la MMC. Posteriormente en nuestro laboratorio se reconfirmo el resultado del ensayo de fragilidad cromosómica por DEB, el 26 de Octubre del 2009, y se descartó mosaicismo en linfocitos T (72% de CA). Finalmente, como ya se mencionó anteriormente este paciente fue subtipado como FA-J por secuenciación del exoma completo en el 2011.

Durante todos estos años ha mantenido cifras hematológicas estables, prácticamente iguales que al principio, sin recibir ningún tipo de tratamiento. Tiene varios análisis de médulas ósea a lo largo de estos años, todas ellos con leve hipocelularidad, blastos en cuantía normal y con mastocitosis asociada.

Este cuadro clínico hematológico suave y estable fue uno de los factores que no permitieron sospechar desde el inicio en FANCI como causante de su patología, ya que las publicaciones hechas sobre los fenotipos clínicos de estos pacientes hasta ese momento describían una clínica más agresiva a nivel hematológico. Por lo que al lograr subtipar este paciente y analizar su fenotipo nos llevó a hipotetizar que en este subtipo de pacientes existen dos tipos de fenotipo hematológico, uno en el cual dado por la naturaleza de las mutaciones se presenta más agresivo a nivel hematológico y otro en el cual las mutaciones no tienen un mayor impacto para ciertas funciones de la proteína y generan una disfunción hematológica leve y estable. Con el fin de indagar más en esta hipótesis nos pusimos en contacto con otros investigadores quienes tenían casos de pacientes FA-J, encontrando tres casos más con una clínica hematológica similar (ver tabla 38).

Interesantemente, uno de estos pacientes presenta una de las dos mutaciones de nuestro paciente (p.Arg251Cys), otro paciente presenta una mutación (p.Gln255His) en el mismo dominio de la proteína de nuestro paciente (Dominio Ia) (ver figura 70). El primer paciente mencionado (paciente estudiando en el *Rockefeller Institute in New York, USA*) fue diagnosticado a los 2 años de edad, debutó con sintomatología hematológica a los 13 años, presentó durante su vida adulta un cáncer de células escamosas y finalmente falleció a los 49 años.

El otro paciente fue estudiado en el Reino Unido, aunque no se sabe su origen ancestral, ni sus antecedentes ya que viene de un proceso de adopción. Este paciente presenta unas facies características, con manchas café con leche y una corta estatura. Actualmente está vivo con una aplasia medular leve y estable, (ver tabla 38). Adicionalmente, en el mismo grupo del Reino Unido habían estudiado un paciente de origen argentino quien también presentaba dos mutaciones de cambio de base en dominios proteicos diferentes a la de los anteriores pacientes (dominio III+IV y IV respectivamente para cada mutación, ilustrado en la figura 70), pero quien al día de hoy tiene 32 años y está clínicamente asintomático. Este paciente desarrolló una aplasia medular leve a moderada y desde hace 24 años recibe manejo médico con Oximetolona y se mantiene clínicamente estable. Entre sus antecedentes familiares figura cáncer por la rama paterna (ver tabla 38).

Por otra parte tenemos en nuestro registro de pacientes AF españoles 3 pacientes FA-J, cuyas mutaciones ya han sido identificadas. Dos de estos pacientes han debutado súbitamente con una sintomatología hematológica de moderada a severa hasta llevarlos a la muerte, uno de ellos falleció de una neumonía nosocomial a los 39 años y el otro post-trasplante de MO por EICH hepática y cardíaca a los 28 años. El otro paciente es más joven, con 12 años de edad, a quien se le identificó una LMA el 24 de Septiembre del 2008 por lo cual fue sometido a TPH de CU el 17 de Noviembre del 2008 y actualmente presenta trombocitopenia leve y macrocitosis sin requerir tratamiento.

Por lo tanto si analizamos esta cohorte de 7 pacientes se puede identificar dos tipos de fenotipo hematológico: un fenotipo suave y un fenotipo severo. Al agrupar estos pacientes por el fenotipo e intentar hacer una correlación fenotipo-genotipo se observó que en los pacientes con fenotipo suave (4 pacientes) había una mayor prevalencia de mutaciones de cambio de base. De estos 4 pacientes (8 alelos mutados), 4 mutaciones estaban localizadas en el dominio **Ia** de la proteína de las cuales 3 eran de cambio de base y estaban presentes en 3 de los 4 pacientes (ver tabla 38). En cuanto al cuarto paciente, presenta dos mutaciones de cambio de base, una de ellas presente también en dos paciente con un fenotipo severo (p.Trp647Cys), por lo cual se piensa que la mutación responsable del fenotipo suave era la otra mutación (p.Arg707Cys) localizada en el dominio IV (ver figura 81).

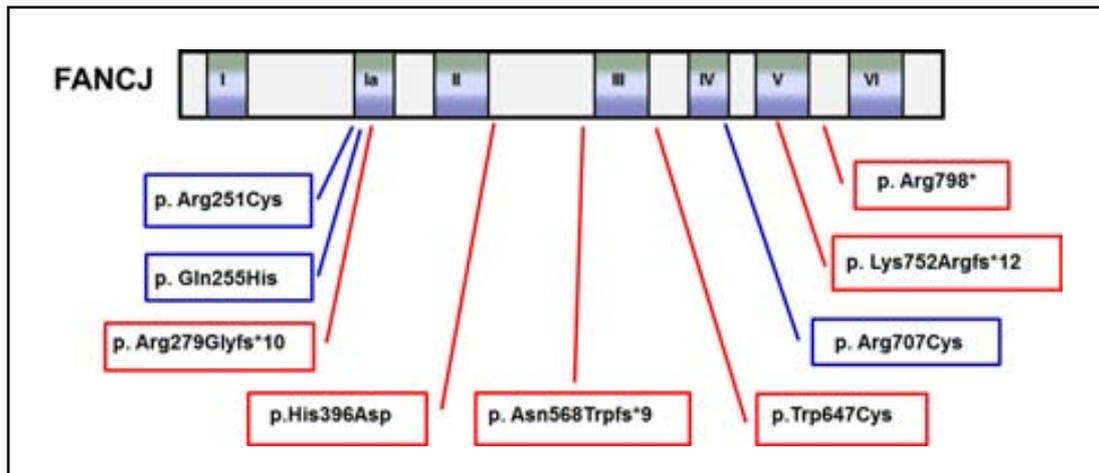


Figura 70. Mutaciones a nivel proteico de pacientes FA-J. Localización de las diferentes mutaciones en las diferentes regiones y dominios de la proteína FANCI. Las mutaciones en azul son hipotetizadas como hipomórficas presentes en pacientes con un fenotipo hematológico suave.

Finalmente hipotetizamos que estas mutaciones de cambio de base presentes en estos pacientes con fenotipo hematológico suave deben ser mutaciones hipomórficas que generan alelos con funcionalidad reducida, y por lo tanto, los cuadros clínicos de estos pacientes reflejan la funcionalidad parcial de la proteína. Por otra parte los pacientes con fenotipo hematológico severo presentaban al menos una, sino ambas mutaciones de tipo truncador, lo cual probablemente sea la causa responsable de la severidad de su clínica hematológica (ver tabla 38).

Paciente	Origen/etnia	Fecha Nacimiento	Sexo	Estado	Mutación	Proteína	Clínica	Antecedentes/Cáncer
VU0776	Argentina	23/11/1987	M	Vivo	c.1941G>C	p. Trp647Cys	Talla baja, riñón hipoplásico. Debutó con aplasia medular moderada a los 5 años, manejado con oximetazona desde hace 24 años. Actualmente hematológicamente estable.	Rama paterna: Abuela cáncer de mama. Tío cáncer de colon. Tío cáncer de esófago.
					c.2119C>T	p.Arg707Cys		
VU1192	Incierta	09/1967	F	Vivo	c.765G>T	p. Gln255His	Talla baja, manchas café con leche y anomalías de los pulgares. No mosaicismo. Tiene dos hijos, durante su segundo embarazo, debutó con trombocitopenia a los 28 años. Actualmente hematológicamente estable sin tratamiento.	No se conoce ningún antecedente familiar ya que viene de un proceso de adopción. A los 37 años desarrolla un carcinoma de cabeza y cuello.
					c.2255_2256delAA	p. Lys752Argfs*12		
NY_FAJ	USA	?	?	Exitus	c.751C>T	p. Arg251Cys	Malformaciones congénitas no especificadas. No mosaicismo. Debutó con aplasia medular moderada a los 13 años sin requerir tratamiento.	Desarrolló en la edad adulta un SSC y falleció a los 49 años.
					c.1186C>G	p.His396Asp		
FA287	Español	31/12/70	F	Vivo	c.751C>T	p. Arg251Cys	Talla baja, sin malformaciones. No mosaicismo. Debutó con una aplasia medular leve a los 19 años sin requerir tratamiento. Actualmente sigue hematológicamente estable.	Cáncer familiar y /o hereditario por ambas ramas incluyendo a sus dos padres (ver figura árbol genealógico)
					c.835delA	p. Arg279Glyfs*10		
FA69	Español	1974	M	Exitus	c.1702_1703delAA	p. Asn568Trpfs*9	Pabellón auricular bilobulado, agenesia renal izquierda y sindáctila de 2 y 3 dedos de pies. Evolución progresiva hacia aplasia medular afectando a las tres series en 8 años. TPH de donante no emparentado en marzo de 2002, presentando EICH hepática y cutánea.	Padre con hipogenesia renal. Hermano con AF FA72.
					c.1941G>T	p. Trp647Cys		

							Falleció a los 4 meses post-trasplante por Shock séptico.	
FA72	Español	1965	F	Exitus	c.1702_1703delAA	p. Asn568Trpfs*9	Fallece a los 39 años el 10/10/04 por neumonía nosocomial.	Padre con hipogenesia renal. Hermana con AF FA69.
					c.1941G>T	p. Trp647Cys		
FA177	Español	06/12/99	M	Vivo	c.2392C>T	p. Arg798*	Facies características, talla baja, manchas café con leche, riñón en herradura, hipoplasia 1 metacarpio de ambas manos, onfalocele, hipogonadismo e hipotiroidismo, debuto a los 3 años con aplasia medular moderada. TPH de CU el 17 de Noviembre del 2008. Actualmente presenta trombopenia leve y macrocitosis sin tratamiento.	No hay antecedentes relevantes.
					c.2392C>T	p. Arg798*		

Tabla 38. Descripción clínica y mutacional de la cohorte de pacientes FA-J analizados. Se observan claramente dos tipos de mutaciones de cambio de base que no altera la longitud de la proteína (como la mutación c.751C>T, p. Arg251Cys) y otra que genera una proteína truncada (como la mutación c.2392C>T, p.Arg798*).

Análisis de la predisposición a cáncer en la familia del paciente FA287

El paciente FA287 resultó ser un caso interesante no solo por su cuadro clínico hematológico suave, sino por sus antecedentes de cáncer familiar y/o hereditario. Gracias a la buena anamnesis clínica que se realizó en este paciente se pudo elaborar un pedigrí bastante completo de 4 generaciones en las cuales se observó una alta incidencia de cáncer en esta familia, tanto por la rama materna como paterna. Su árbol genealógico, esquematizado en la figura 71, ya estaba indicando que podía ser un gen de susceptibilidad a cáncer. El análisis del pedigrí de esta familia permitió identificar varios casos de cáncer, incluso algunos del mismo tipo (cáncer de próstata), y un caso de presentación a muy temprana edad (cáncer cervical a los 33 años). También es importante resaltar que en esta familia había individuos que tuvieron más de un tumor primario, o que además del cáncer presentaban defectos del desarrollo o malformaciones congénitas (ver figura 71). Desafortunadamente el cribado de las mutaciones causales de la enfermedad solo se pudo realizar en sus padres y hermanos, ya que algunos de los familiares ya estaban fallecidos y los otros no se pudieron localizar. Adicionalmente no se logró conseguir muestras de tumor de los individuos afectados y la colaboración clínica en este aspecto fue pobre.

De todas formas cabe destacar que el gen *FANCI/BRIP1/BACH1* ha sido descrito e identificado en diferentes formas de cáncer hereditario entre los que se destacan el cáncer de mama, de ovario y de próstata y algún caso de cáncer cervical. De tal manera que la identificación del gen responsable de la enfermedad en esta familia con una alta incidencia de cánceres nos lleva a sugerir con una alta probabilidad que al menos la mayoría de los casos presentes de estos tipos de cáncer son consecuencia de la alteración genética de este gen. Adicionalmente, también se ha demostrado en múltiples publicaciones una interacción funcional entre este gen y *MLH1*, así como la implicación del sistema de reparación MMR en la ruta FA/BRCA (Hiom, 2010). Aunque está clara la implicación de *MLH1* en cáncer colorectal, su papel en la reparación de ICLs no se ha podido aclarar. Por lo tanto la presencia de los diferentes casos de cáncer de colon, recto, riñón, pulmón e incluso el mismo linfoma podrían ser un indicio de los efectos patogénicos de estas mutaciones

en *FANCJ/BRIP1/BACH1* causadas por la disfunción en la interacción de las rutas FA/BRCA y MMR. Sin embargo, la falta del material biológico no ha permitido confirmar la implicación de estas mutaciones de *FANCJ/BRIP1/BACH1* en los casos de cáncer de esta familia.

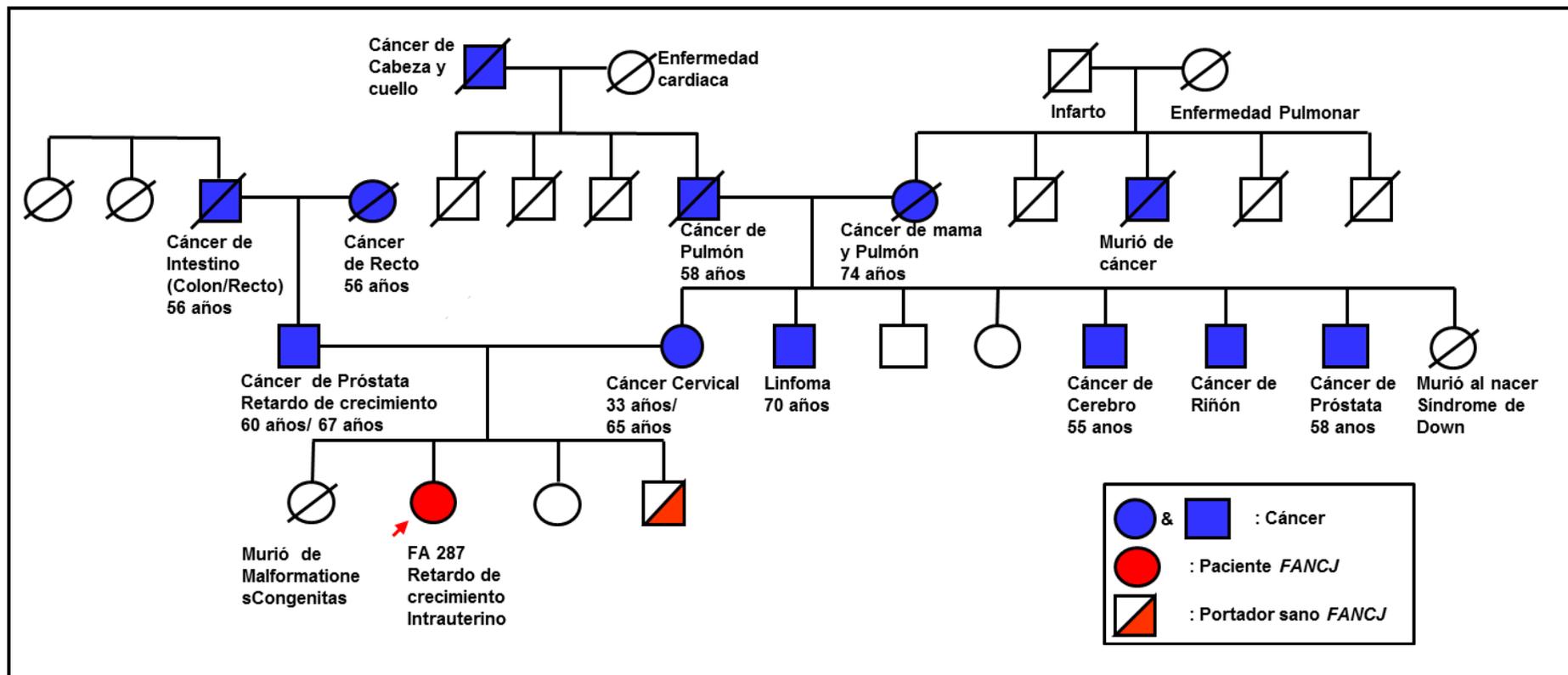


Figura 71. Pedigrí del paciente FA287. Es notorio el número de casos de cáncer tanto por la rama paterna como materna, así como la diversidad de tipos de cáncer presentes.

4.2. ESTUDIO MUTACIONAL DE PACIENTES AF NO ESPAÑOLES

4.2.1. Implementación de la estrategia de 4 rondas para el cribado mutacional en *FANCA* en pacientes AF de algunos países americanos

En este caso se trabajó con pacientes AF cuya confirmación citogenética se realizó por diferentes servicios de citogenética de distintos países y que deseaban poder hacer el subtipaje y la caracterización molecular de sus pacientes. El principal inconveniente que se tuvo en este proyecto fue que solo disponíamos de DNA para para alcanzar el objetivo y de este una muestra limitada, por lo cual teniendo en cuenta que la mayoría de pacientes AF son FA-A y que existen unos lazos históricos migratorios entre estos países y España se decidió implementar la estrategia de cribado de la población española para este gen.

Se inició el estudio mutacional de pacientes AF de varios países americanos, entre los cuales se destacaban México, Argentina, Colombia y Uruguay, y con un menor número pacientes estudiados, Guatemala, Venezuela y Ecuador (ver tabla 39).

Pacientes AF	1ª ronda	2ª ronda	3ª ronda	4ª ronda
15 Mexicanos	5 mutaciones	--	Pendiente	
11 Argentinos	4 mutaciones	--	Pendiente	
4 Uruguayos	--	En curso	Pendiente	
5 Colombianos	4 mutaciones	1 mutación	Pendiente	
1 Guatemalteco*	--	2 mutaciones	--	--
1 Venezolano*	1 mutación	1 mutación	--	--
1 Ecuatoriano*	--	En curso		

Tabla 39. Cribado de mutaciones para el gen *FANCA* en pacientes AF no españoles. Cribado mutacional mediante la estrategia de 4 rondas de PCR/secuenciación y MLPA. *Pacientes subtipados como del grupo FA-A.

Cabe destacar que algunos de los pacientes de estos países americanos fueron atendidos por el Servicio nacional de salud español el cual los incorporo al programa de manejo y estudio de la Red Nacional Fanconi de España (2 pacientes colombianos y los pacientes de Guatemala, Ecuador y Venezuela).

En el total de pacientes analizados para la primera ronda hay que resaltar la identificación de dos mutaciones nuevas, ambas se hicieron en pacientes mexicanos y se trataban de grandes deleciones (duplicación de los exones 28 a 29 en homocigosis y deleción de los exones 41 a 42 en homocigosis). En esta serie de pacientes no se ha podido continuar el estudio porque la muestra de DNA se han agotado o porque han llegado hace poco y no ha habido tiempo para continuar con el proceso. De todos modos, en su mayoría todos los pacientes se analizaron hasta la segunda ronda. En este proceso de análisis mutacional se observó un número mayor de mutaciones identificadas en la primera ronda. En el total de los 38 pacientes americanos se identificaron 14 mutaciones, con lo cual se puede dar como muy probables pacientes FA-A. En esta población de pacientes ya con la segunda ronda se hizo el subtipaje completo de 6 pacientes, dos pacientes colombianos (FA374 y FA178), uno venezolano (FA153), dos mexicanos (TRA y OGAA) y uno guatemalteco (FA330).

Familia argentina con varios individuos afectados con el subtipo FA-B

Dentro de la serie de pacientes AF argentinos recibidos para su análisis mutacional se identificó un paciente masculino con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X (paciente I en la figura 72). Por lo cual los médicos estaban pensando en el gen *FANCB* pero no lo habían podido confirmar el subtipo del paciente. Lo primero que se hizo con la llegada de la muestra, fue analizar el árbol genealógico, con lo cual se decidió enviar el DNA a secuenciar para *FANCB* en el laboratorio del Dr. Detlev Schindler de la Universidad de Würzburg (Alemania), encontrando una mutación en hemocigosis en el exón 11 (c.2268delT, no reportada antes). Esta mutación generaba un codón de parada prematura que truncaba la proteína (p.Ile756Metfs*12), lo cual no dejó duda de su patogenicidad.

Por lo tanto se enfocó el trabajo a revisar el árbol genealógico de este paciente y después de varias correcciones y aclaraciones del pedigrí se logró identificar 4 pacientes más afectados por AF (todos de sexo masculino, dos ya fallecidos), así como las mujeres que eran portadoras obligadas y otras posibles portadoras de la mutación (ver figura 72). Con la colaboración de nuestro

investigador de contacto de Argentina se recibieron muestras de DNA de casi todos los individuos de interés y se realizó el cribado de esta mutación en todas las muestras recibidas. Al final de este cribado se confirmó la mutación en otro de los paciente (paciente II de la figura 72). Adicionalmente se identificaron 9 mujeres portadoras de la mutación en heterocigosis, de las cuales 6 estaban en edad fértil y dos de ellas estaban en estado de embarazo en ese momento. Por otra parte por falta de muestras de DNA se quedaron pendientes de cribado otras 6 mujeres (ver figura 72).

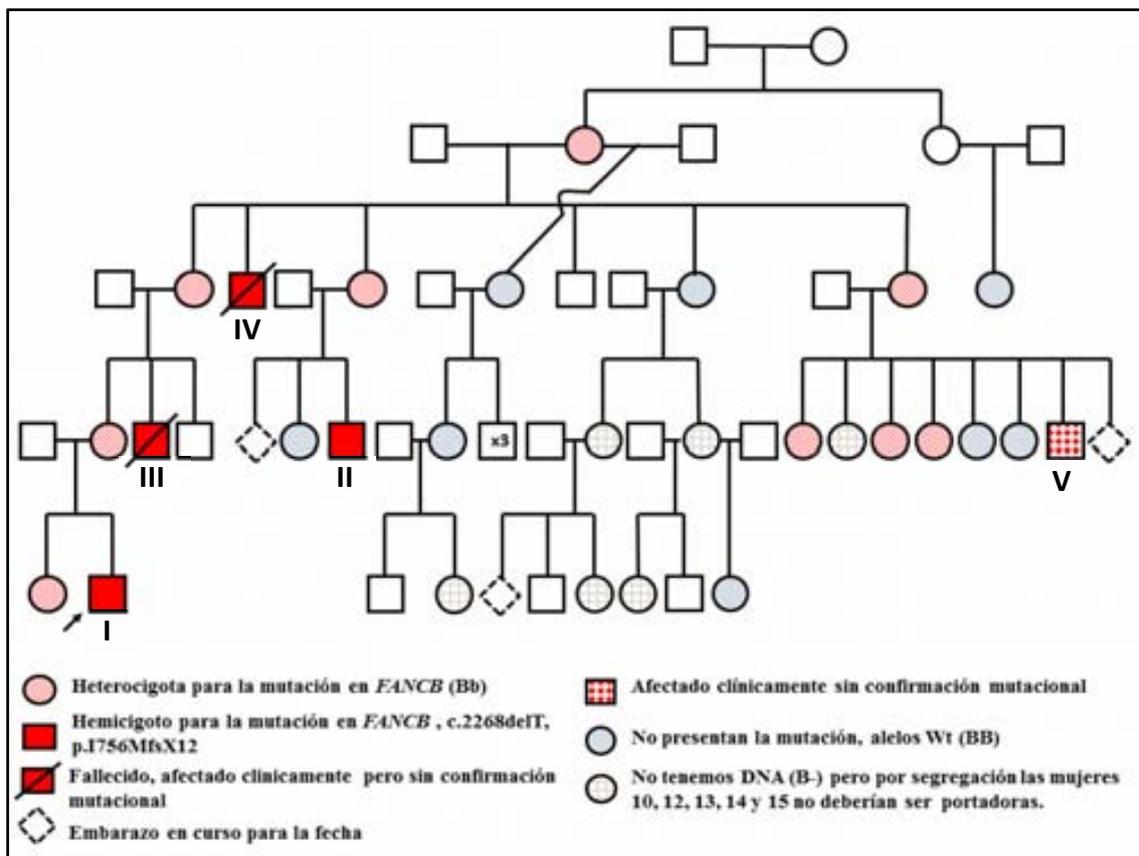


Figura 72. Pedigrí de la familia del paciente HA04 realizado en Febrero del 2011. El x3 se refiere a que son 3 hermanos. La flecha indica el caso probando.

Cabe destacar que en este caso no sólo se realizó la confirmación de los pacientes sino también se hizo la identificación de mujeres portadoras sanas. Confirmar a las mujeres portadoras es muy importante, ya que estas presentan un riesgo de 50% de tener un hijo varón afectado de AF. Por lo cual, se envió el informe mutacional al grupo de colaboración argentino oportunamente esperado que con los resultados se haya hecho un consejo genético adecuado en las mujeres portadoras, en especial en las que estaban embarazadas, con

el fin de seguir una conducta clínica de acuerdo a la decisión tomada por cada familia y futura planeación de embarazos con diagnóstico prenatal o preimplantacional para evitar nuevos casos de AF.

En cuanto al fenotipo clínico del caso probando llamó la atención el tipo de las malformaciones que presentaba. Se trataba de un paciente de 1 año de edad (paciente I en la figura 72), primer hijo de pareja no consanguínea, quien presentó polihidramnios durante la gestación y fue intervenido quirúrgicamente a las 3 horas de vida por una fístula traqueo esofágica con complicaciones postquirúrgicas e infecciones respiratorias a repetición. Como malformaciones asociadas presentaba una comunicación interauricular, agenesia renal izquierda, ventriculomegalía del sistema nervio central y anemia. Además presentaba un retraso de crecimiento, microcefalia, microtía bilateral asimétrica, hipoacusia conductiva bilateral, mano derecha con pulgar de implantación proximal, mano izquierda con pulgar bífido, máculas hiperpigmentadas en glúteo y muslo izquierdo. En resumen se trataba de un fenotipo tipo asociación VACTERL con hidrocefalia (VACTERL-H).

En cuanto a los otros 4 pacientes, no están tan bien descritos como el probando pero parece no tener este mismo fenotipo.

El paciente II se trataba de un individuo de 4 años de vida al momento de realizar el pedigrí (ver figura 72), segundo hijo de pareja no consanguínea. Durante el embarazo presento retraso del crecimiento intrauterino del quinto mes, con amenaza de parto prematuro. Nació con baja talla y microcefalia. Al examen físico también presentaba manos con pulgares asimétricos y de implantación proximal.

En cuanto a los dos pacientes fallecidos, desafortunadamente no fueron evaluados en el hospital del sitio de colaboración y su información no está muy completa. En el caso del paciente III, presentaba una cardiopatía, polidactilia preaxial y retraso de crecimiento severo y falleció a los 11 meses de vida. En el caso del paciente IV, presentaba una baja talla y agenesia bilateral de pulgar y falleció a los 22 años de vida por una leucemia linfocítica aguda.

Por otra parte el paciente V, presentaba un pulgar bífido, retraso del crecimiento, un retraso en el desarrollo sexual y una anemia. Sin embargo cabe resaltar que este paciente no estaba asistiendo a controles ya que no quiso aceptar su patología.

Ahora bien, como ya teníamos suficientes muestras de DNA de esta familia, tanto de los dos pacientes como de 9 portadoras identificadas se propuso hacer un análisis molecular de la inactivación del alelo X, tal como se realizó en otros estudios con este subtipo de pacientes para confirmar si la ausencia de la enfermedad en estas mujeres portadoras se debía a la inactivación sesgada del alelo mutado. Al diseñar el estudio, la principal dificultad estuvo en la distancia que había entre la mutación encontrada (estaba al final del gen) y la única isla *GpC* (región susceptible de silenciamiento por metilación ubicada en la región promotora del gen). Por lo tanto lo primero que se realizó fue un cribado de toda la región adyacente a esta región en busca de un polimorfismo (SNP) ligado al alelo mutado que nos permitiese servir de marcador molecular para realizar este estudio. Para este primer cribado se analizaron los dos pacientes disponibles (muestras 1 y 7 de la figura 73), dos mujeres portadoras sanas (muestras 4 y 5 de la figura 73) y dos mujeres sanas no portadoras de la mutación (muestras 6 y 9b de la figura 73).

Se hizo un cribado de una región bastante exhaustiva desde la región promotora del gen hasta el inicio del exón 3, de proximal a distal con respecto a la isla *CpG*. Debido a que los polimorfismo que se habían encontrado hasta el momento no mostraban estar ligados al alelo mutado se continuó el cribado hasta encontrar un SNP adecuado, siendo al final de esta región donde se identificó un SNP que mostraba estar presente tanto en los dos pacientes como en los portadores usados para este cribado inicial (ver tabla 40). De la mayoría de SNPs (9 SNPs, datos no mostrados) encontrados, sólo en uno se identificó una segregación idéntica tanto en los dos pacientes FA-B como en la mayoría de portadoras sanas (ver figura 73, por lo cual los demás SNPs fueron descartados (datos no mostrados).

SNP	Alelo	Región	Frecuencia	Homocigoto	Heterocigoto	Hemocigoto	No presente
rs2285490	G/T	Promotor	G=0.461/765	4, 5, 9, 10, 13, 17, 18.	Ninguno	1,7.	2, 3, 6, 8, 11, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22.
rs35864635	-/C	Intrón	ND	4, 5, 10, 13, 17, 18.	8, 15	1 heterocigoto diferente a 7	1, 2, 3, 6, 7, 14, 16, 19.
rs11523109 4	C/T	Intrón	C=0.019/32	3, 14, 18.	4, 5, 8, 9b, 13, 15,	1 heterocigoto diferente a 7	6, 16, 19.
rs5935816	A/G	Intrón	A=0.450/747	18, 20, 21.	2, 3, 4, 5, 8b, 11, 17, 23.	1, 7.	6, 9b.

Tabla 40. Polimorfismo que resultaron más relevantes durante el cribado de un marcador del alelo mutante. En total se identificaron 9 polimorfismos, de los cuales sólo se describen los que tuvieron más relevancia en los individuos estudiados, por su identificación en heterocigosis en varios de ellos. Los números corresponden al código asignado a cada individuo en el pedigrí de la figura 73.

Finalmente se hizo la identificación del SNP rs5935816 ligado al alelo mutado en la mayoría de las portadoras, tal como se muestra en la figura 73. Cabe destacar que los individuos 18, 20 y 21 no resultaron ser portadores de este SNP, posiblemente debido a algún evento de recombinación que haya implicado esta región. No se dedicó esfuerzo alguno para identificar este posible evento de recombinación para no desviarnos del objetivo final.

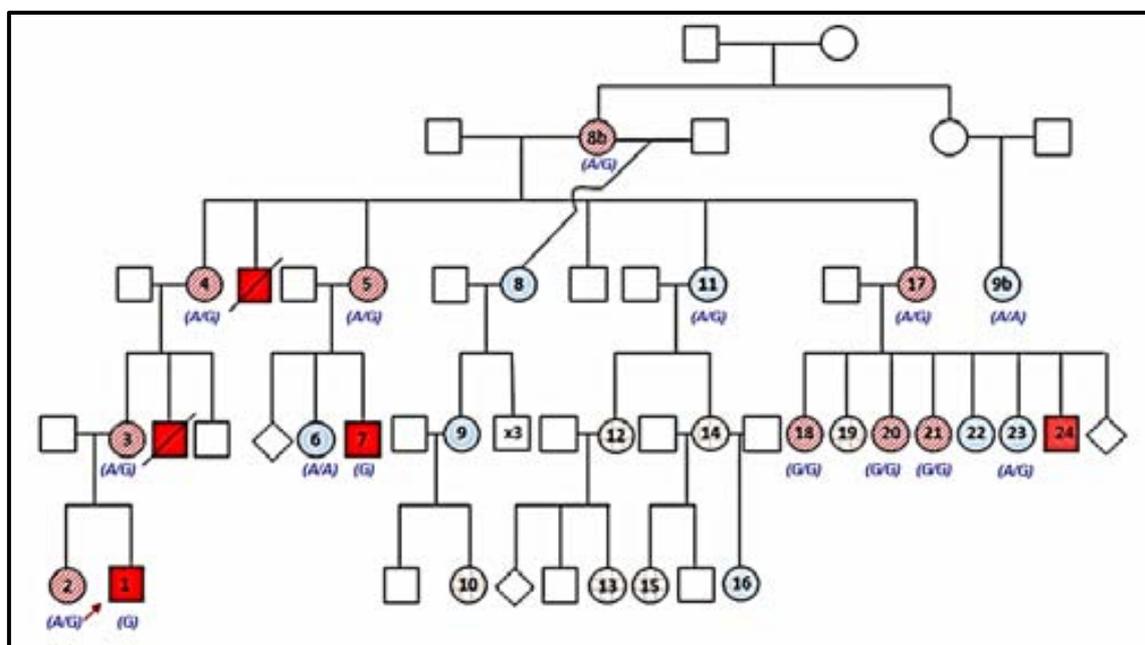


Figura 73. Individuos cribados para el SNP rs5935816 (A/G). Sólo tres de las 9 portadoras no resultaron heterocigotas para este SNP y por lo cual no se pudieron estudiar por el ensayo de inactivación del cromosoma X.

Este SNP se encontraba relativamente cerca de la región promotora, lo cual facilitó su uso como marcador de alelo mutado en el ensayo de análisis de inactivación del cromosoma X.

Una vez identificado el marcado molecular ligado al alelo mutado, se procedió al estudio del patrón de inactivación del alelo en el cromosoma X. En este caso, por medio de un ensayo de digestión con una enzima de restricción dependiente de metilación se hizo la digestión del DNA genómico de los dos pacientes FA-B y de los 6 portadores que presentaban el SNP en heterocigosis, así como del individuo no portador de la mutación que también presenta el SNP en heterocigosis. Luego de confirmar la digestión del DNA, se procedió a realizar la amplificación de la región de interés utilizando la estrategia de la PCR anidada con el fin de amplificar solo el alelo no digerido y de esta manera identificar el alelo sujeto de inactivación. Básicamente lo que se hizo después de someter a digestión las diferentes muestras de DNA genómico fue hacer una PCR robusta que incluía la región promotora (con su isla CpG y la región del marcador de interés. De la banda amplificada de esta PCR se reamplificó sólo la zona donde estaba el polimorfismo (ver figura 74). De esta manera se garantizó que la amplificación de la región donde estaba el SNP marcador fuera solo el correspondiente al alelo no digerido por la enzima de digestión (alelo metilado).

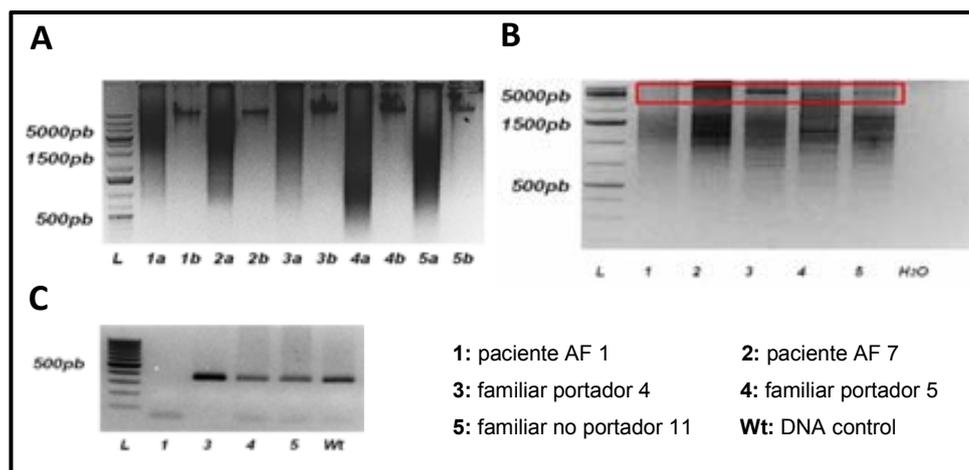


Figura 74. Comprobación de la digestión del DNA genómico y de la amplificación de la región promotora y de la zona del SNP rs5935816 en el gen FANCB. (A) Digestión del DNA genómico con *CfoI* a 37°C por 18 horas. **(B)** Amplificación por PCR de la región promotora del gen FANCB incluyendo la región del SNP *rs5935816*. **(C)** Amplificación por PCR de la región del SNP *rs5935816* posterior a la digestión genómica y a la amplificación del apartado B.

Posteriormente se procedió enviar las muestras purificadas al servicio de secuenciación, para finalmente analizar los resultados (ver figura 75). Con estos resultados se pudo confirmar lo que clínicamente ya se sospechaba, que el alelo mutado estaba inactivo en los portadores, y por lo tanto, la funcionalidad el alelo sano era el responsable de la expresión de este gen y de la ausencia de la enfermedad en estas mujeres.

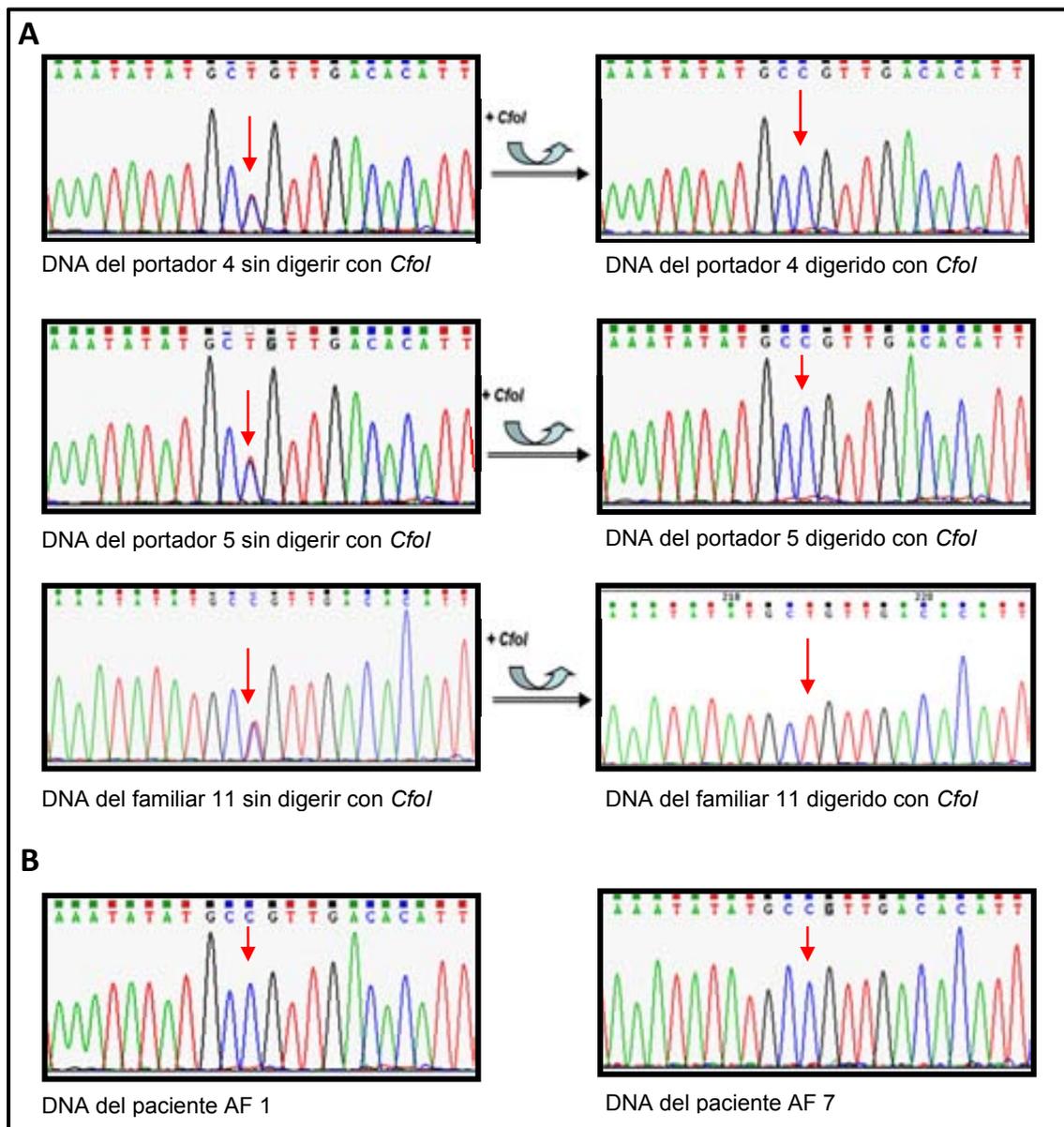


Figura 75. Estrategia para la detección del alelo metilado (inactivado) en *FANCB*. (A) Se observa la desaparición del doble pico después de secuenciar el DNA genómico con *CfoI*, indicativo que solo hubo digestión del alelo no metilado. (B) Secuencias de la región del SNP *rs5935816* en los pacientes AF 1 y 7, en las cuales se observa este SNP en hemocigosis.

Estos resultados reafirman lo que ya se ha publicado en tres estudios anteriores en pacientes FA-B, en donde identificaron la inactivación del alelo

mutado de 9 madres portadoras de mutaciones en este gen (Holden et al., 200; McCauley et al., 2011; Meetei et al., 2004) como en otras enfermedades recesivas ligadas al X (Andreu et al., 2003; Heine-Suñer et al., 2003), sobre la inactivación sesgada del alelo mutado.

4.2.2. Implementación de la estrategia de 4 rondas para el cribado mutacional en *FANCA* en pacientes AF de otros países

En este apartado se comentan los resultados de los pacientes que se analizaron mutacionalmente con la estrategia de cribado para el gen *FANCA*. A través del servicio de análisis de fragilidad cromosómica de la UAB recibieron muestras de unos pocos pacientes de algunos países europeos entre los cuales figuran Portugal, Serbia y Bélgica. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la tabla 41.

Pacientes AF	1ª ronda	2ª ronda	3ª ronda	4ª ronda
4 Portugueses	4	--	Pendiente	
2 de Santo Tomé y Príncipe (África)	--	En curso	Pendiente	
1 Serbio*	1	1	--	--
1 Bélgica	1	Pendiente		

Tabla 41. Cribado de mutaciones para el gen *FANCA* en pacientes AF Europeos no españoles. Cribado mutacional mediante la estrategia de 4 rondas de PCR/secuenciación y MLPA. *Pacientes subtipados como del grupo FA-A.

En cuanto a los 4 pacientes portugueses analizados por la primera ronda se identificaron cuatro mutaciones en tres diferentes pacientes, logrando el subtipaje completo de uno de ellos (paciente 17808). En cuanto a los dos pacientes en los que se identificó una de las dos mutaciones les da una gran probabilidad de ser pacientes FA-A (gen más frecuentemente mutado). En paralelo, se hizo el cribado en un familiar de un paciente gitano y resultó ser portador de la mutación c.295C>T en heterocigosis. Adicionalmente en el servicio de análisis AF de Portugal tenían muestras de dos pacientes procedentes de África (Santo Tomé) los cuales fueron incluidos en nuestro estudio de cribado mutacional. En estos pacientes de origen africano a pesar

de haber realizado la primera ronda y estar por finalizar la segunda ronda no se encontró mutación alguna, por lo cual aún no sabemos si son pacientes FA-A.

El subtipaje del paciente FA-A serbio será comentado en el siguiente apartado.

En este paciente, aprovechando la estrategia de cribado mutacional para FANCA se hizo el estudio mutacional de este paciente. En la primera ronda y por medio de la MLPA se documentó una delección en heterocigosis de los exones 25-27 y en la segunda ronda por medio de la secuenciación de Sanger se identificó una mutación truncadora (c.215-216delTG, p.Leu72Phefs*7) localizada en el exón 3 de este gen.

En cuanto al paciente de Bélgica se trataba de un paciente con antecedentes familiares de cáncer tanto por vía materna como paterna, en quien se habían hecho la confirmación del diagnóstico por ensayo de micronúcleos y nos envían muestra de sangre para reconfirmar su diagnóstico por el ensayo de fragilidad cromosómica por DEB. Adicionalmente se decidió intentar realizar un estudio de FANCA por WB a partir de linfocitos de SP ya que es el grupo más frecuente, documentándose la ausencia de la proteína en el paciente (ver figura 76), de esta manera se hizo a la vez el subtipaje del paciente.

Como ahora se tenía el subtipaje hecho en este paciente y además se trataba de mutaciones truncadoras (por la ausencia de expresión de FANCA en el WB), se decidió implementar la primera ronda de la estrategia de cribado para este gen y se identificó una delección de los exones 9 a 15 por MLPA, de esta manera se reconfirmó el subtipaje. Desafortunadamente por falta de tiempo no se pudo continuar con la búsqueda de la otra mutación.

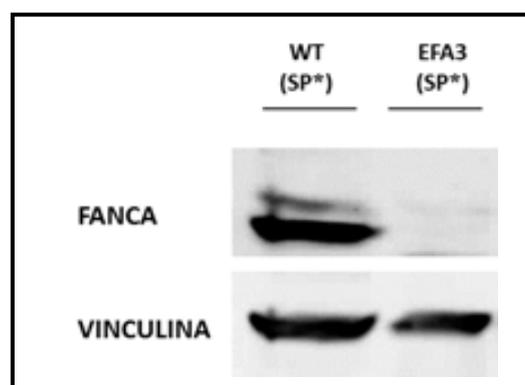


Figura 76. WB para FANCA en el paciente EFA3. Este WB se realizó a partir de linfocitos extraídos de SP y cultivados con fitohemaglutinina por 3 días.

En resumen, la estrategia del análisis mutacional para el gen *FANCA* permitió en algunos casos además de identificar las dos mutaciones hacer el subtipaje del paciente y en los casos de identificar una de los dos mutaciones hacer un subtipaje parcial del mismo. Sin embargo el no encontrar mutaciones en este gen deja la duda si pueda tratarse de otro subtipo, en tal caso implicaría no encontrar nada al finalizar el estudio mediante la estrategia de cribado mutacional para este gen.

4.2.3. Implementación del WB para el subtipaje de pacientes Serbios

Como ya se ha mencionado en un apartado anterior el WB no sólo permite identificar por medio de un estudio de FANCD2-Ub la activación de la ruta FA/BRCA, sino que en los casos que no veamos expresión de la proteína en estudio permite hacer el subtipaje correspondiente. Usando esta metodología en un grupo de 4 pacientes serbios, aprovechando que disponemos de líneas celulares (fibroblastos primarios), se consiguió realizar su subtipaje. Mediante un ensayo de activación de FANCD2, se pudo demostrar que tres de estos pacientes eran deficientes en FANCD2 y el restante presentaba ausencia de FANCA (ver figura 77). Por lo tanto en esta serie de pacientes mediante la metodología del WB se pudo hacer el subtipaje de todos los pacientes, resultando ser 3 de los 4 pacientes FA-D2 y el restante FA-A. Adicionalmente aprovechando nuestra estrategia de cribado mutacional del gen *FANCA* se reconfirmo el paciente 2229 como FA-A al identificar las dos mutaciones truncadoras responsables de la ausencia de expresión de la proteína de este gen, mutaciones ya comentadas en el anterior apartado.

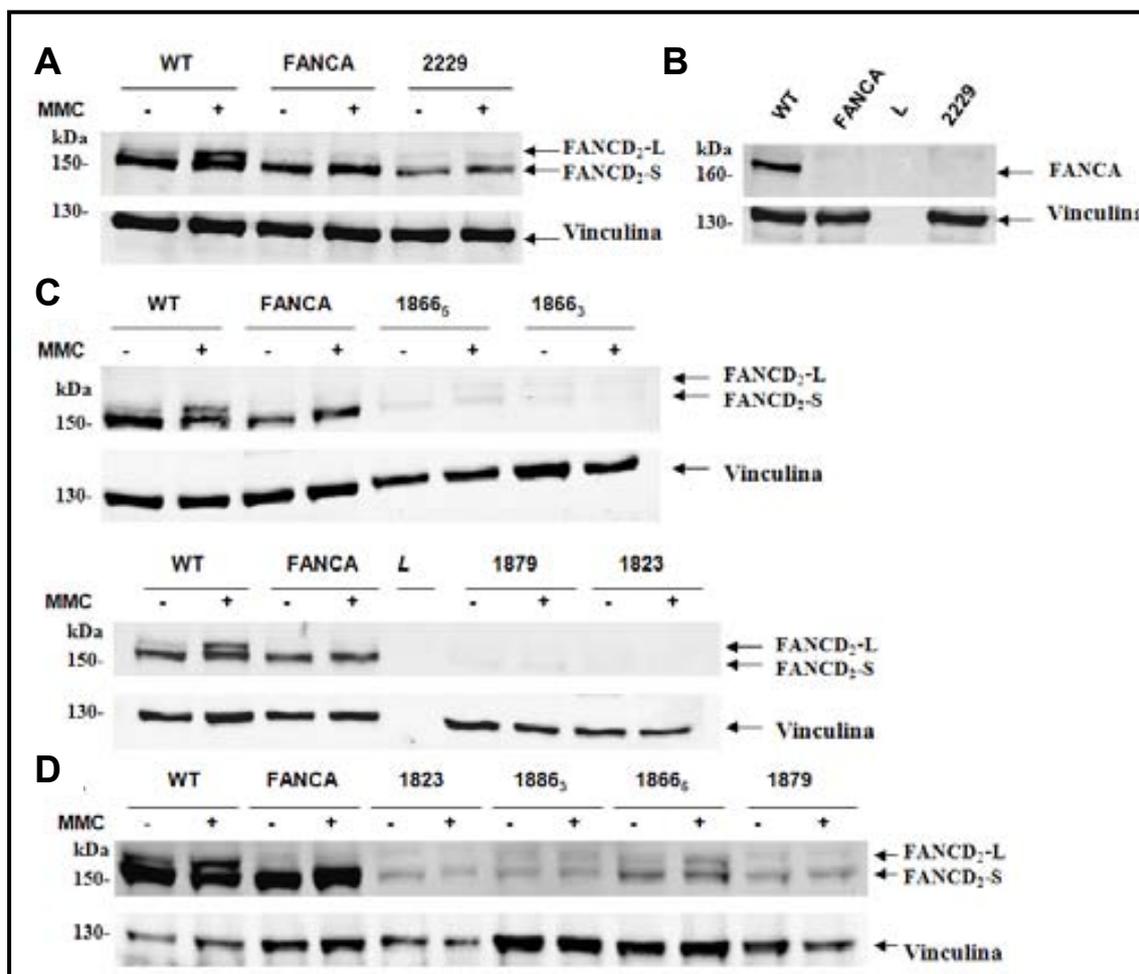


Figura 77. Subtipaje de pacientes AF serbios mediante análisis de FANCD2-Ub por WB. (A) Paciente 2229 en el que no se evidencia monoubiquitinación de FANCD2. (B) Por WB y en paralelo se observa la ausencia de banda de FANCA para el mismo paciente 2229. (C) En los pacientes 1823, 1866 y 1879 se observa disminución casi total de la banda FANCD2. (D) La sobreexposición en WB evidencia la presencia de una banda tenue de FANCD2 en los pacientes 1823, 1866 y 1879. La L hace referencia al carril donde se puso el marcador de peso molecular. El ensayo de activación de FANCD2 (FANCD2-Ub) se llevó a cabo con MMC en fibroblastos primarios de estos pacientes tal como se explica en el apartado de materiales y métodos.

Finalmente quisimos hacer un análisis del fenotipo clínico de estos pacientes con el fin de identificar alguna relación en los tres pacientes FA-D2, pero no se observaron datos clínico relevantes en común, datos descritos en la tabla 42. Por otra parte dos de los pacientes FA-D2 tenían microcefalia, anomalía congénita que se ha descrito con mayor prevalencia en este subtipo de pacientes. Curiosamente uno de los pacientes FA-D2 (1879) sólo presentaba una anomalía menor (talla baja) y había sido diagnosticado a la edad de 3 años debido a que su hermano era afecto de dicha enfermedad.

Paciente	Sexo	Fecha de Nac.	Origen /etnia	Clínica	Test DEB	Grupo AF	Análisis Mutacional	Trasplante
2229	M	02/08/1991	Serbio	Talla baja, polidactilía, microcefalia. Debutó con anemia y, trombocitopenia en el 2003. No consanguinidad.	+	FA-A	1.c.215-216delTG, p.Leu72Phefs*7. 2. Delección de exones 27 a 29	No
1823	F	ND	Serbio	Talla baja, manchas café con leche, microcefalia. Debutó con anemia y trombocitopenia a los 8 años de edad. No consanguinidad.	+	FA-D2	ND	TPH de donante compatible no emparentado, fallece por complicaciones del TPH.
1866	F	13/03/1999	Serbio	Talla baja, manchas café con leche, microcefalia, hipertelorismo, sindactilía, urtero bicorne. No consanguinidad.	+	FA-D2	ND	No
1879	F	1991	Serbio	Talla baja. Diagnosticada a los 3 años de edad por diagnóstico de hermano AF. No consanguinidad.	+	FA-D2	ND	No

Tabla 42. Descripción clínica de los pacientes AF serbios. Solo en el paciente FA-A se realizó el análisis mutacional, ya que disponemos de una metodología para el estudio mutacional del gen *FANCD2*.

4.3. ANÁLISIS DEL FENOTIPO CELULAR EN PACIENTES CON UN ENSAYO DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA NEGATIVA PARA AF

4.3.1. Análisis del fenotipo clínico-celular de pacientes deficientes en *FAN1* en el contexto del fenotipo AF

Varias publicaciones hechas sobre el gen *FAN1/KIAA1018/MTMR15* en las que describían su participación en la ruta FA/BRCA generaron cierta expectativa sobre su implicación en la AF y algunos de los autores lo plantearon como un posible

candidato a nuevo gen AF. Sin embargo, llamaba la atención la sensibilidad intermedia que presentaban las diferentes líneas celulares deficientes en este gen, empleadas en los estudios de exposición a agentes generadores de ICLs (MMC), en relación a la sensibilidad de una célula AF. Adicionalmente, hasta ese momento ninguno de los grupos que trabajan en este campo habían identificado pacientes AF con mutaciones bialélicas en este gen.

A raíz de dos publicaciones en las que identificaban 2 pacientes con una microdelección en homocigosis (microdelección 15q13.3) la cual incluía 7 genes entre los que estaba el gen *FAN1*, pero que fenotípicamente no presentaban características de pacientes AF (LePichon et al., 2010; Masurel-Paulet et al., 2010), se decidió poner en contacto con dichos investigadores para realizar la caracterización del fenotipo celular de estos pacientes y gracias a la colaboración de dichos investigadores en este aspecto se pudo realizar este trabajo.

Es así como el Dr. B.C. Bittel (*University of Missouri-Kansas City School of Medicine*, Kansas City, MO, USA) facilitó la línea celular linfoblastoide de su paciente, la cual se codificó en nuestro laboratorio como MD1.

Por otra parte, el Dr. Joris Andrieux (*Institut de Génétique Médicale, Hopital Jeanne de Flandre*, CHRU de Lille, France) y el Dr. Muriel Holder (MCU-PH Génétique Clinique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, France) facilitaron la línea celular de su paciente, la cual se codificó en nuestro laboratorio MD2. Adicionalmente este último grupo facilitó datos clínicos, sangre periférica de dos pacientes más (dos hermanos) en los que también habían identificado la microdelección 15q13.3 en homocigosis por estudios de *aCGH* (ver figura 78), los cuales fueron codificados en nuestro laboratorio como MD3 y MD4.

Como se disponía de DNA de los 4 pacientes se pudo reconfirmar la ausencia del gen *FAN1* mediante amplificación específica por PCR de diferentes exones de este gen. Adicionalmente, se reconfirmó la ausencia total de proteína de *FAN1* en las respectivas líneas celulares de los pacientes MD1 y MD2 mediante WB, tal como se muestra en la figura 79A.

En paralelo a la confirmación de la delección en homocigosis del gen *FAN1* se realizó el ensayo de fragilidad cromosómica con DEB en los linfocitos T de SP de los pacientes MD2, MD3 y MD4 y en la línea linfoblastoide del paciente MD1.

Los resultados del ensayo de fragilidad con DEB dieron negativos en los 4 pacientes MD (ver figura 79B). Similares resultados fueron obtenidos cuando el ensayo de fragilidad cromosómica fue repetido utilizando MMC. La tasa de rupturas cromosómicas fue calculada utilizando el CFI y los resultados fueron comparados con el historial de la base de datos del ensayo de fragilidad cromosómica por DEB de este laboratorio para pacientes AF.



Figura 78. Microdelección 15q13.3 en homocigosis de los pacientes MD3 y MD4. (A) El perfil de array-CGH de 44K muestra la extensión de la Microdelección 15q13.3 en homocigosis. (B) La región comprendida es: chr15:28,725,507-30,298,155 (versión hg18-build36), e incluye 7 genes entre los que está el gen *FAN1* (KIA19018), marcado en círculo rojo. Resultados proporcionados por los Drs Joris Andrieux y Muriel Holder.

Desafortunadamente falló la creación de las líneas celulares lifoblastoides de los dos últimos pacientes (MD3 y MD4) y no se pudieron incluir en el trabajo de análisis de sensibilidad a la MMC. Por lo tanto los estudios de sensibilidad a MMC sólo se llevaron a cabo en las dos líneas celulares que disponíamos, MD1 y MD2. Se incluyó dentro del estudio una línea celular lifoblastoide de un

paciente deficiente de *FANCA* y una de un individuo sano (WT) como control positivo y negativo, respectivamente. El estudio de supervivencia celular y de sensibilidad a la MMC llevado a cabo en estas líneas celulares se midió en relación a su crecimiento y mortalidad. En este ensayo se expusieron las diferentes líneas celulares a diferentes dosis de MMC (de 0 a 100 ng/mL) y se cuantificó la supervivencia cuando las diferentes líneas celulares llegaron al doblaje de su tercera población. Basados en la LD50, las líneas MD1 y MD2 mostraron una sensibilidad intermedia a la MMC, mientras que la línea *FANCA* fue 30 veces más sensible a la MMC que la línea WT, las líneas MD1 y MD2 fueron sólo 5 veces más sensibles a la MMC que las células WT (ver figura 79C). Adicionalmente, en estas líneas se llevó a cabo un ensayo de análisis del ciclo celular después de la exposición a concentraciones elevadas de MMC. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo por citometría de flujo. Exposiciones a concentraciones elevadas de MMC por 72 horas resultaron en una marcada parada en la fase G2/M a bajas concentraciones de MMC sólo para la línea linfoblastoide *FANCA*, mientras que el bloqueo de la fase G2/M fue discretamente intermedio en las líneas MD (Figura 79D), compatible con la sensibilidad a MMC mostrada por estas líneas en los ensayos de supervivencia (la figura 90C). Finalmente a nivel clínico a pesar de tener un fenotipo clínico de alteraciones en el desarrollo neurológico no presentaron hasta la fecha del estudio ninguna anomalía hematológica, tal como se muestra en la tabla 45.

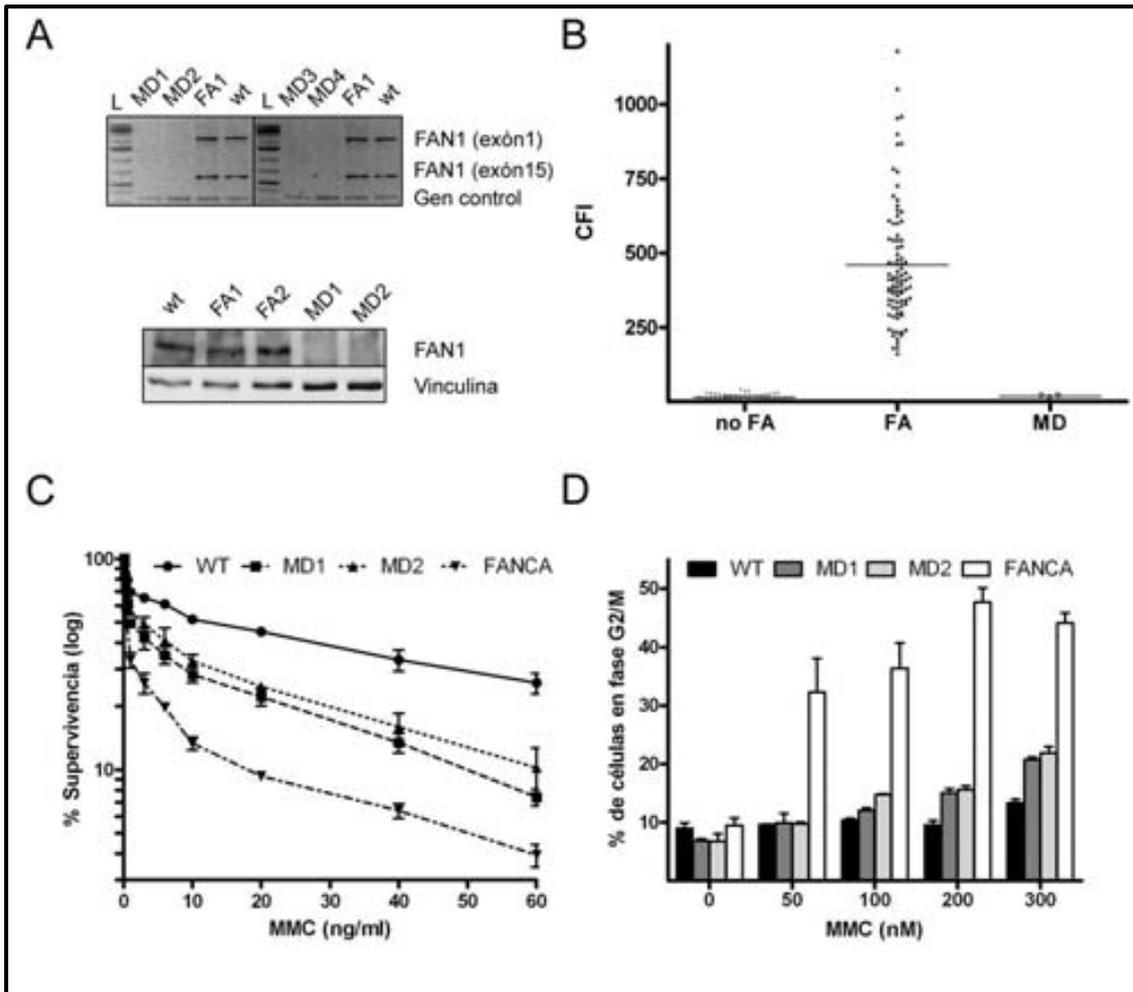


Figura 79. Ausencia de FAN1 y caracterización del fenotipo celular de los pacientes MD. (A) Fragmentos amplificados por PCR correspondientes a los exones 1 y 15 del gen *FAN1* fueron observados usando DNA de un individuo sano (*Wt*) y un paciente deficiente de FANCA FA usados como controles, mientras que no fueron amplificadas en los DNAs de los pacientes MD1 a MD4 usados, confirmando la delección bialélica de *FAN1* en los pacientes MD (Panel superior). El WB contra la proteína de FAN1 revela una banda específica de FAN1 en las líneas linfoblastoides *Wt* and FA (FA1 and FA2) que no fueron detectadas en MD1 y MD2. (Panel de abajo). (B) El *Dot plot* de CFI muestra valores individuales y media (línea continua) rupturas cromosómicas inducidas por DEB de individuos no AF (n=56), FA (n=90, excluyendo mosaicos) e individuos MD (n=4). Los valores de CFI de todos los pacientes MD puntuaron en el rango de los individuos no FA. (C) Se observa una sensibilidad media de las líneas linfoblastoides de MD a MMC en el ensayo de supervivencia celular. Las gráficas muestran una sensibilidad intermedia a MMC de MD1 y MD2 comparadas con la alta sensibilidad de la línea FA (FANCA). (D) Escasa parada de G2/M de las líneas MD a MMC en el análisis del ciclo celular. Las gráficas *plots* de los porcentajes de parada de la fase G2/M después de la exposición a concentraciones elevadas de MMC por 72h. Una línea celular WT y una FANCA fueron incluidas como controles.

Paciente	Edad	Origen / etnia	Clínica	Hematología	Test DEB	Sensibilidad a la MMC	Parada de ciclo en G2/M	Ref.
MD1	11	USA	Progresiva pérdida de la visión, hipotonía, arreflexia, ausencia de lenguaje, epilepsia, microsomía y microcefalia.	Normal	Neg.	Intermedio	Intermedio	*
MD2	6	Francia	Hipotonía severa, retraso del desarrollo, distrofia de conos y bastones, epilepsia y características autistas.	Normal	Neg.	Intermedio	Intermedio	**
MD3	1	Francia	Retraso severo del desarrollo, progresiva pérdida de la visión, microsomía y microcefalia.	Normal	Neg.	ND	ND	Presente estudio
MD4	3	Francia	Retraso severo del desarrollo, ausencia del lenguaje, progresiva pérdida de la visión, microsomía y microcefalia.	Normal	Neg.	ND	ND	Presente estudio

Tabla 43. Datos clínicos y fenotipo celular de los pacientes MD1 a MD4. La clínica y edad de estos pacientes está actualizada hasta Marzo del 2012. ND: no determinado, Neg: negativo. * (LePichon et al., 2010), ** (Masurel-Paulet et al., 2010).

Finalmente en un grupo de investigación en AF que colabora con nuestro grupo se realizó un cribado de la proteína FAN1 por WB de líneas celulares de 27 pacientes AF sin mutaciones identificadas en los 15 genes conocidos hasta ese

momento y vieron que en estos pacientes había expresión de banda específica de FAN1 a niveles del control, sugiriendo que dichos pacientes no tienen deficiencia en dicha proteína, tal como se muestra en la figura suplementaria S2 de la publicación “*On the role of FAN1 in Fanconi anemia*” (Trujillo et al., 2012).

4.3.2. Identificación de pacientes “Fanconi-like”

En relación al fenotipo celular de células que presentan una sensibilidad intermedia a agentes inductores de ICLs, hemos identificado una serie de pacientes que son remitidos a nuestro servicio para el estudio citogenético por sospecha de AF, los cuales presentaban una sensibilidad intermedia a los agentes inductores de ICLs pero daban negativo para AF en el ensayo de fragilidad cromosómica con DEB tanto en linfocitos T de SP como en fibroblastos primarios de piel. El análisis del ciclo celular fue estudiado en colaboración del grupo de la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT, Madrid.

Lo interesante de estos pacientes que presentaban un fallo de médula ósea, algunos con malformaciones congénitas, tal como se describe en la tabla 44. Uno de estos casos interesantes fue el paciente FA376, quien no presenta malformaciones congénitas y su única manifestación clínica era el fallo de médula ósea (ver tabla 44). Al realizarse en este paciente el ensayo de fragilidad cromosómica con DEB dio negativo para AF (figura 80A), pero al analizar su ciclo celular posterior al tratamiento con agentes inductores de ICLs (MMC) presentó una parada en fase G2/M intermedia (figura 80B).

Paciente	Fecha de nacimiento	sexo	Test de fragilidad en DEB	Parada en G2/M	Clínica	Anteced.	Observación
FA298	06/08/1991	F	Negativo en FB Y Linf T.	Intermedia*	No malformaciones. Aplasia de tres series, anemia aplásica		Múltiples transfusiones previa a TPH. De carranza Vivo al 2013
FA317	04/07/2001	F	Negativo en FB y Linf T.	Intermedia*	Cara dismórfica. Aplasia suave: anemia (Hb: 11 g/dL) y leucopenia ($3.6 \times 10^3/\mu\text{L}$) sin manejo		Vivo al 2013 sin manejo Beasain (Guipusua)
FA361	06/04/1972	M	Negativo en FB y Linf T.	Intermedia*	Aplasia medular: Pancitopenia sin tto, baja talla, problemas urinarios.	De cáncer en hermano	Hermano de FA376. Vivo al 2013
FA376	06/12/1978	M	Negativo en FB y Linf T.	Intermedia	No malformaciones, Bicitopenia: leucopenia con trombocitopenia: Hb 13.3 g/dl, leucos $2.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ (n $1.7 \times 10^3/\mu\text{L}$), linfos $0.6 \times 10^3/\mu\text{L}$) y plaquetas $51 \times 10^3/\mu\text{L}$		Neoplasia hematológica a los 14 años. Osteomielitis crónica de fractura antigua. Hermano de FA361.
FA349	26/12/2006	F	Negativo en Linf T.	Intermedia*	NI		Sensibilidad de Linfocitos a MMC
FA380	2007 tenía 5 años	F	Negativo en FB y Linf T.	Intermedia*	Microcefalia, crisis epilépticas, trombocitopenia moderada, manchas café con leche.		ND
FA440	04/12/1979	F	Negativo en Linf T.	Intermedia	Aplasia medular. Macrocitosis, baja talla, cara dismórfica.		Hermano de FA441. Vivo al 2013
FA441	21/06/1981	M	Negativo en Linf T.	Intermedia	Macrocitosis, discreta anemia, α -feto-proteína alta, baja talla, alteraciones renales, cara dismórfica.		Hermano de FA440. No aplasia medular. Vivo al 2013

Tabla 44. Pacientes “Fanconi-like”. Serie de pacientes con una clínica AF, parada de ciclo celular AF y ensayo de fragilidad cromosómica en DEB negativo, es posible que se trate de un nuevo síndrome al que denominamos “Fanconi-like”. ND: no determinado, Linf. T: linfocitos T, Anteced: antecedentes.

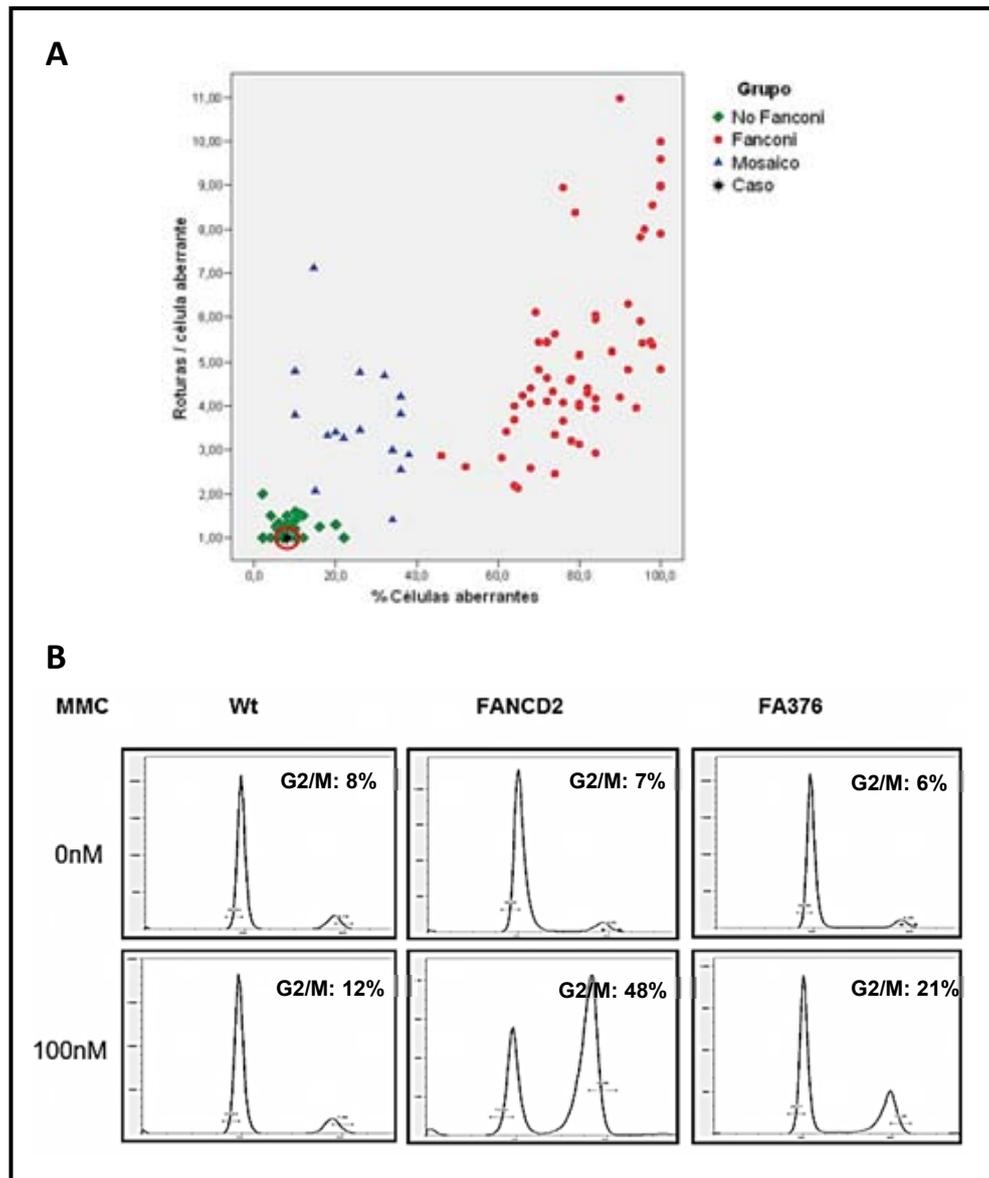


Figura 80. Estudios del fenotipo celular del paciente FA376. (A) Presenta un ensayo de fragilidad cromosómica en DEB negativo tanto en linfocitos de SP como en fibroblastos de piel. (B) Se observa en sus fibroblastos de piel una parada intermedia en la fase G2/M del ciclo celular al ser tratados con MMC.

Posiblemente estos pacientes con fallo de médula ósea, con ensayo de fragilidad cromosómica por DEB negativo, pero que presentan una parada en fase G2/M intermedia, se trata de subtipo de AF al que denominaríamos “Fanconi-like”. En este momento 6 de estos pacientes están siendo analizados mutacionalmente por secuenciación de exoma completo en la empresa de Sistemas Genómicos con el fin de identificar el gen o genes implicados en su fenotipo clínico.

4.4. ANÁLISIS CLÍNICO DE UNA COHORTE DE PACIENTES AF ESPAÑOLES CON MOSAICISMO POR REVERSIÓN MUTACIONAL

De acuerdo al análisis de los datos llevados por nuestro servicio de citogenética se identificó una cohorte de 34 pacientes AF con mosaicismo por reversión somática a nivel hematopoyético entre los 157 pacientes AF españoles que hasta este momento se habían diagnosticado, lo cual representa un 21.65% de la población total. Los criterios tenidos en cuenta para clasificar estos pacientes como mosaicos por reversión mutacional han sido el ensayo de fragilidad cromosómica en Linfocitos T y la evolución clínica hematológica favorable o estable.

De acuerdo al ensayo de fragilidad cromosómica realizado en cultivos de linfocitos T tratados con DEB, 13 pacientes de esta cohorte están en el rango de mosaicos dudosos (CA entre 40-60% o CFI entre 156-238). Así mismo se han observado diferentes grupos de complementación implicados en este fenómeno (FA-A, -E y -D2). Dentro de esta cohorte de mosaico habían pacientes ya fallecidos y al menos uno a edad temprana (11 años, ver tabla 44).

Por otra parte y en paralelo se llevaron a cabo estudios de sensibilidad a agentes inductores de ICLs (MMC) en colonias de células de MO por parte del grupo de la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT, Madrid. Básicamente lo que realizaron fue un cultivo celular de progenitores hematopoyéticos de MO en un medio de cultivo de metilcelulosa, el cual era tratado a diferentes dosis de MMC (0, 3 y 10 nM), las dejaron en cultivo a 37°C por 14 días y luego de lo cual analizaron los resultados (supervivencia celular).

Para el análisis de la evolución clínica hematológica de estos pacientes se optó por trabajar con los pacientes cuyos controles médicos y seguimiento clínico se venían haciendo en Barcelona, ya que la proximidad de los diferentes hospitales facilitaba la recolección de los datos clínicos (15 pacientes, 3 de los cuales no se pudo obtener datos analizables) y dos pacientes más cuyos datos fueron proporcionados directamente por los respectivos especialistas médicos que hacían el seguimiento clínico. Finalmente sólo en 17 de los 34 pacientes mosaicos se pudo tener acceso a su historia clínica y de ellos sólo en 14 se

podieron obtener unos datos completos. Por lo tanto, sobre estos pacientes se hizo un análisis de evolución hematológica, fenotipo clínico y en algunos casos su correlación clínico-molecular. Los aspectos clínico-moleculares más relevantes se presentan en la tabla 45.

La correlación de la clínica hematológica junto con la resultado del ensayo con DEB en SP y el análisis de sensibilidad de MO permitió llegar a un mejor análisis, comprensión y clasificación del fenómeno de mosaicismo por reversión mutacional en estos pacientes AF (ver tabla 44). Pacientes que resultaron estar en el rango de mosaicismo por el ensayo con DEB en SP y eran resistentes sus células en MO, indicaban que la reversión mutacional había ocurrido en las células progenitoras y/o en las células madre hematopoyéticas, este fue el caso de los pacientes FA52, FA90, FA553 y FA568 (ver tabla 44).

Por otra parte, hubo pacientes que resultaron estar en el rango de mosaicismo por el ensayo de fragilidad cromosómica con DEB en SP y eran sensibles sus células en MO, en este caso se tuvo en cuenta la fecha de los dos estudios y su correlación con la evolución clínica hematológica para poder hacer un adecuado análisis. Con respecto esta situación se identificaron 4 casos de los cuales tres de ellos (FA94, FA153 y FA342) presentaron sensibilidad en su estudio de MO de 1 a 4 años posteriores al ensayo de fragilidad cromosómica en SP lo cual sugiere que la reversión mutacional ocurrió sólo en el linaje linfóide (ver tabla 44). De hecho, analizando la evolución clínica hematológica uno de estos pacientes, FA94, su evolución fue tórpida con una involución progresiva de los conteos de todas sus líneas celulares en SP hasta terminar falleciendo (ver figura 94). En este caso la evolución clínica ratificó nuestra hipótesis. En los otros casos resultó más complicado poder dar una conclusión más precisa ya que no se disponía de la evolución clínica. El cuarto caso que presentó sensibilidad de sus células en MO a MMC fue el paciente FA328, quien tuvo un ensayo con DEB en un rango dudoso para mosaico, siendo sensible en MO para MMC en una fecha muy próxima. Por el contrario tenía evolución clínica estable con conteos celulares casi normales (ver figura 87), lo cual sugería que la reversión mutacional sucedió en MO pero que en el periodo en el que se hizo el análisis en SP y MO, el porcentaje de células revertidas era muy bajo y aún no permitía ser detectado por estos ensayos.

Paciente	Estado	Sexo	Subtipo	Llegada 1ª muestra	Test DEB en SP	MMC en MO	Mosaicismo
FA5	vivo	F	A	01/03/2001	20% CA	NA	ND
FA49	vivo	M	A	01/03/2001	34% CA	NA	ND
FA50	Fallecido: 19 años.	M	A	01/03/2001	50% CA	NA	ND
FA52	vivo	F	A	01/03/2001	26% CA	Resistente (31/01/2007) #	En MO
FA70	vivo	M	D2	01/05/2001	50% CA	NA	ND
FA74	Fallecido: 20 años.	M	A	01/06/2001	52% CA	NA	ND
FA78	vivo	F	D2	01/06/2001	32% CA	NA	ND
FA90	vivo	F	A	01/03/2001	14,6% CA	Resistente (14/05/2004 al 17/03/2011) #	En MO
FA94	Fallecido: 11 años.	F	A	01/11/2001	36% CA	Sensible (26/10/2005) #	En SP
FA110	vivo	F	A	01/09/2002	64% CA	Resistente (desde 2012) #	En MO
FA113	vivo	F	A	30/06/2003	46% CA	NA	ND
FA121	vivo	M	E	01/10/2002	18% CA	NA	ND
FA124	vivo	F	No A, C, G.	01/11/2002	26% CA	NA	ND
FA125	vivo	F	A	01/11/2002	10% CA	NA	ND
FA153	Fallecido: 18 años	M	A	01/04/2003	36% CA	Sensible (07/02/2007) #	En SP
FA155	vivo	M	A	01/06/2003	58% CA	NA	ND
FA157	Fallecido: edad ND	F	A	01/06/2003	36% CA	NA	ND
FA158	vivo	M	No A, C, F, G.	01/06/2003	38% CA	NA	ND
FA183	vivo	F	A	01/06/2004	46% CA	NA	ND
FA187	vivo	M	A	01/11/2004	10% CA	NA	ND
FA294	vivo	M	A	19/05/2005	22% CA	NA	ND
FA328	vivo	F	A	09/05/2006	52% CA	Sensible (10/05/2006) #	en MO*
FA331	vivo	M	No A, C, G.	04/06/2007	15% CA	NA	ND
FA342	vivo	M	D2	05/10/2006	34% CA	Sensible (18/10/2007) #	En SP
FA378	vivo	F	A	18/10/2007	74% CA	NA	ND
FA409	Fallecido: edad ND	M	A	25/11/2008	28% CA	NA	ND
FA438	vivo	M	A	20/11/2012	42% CA	NA	ND
FA550	vivo	F	A	12/07/2011	11% CA	NA	ND
FA551	vivo	M	A	12/07/2011	56% CA	NA	ND
FA553	vivo	M	A	04/11/2010	10% CA	Resistente (04/11/2010) #	En MO
FA554	vivo	M	A	04/11/2010	32% CA	Resistente (18/03/2011) #	En MO
FA568	vivo	F	A	15/09/2012	27% CA	NA	ND
FA574	vivo	M	No A, C, G.	12/04/2011	21% CA	NA	ND
FA663	vivo	F	En estudio	09/07/2013	32% CA	NA	ND

Tabla 44. Paciente AF españoles con mosaicismo por reversión mutacional. Pacientes AF clasificados en el rango de mosaicos por el ensayo de fragilidad cromosómica por DEB en linfocitos T de SP y/o mejoría o estabilidad hematológica. *Por evolución hematológica clínica estable se piensa en un mosaicismo en MO. # Trabajo llevado a cabo por el grupo de la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético. NA: no analizada, ND: no determinado, MO: médula ósea.

En las diferentes gráficas de evolución clínica se puede observar diferentes patrones de evolución de cada uno de estos pacientes. De acuerdo a esta evolución se puede hacer cuatro grupos: uno en el cual hay mejoría de todos los linajes celulares hematológicos, otro donde la mejoría está dada por uno o dos de los linajes sanguíneos y/o los otros linajes se mantiene bajos estables, otro donde empeoran todas las líneas celulares hasta llevar a la muerte al paciente y un grupo aún más desconcertante en donde el paciente presenta una mejoría y súbitamente hace una recaída hematológica hasta requerir TPH o llevarle a la muerte.

Paciente	Estado	Sexo	Malformación / Cáncer	Antecedentes	Grupo	Mutación 1	Mutación 2
FA5	vivo	F	0	No	A	c.1115-1118delTTGG	c.4198C>T
FA49	vivo	M	1	Hermano AF	A	Del ex 21-22	NI
FA50	Falleció de 19 años.	M	3	Abuela AF	A	Del ex 21-23	NI
FA52	vivo	F	3 / CCE de adulto	Tíos Ca M/P	A	c.3558dupG	c.710-5T>C
FA90	vivo	F	2	Hermano AF	A	c.3558dupG	NI
FA94	Falleció de 11 años.	F	1	Abuela Ca	A	c. 1470+1 G>T	c. 2641 C>T
FA110	vivo	F	1	Tía: AF, Ca	A	c.3558dupG*	c.987_990delT CAC
FA121	vivo	M	13	Hermano AF fallecido	E	c. 929dupC	NI
FA124	vivo	F	4	No	No A/C/G.	NI	NI
FA125	vivo	F	5	No	A	c. 65G>A	c. 1115-1118delTTGG**
FA328	vivo	F	0	No	A	c.2303T>C	c.2303T>C
FA378	vivo	F	2	Tío neutropenia	A	Del ex 18-20	c.1874G>C
FA438	vivo	M	3	Abuela p.: talasemia minor	A	c.258T>A	c.2233_2234insT
FA568	vivo	F	3	No	A	c.1115-1118delTTGG**	NI

Tabla 45. Aspectos clínicos relevantes de los pacientes AF mosaicos seguidos hematológicamente. *Retromutación en DNA de MO, **retromutación en DNA de SP. Ca CSCC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, Ca: cáncer, M: materno, P: paterno. NI: no identificada.

Adicionalmente con el fin de hacer un mejor análisis a las diferencias que se observaron en la progresión de la mejoría de estos pacientes se hizo un ensayo de medición de sus telómeros por medio de la técnica TRF-*Southern blot* de los pacientes en los que se disponía de DNA de SP (9 de los 13). Los

datos obtenidos de la longitud telomérica no permitió identificar diferencias en esta serie de pacientes, salvo en 3 casos específicos que mostraron datos interesantes y que comentaremos junto con el análisis de la evolución clínica.

4.4.1. Pacientes AF mosaicos con mejoría de todos los linajes celulares hematológicos de manera estable en el tiempo

Dentro de esta cohorte de pacientes se identificó 6 pacientes que presentaban una evolución favorable de todos sus conteos celulares sanguíneos, lo cual concordaba con lo que se esperaría de un paciente con mosaicismo por reversión mutacional a nivel de células madre hematopoyéticas, a manera de terapia génica natural. Tales fueron los casos de los pacientes FA5, FA52, FA90, FA121, FA124 y FA125, los cuales normalizaron sus conteos sanguíneos progresivamente de manera estable (fueron seguidos hematológicamente por 23, 15, 11, 20, 8 y 10 años, respectivamente), tal como se muestran las figuras 81 a 86, respectivamente. En estos pacientes las longitudes teloméricas estaban en rango normales (ver tabla 46). En esta misma serie se identificaron dos pacientes, FA328 y FA378, los cuales aunque tuvieron una mejoría progresiva de sus conteos sanguíneos, su mejoría a través del tiempo fue mucho más lenta (ver figuras 87 y 88, respectivamente). En cuanto a la longitud telomérica, en el paciente FA328 no se identificó diferencias con la longitud de la serie anterior de pacientes. Sin embargo como se disponía DNA de SP de dos fechas diferentes, se decidió realizar hacer la medición telomérica en ambas muestras y sorprendentemente con sólo un año de diferencia se documentó un aumento significativo de los telómeros en este paciente. Analizando con más detalle los resultados obtenidos del TFR-*Southern blot* se puede resaltar que: el alargamiento de sus telómeros lo hizo justo antes de observar su mejoría hematológica (ver figura 89A), y la gráfica de la distribución de la longitud telomérica pasó de una curva heterogenea (producto de diferentes longitudes teloméricas presentes en la muestra) a un curva más homogénea de longitud telomérica (lo cual sugiere la expansión clonal de una sola célula con telómeros largos y altamente proliferativa, la célula que revertió en este paciente) (ver figura 89B).

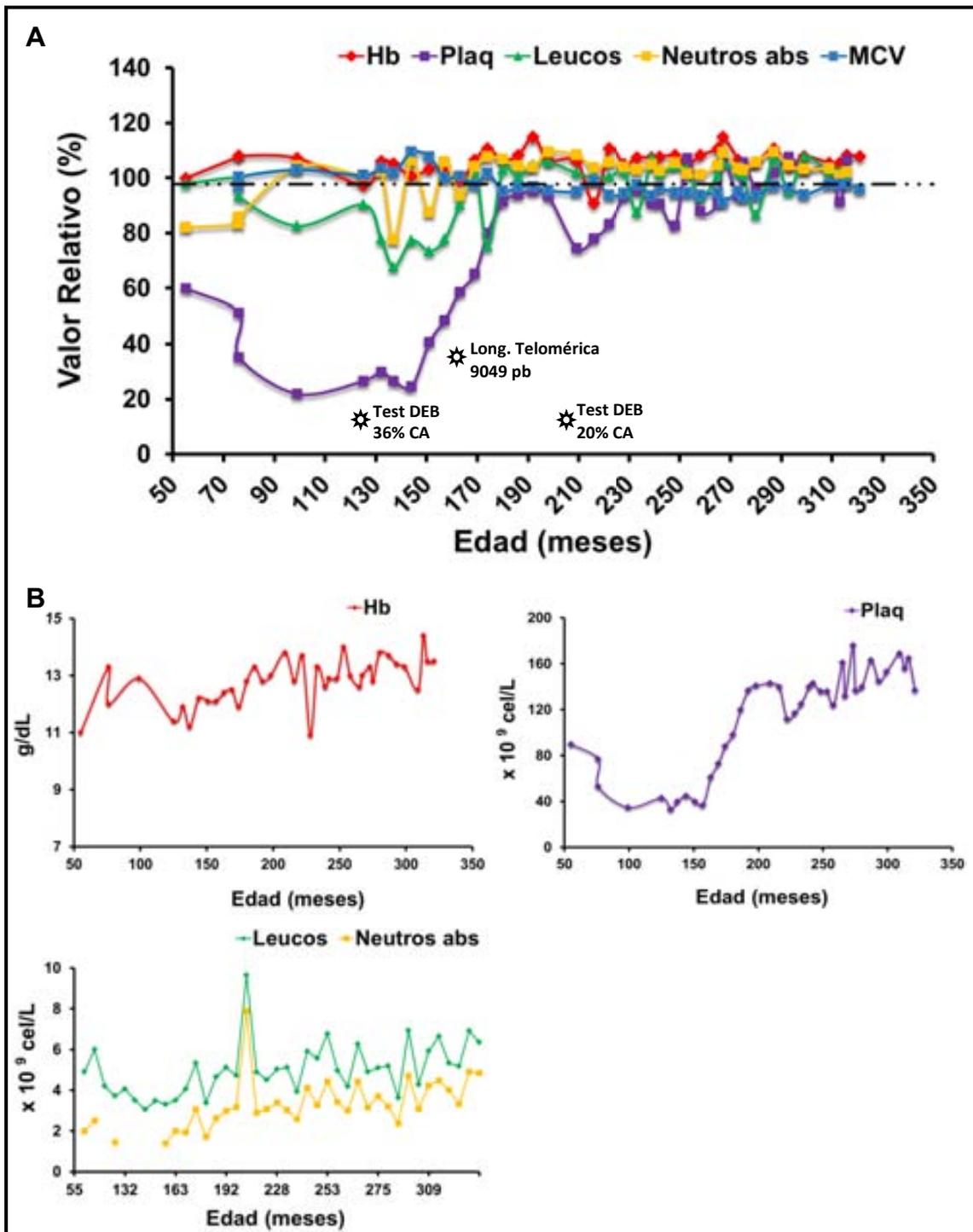


Figura 81. Evolución hematológica del paciente FA5. Desde el momento de seguimiento presentaba unos conteos sanguíneos casi en rangos normales excepto por una trombocitopenia leve que fue mejorando progresivamente. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB hecho en dos fechas diferentes muestra una progresiva bajada de la fragilidad cromosómica, y la medición con TFR-*Southern blot* unos telomeros en un rango normal. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico. Long: longitud.

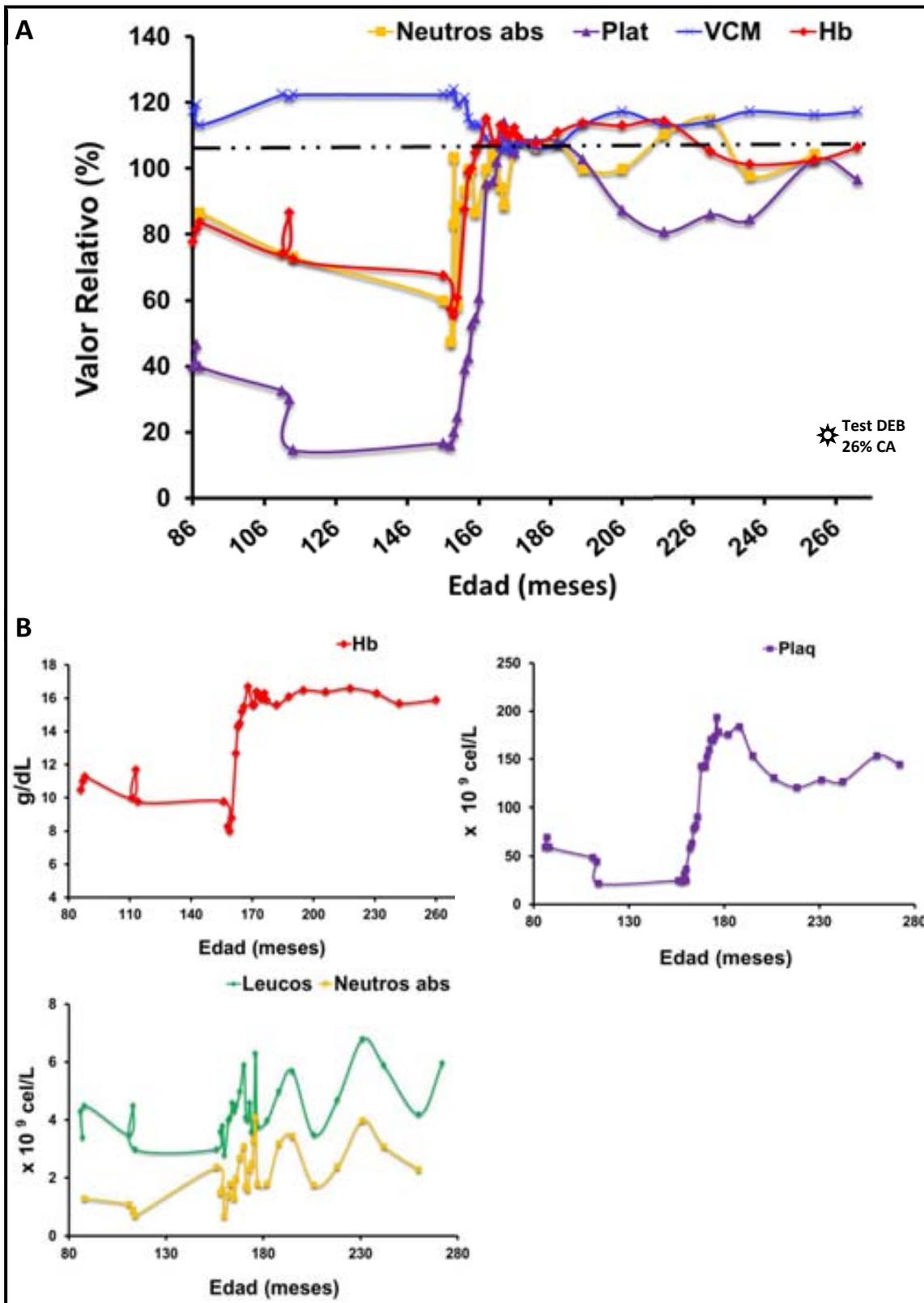


Figura 82. Evolución hematológica del paciente FA52. Sorprende la súbita mejoría de todos los conteos sanguíneos en un periodo menor a un año. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB hecho al final de este seguimiento muestra una baja fragilidad cromosómica. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico.

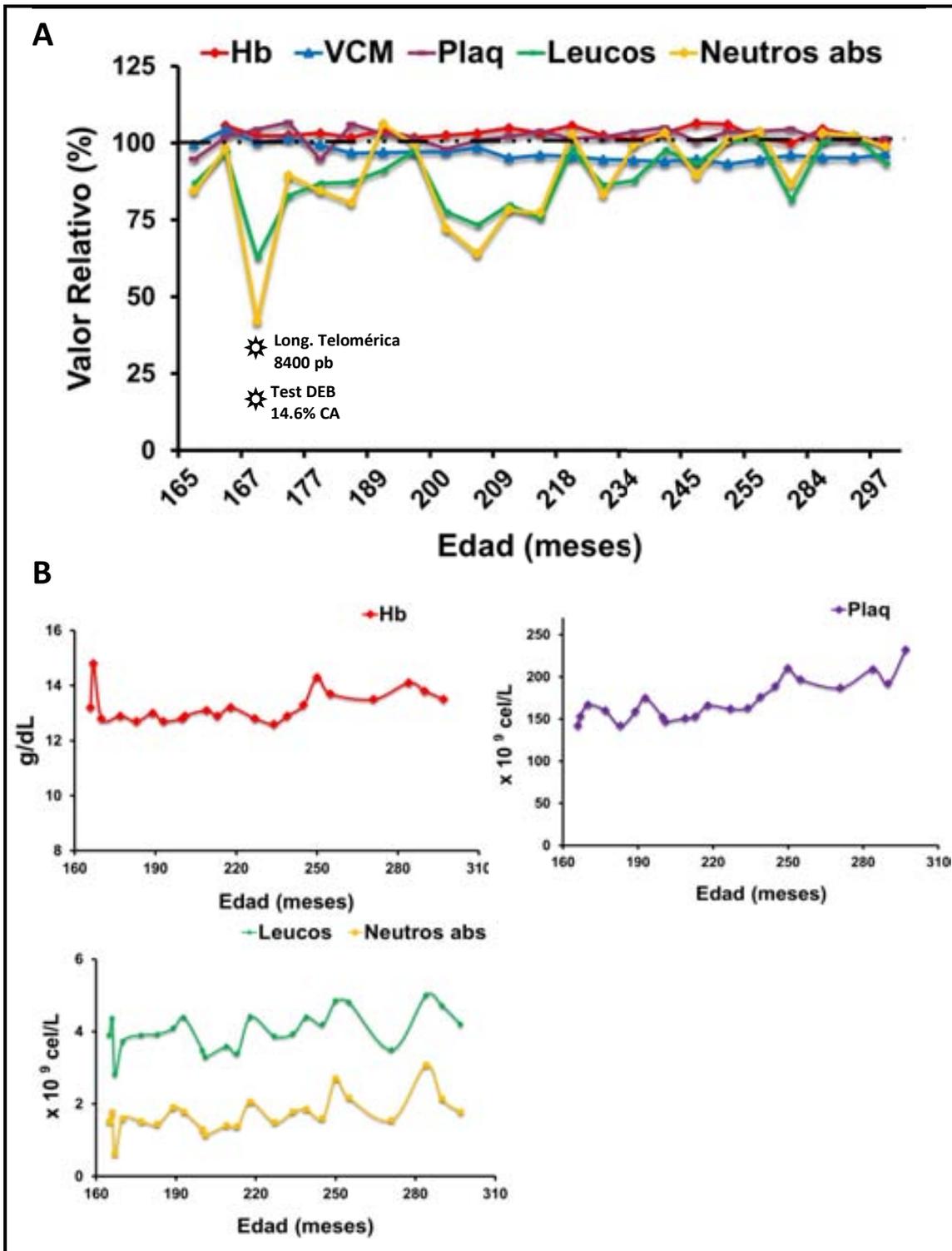


Figura 83. Evolución hematológica del paciente FA90. Seguimiento de la mejoría de todos los conteos sanguíneos por un periodo de 11 años. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB y el *TFR-Southern blot*, hechos a los 14 años de edad periodo en el cual presentaba mejoría hematológica (casi todos los linajes en valores normales, excepto por los neutrófilos absolutos), muestran una baja fragilidad cromosómica y unos telómeros normales, respectivamente. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico. Long: longitud.

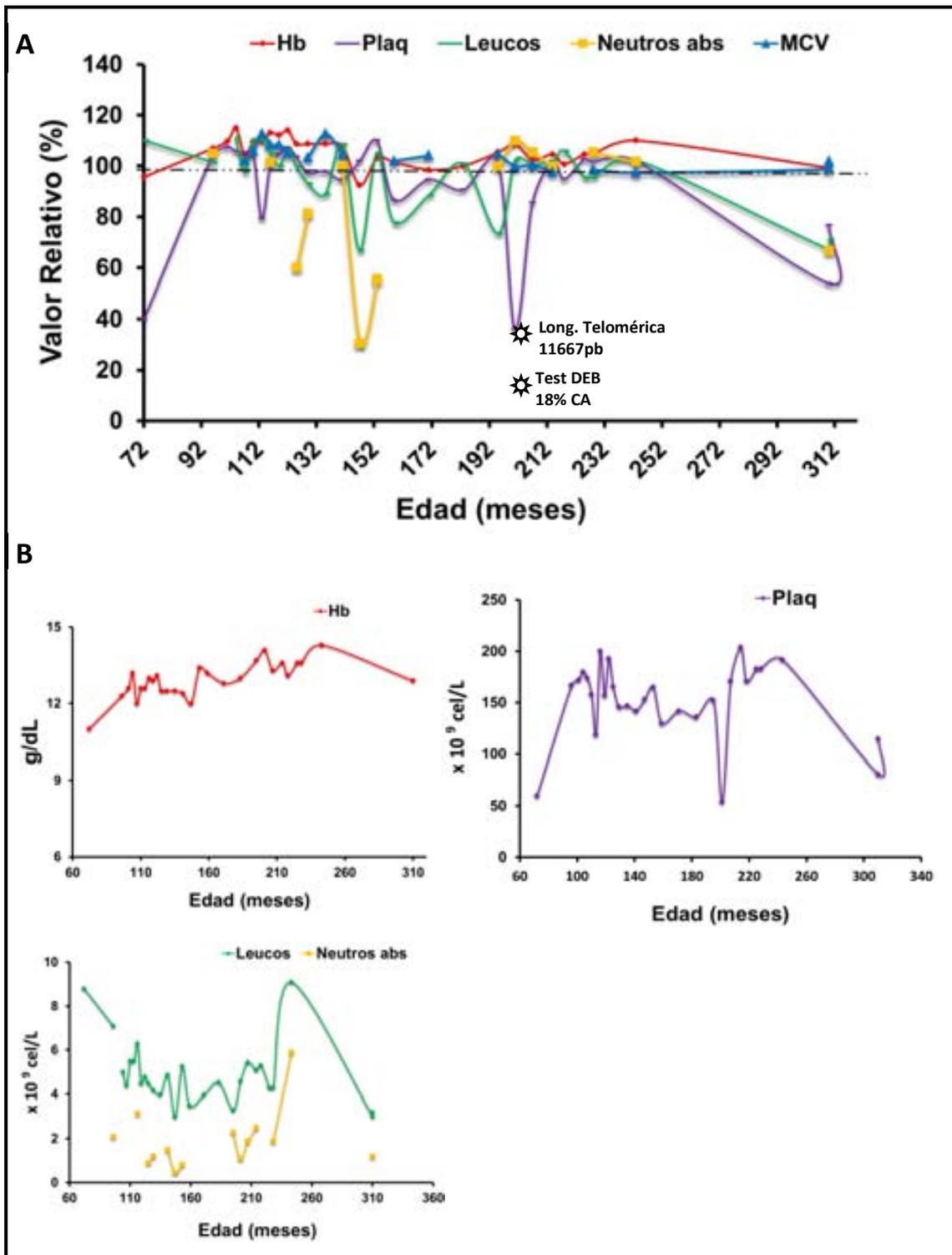


Figura 84. Evolución hematológica del paciente FA121. Seguimiento de la mejoría de todos los conteos sanguíneos por un periodo de 18 años. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB y el *TFR-Southern blot*, hechos 8 años después de la mejoría hematológica, muestran una baja fragilidad cromosómica y unos telómeros bastantes largos, respectivamente. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico. Long: longitud.

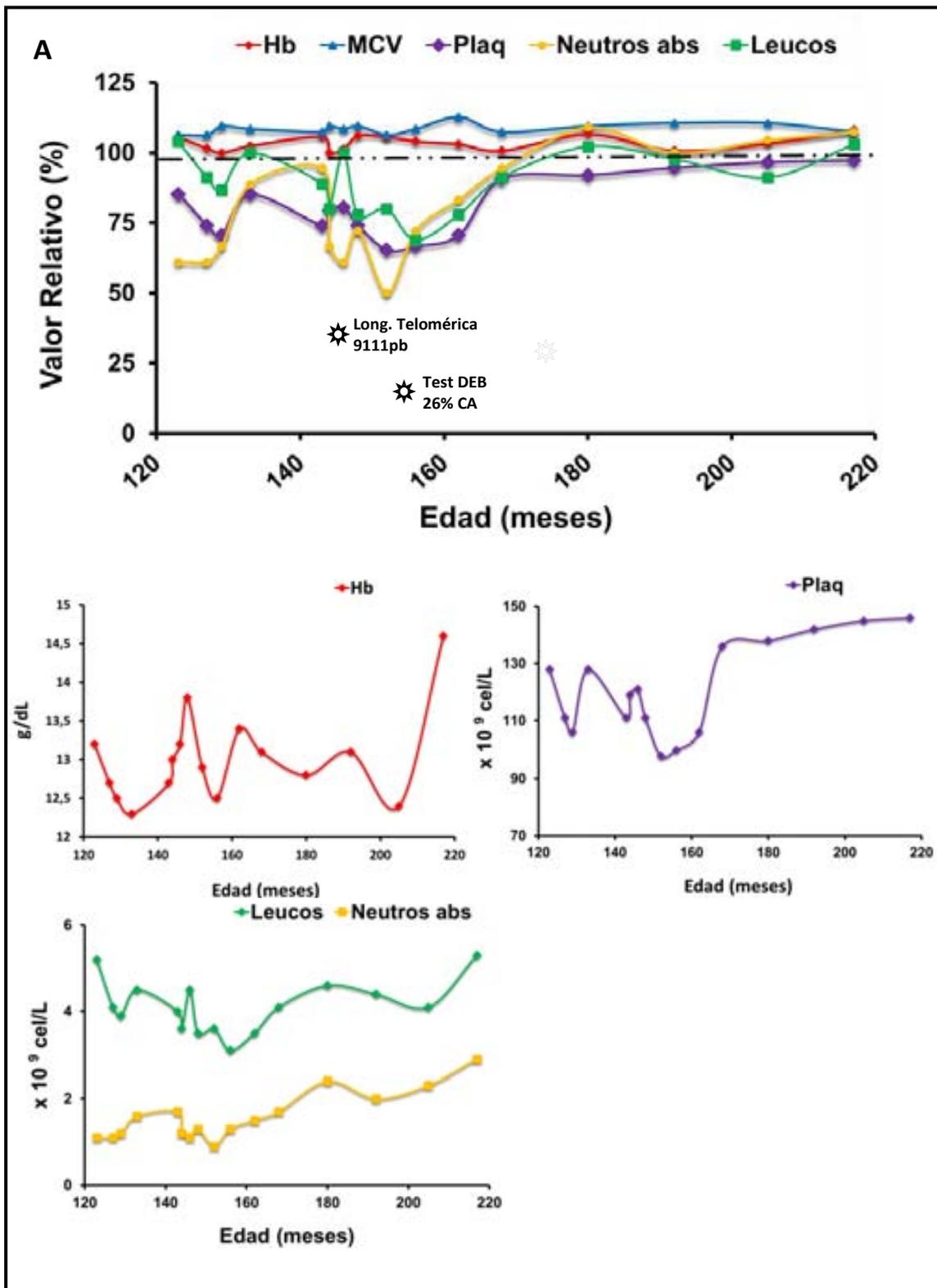


Figura 85. Evolución hematológica del paciente FA124. Seguimiento de la mejoría de todos los conteos sanguíneos por un periodo de 8 años. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB y el *TFR-Southern blot*, hechos durante el periodo de la mejoría hematológica, muestran una baja fragilidad cromosómica y unos telomeros normales para la edad, respectivamente. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico. Long: longitud.

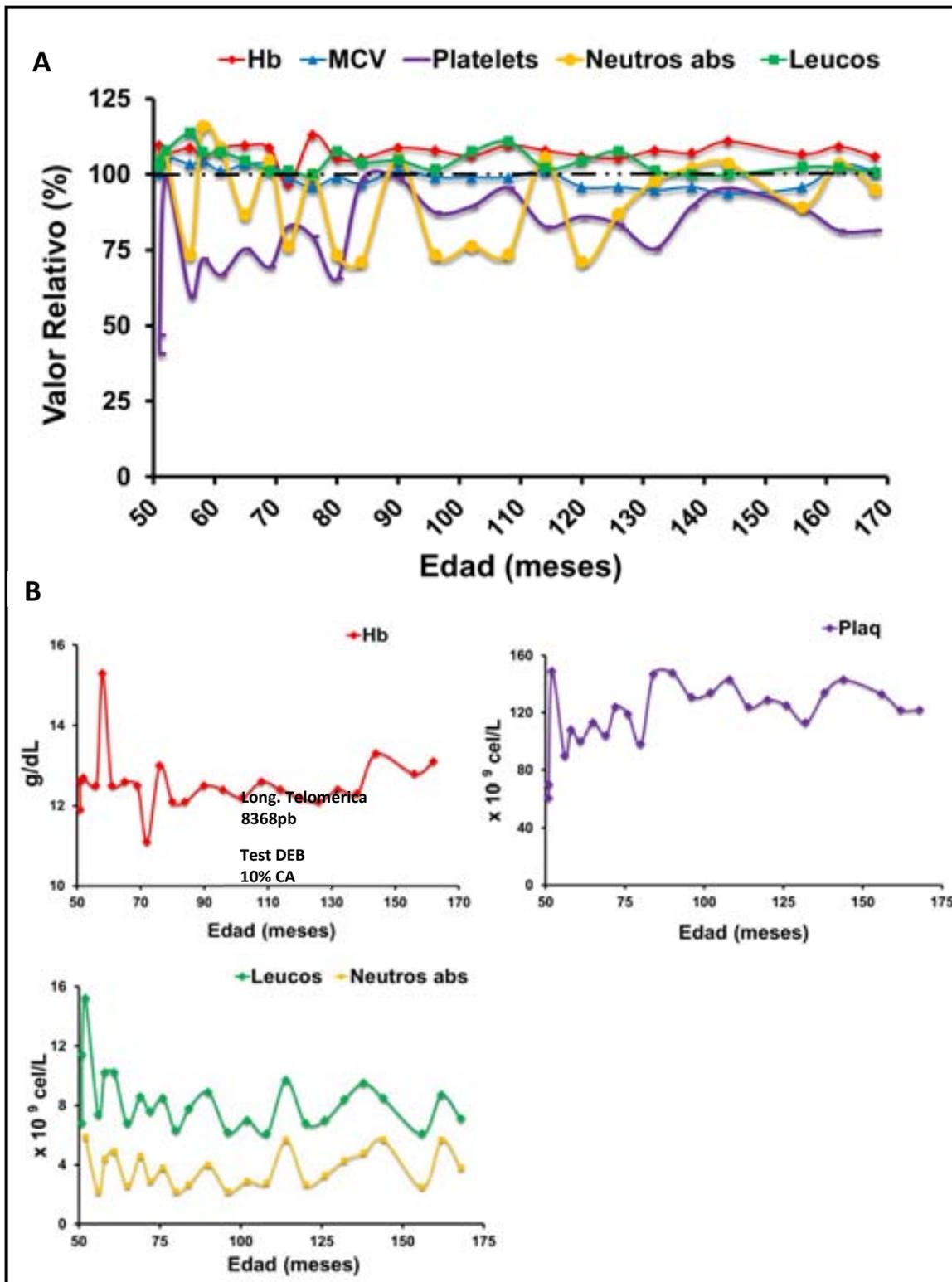


Figura 86. Evolución hematológica del paciente FA125. Seguimiento de la mejoría de todos los conteos sanguíneos por un periodo de 10 años. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB y el *TFR-Southern blot*, hechos durante el periodo de la mejoría hematológica, muestran una muy baja fragilidad cromosómica y unos telomeros normales para la edad, respectivamente. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico. Long: longitud.

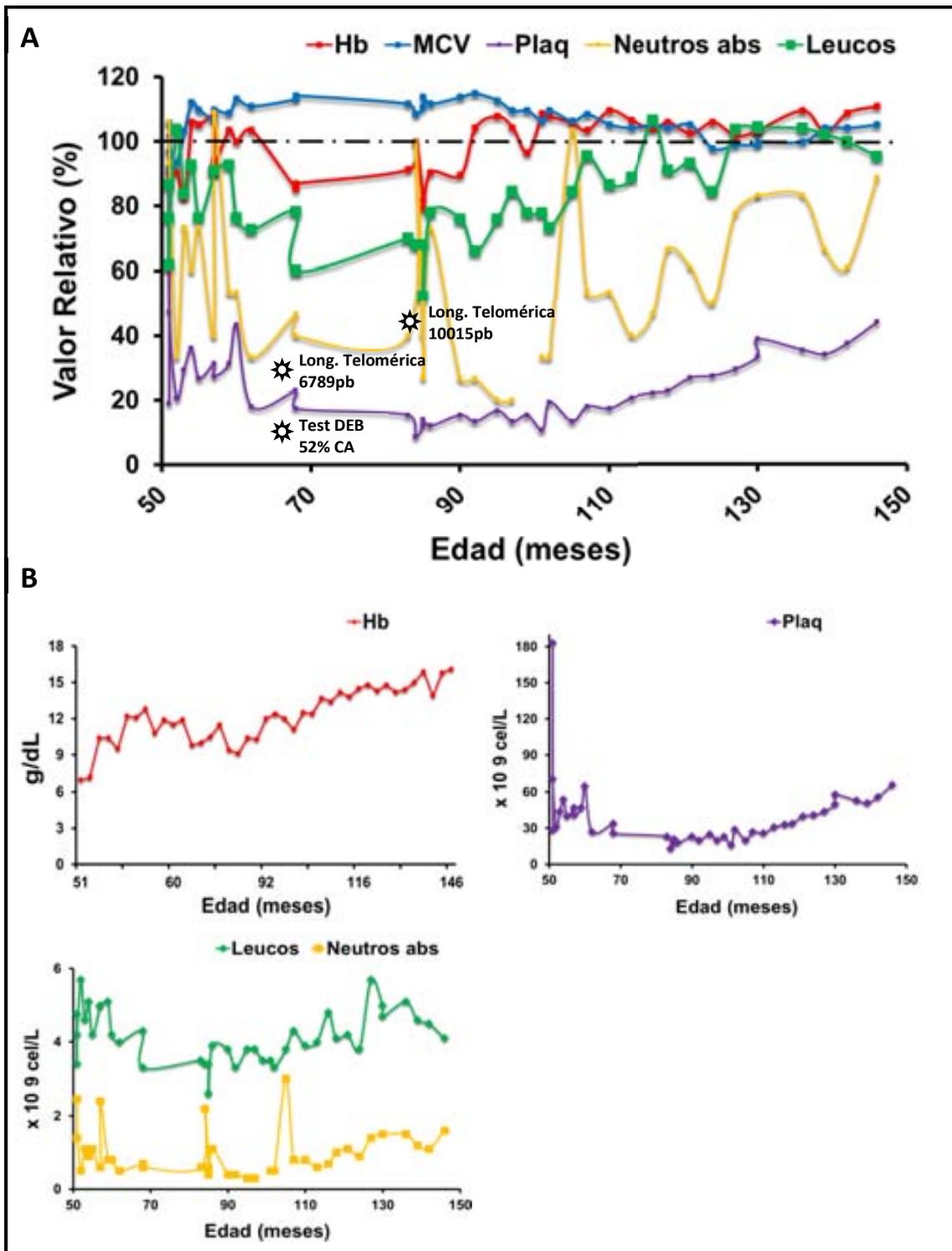


Figura 87. Evolución hematológica del paciente FA328. Seguimiento de la mejoría de todos los conteos sanguíneos por un periodo de 8 años. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB y el *TFR-Southern blot*, hechos un año antes del periodo de inicio de la mejoría hematológica, muestran una fragilidad cromosómica intermedia y unos telómeros cortos para la edad, respectivamente. El *TFR-Southern blot* hecho un año después y justo antes de iniciar el periodo de mejoría hematológica muestra un marcado alargamiento de sus telómeros. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico. Long: longitud.

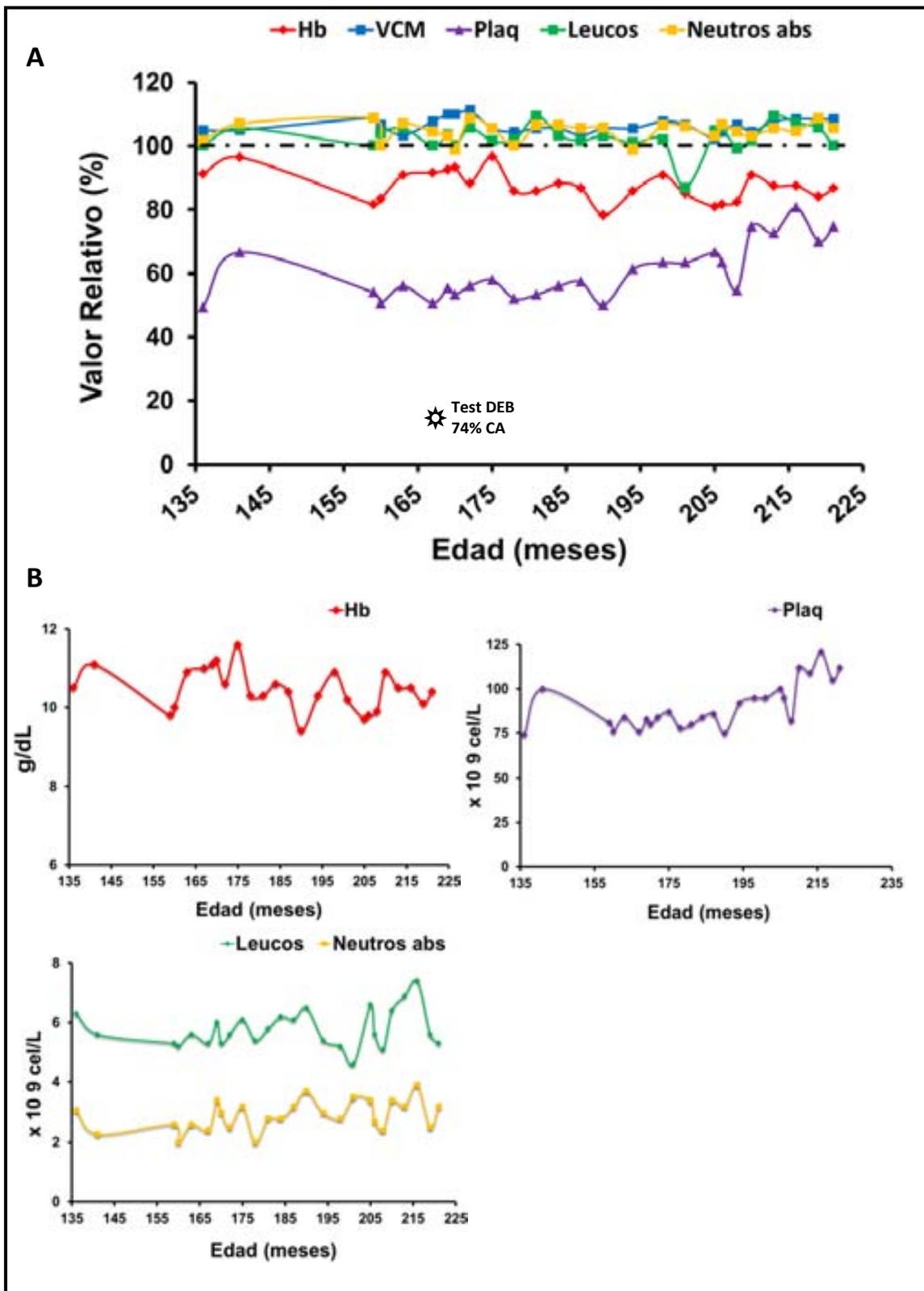


Figura 88. Evolución hematológica del paciente FA378. Seguimiento de la mejoría de todos los conteos sanguíneos por un periodo de 7 años. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. Aunque el ensayo con DEB en SP muestran una fragilidad cromosómica en rango de no mosaicismo, se evidencia una lenta pero sostenida mejoría hematológica. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico.

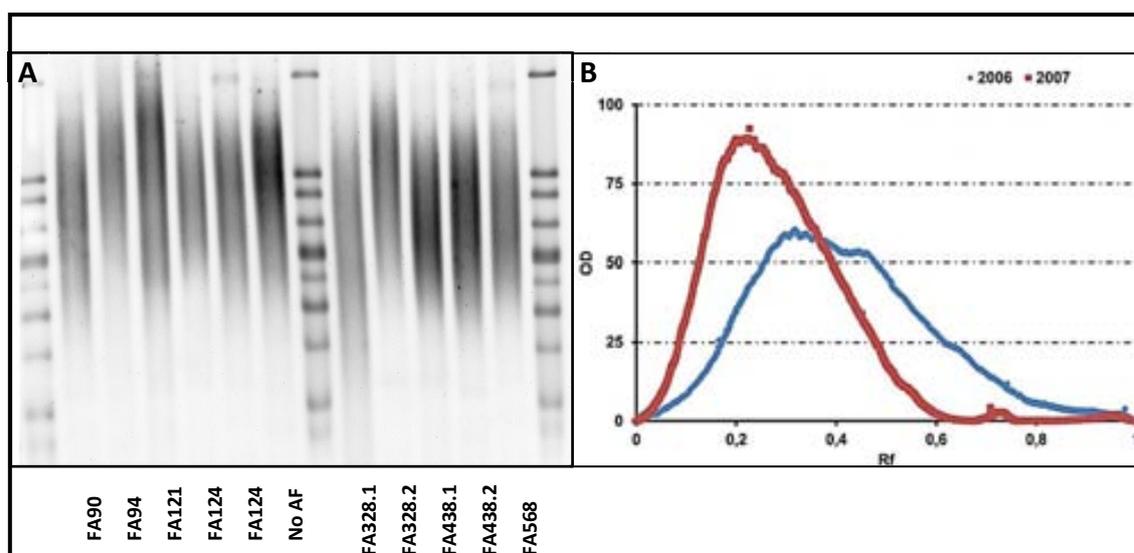


Figura 89. TRF-Southern blot de los diferentes pacientes AF mosaicos. (A) las muestras FA328.1 y FA328.2 representan los resultados obtenidos de dos DNAs con un año de diferencia (2006 y 2007, respectivamente). Las muestras FA438.1 y FA438.2 representan los resultados obtenidos de dos DNAs con tres años de diferencia (2009 y 2012, respectivamente). **(B)** Gráfica de OD vs Rf del paciente FA328, datos del TRF-Southern blot de dos muestras de DNA extraídos con un año de diferencia en el mismo paciente. No AF: paciente no AF.

4.4.2. Pacientes AF mosaicos con mejoría de uno o dos de los linajes hematológicos

En esta cohorte de pacientes AF mosaicos hematológicamente seguidos se identificaron 3 pacientes con mejoría de los conteos sanguíneos de uno o dos de los linajes hematológicos y/o los restantes linajes en rangos bajos estables. Este fue el caso de los pacientes FA438 y FA568.

En estos casos el ensayo de fragilidad cromosómica con DEB dió un rango claramente para mosaicismo, y sin embargo a nivel hematológico se documentó una mejoría parcial con respecto a sus linajes sanguíneos. Un claro ejemplo es el paciente FA568 el cual presenta una trombocitopenia moderada de manera estable durante el periodo de seguimiento (3 años), pero con los demás linajes hematológicos en unos valores normales (ver figura 91). El otro caso lo presenta el paciente FA438 el cual tiene una trombocitopenia leve a moderada, con una neutropenia leve de manera estable durante el periodo de seguimiento (3 años y 6 meses), pero con los demás linajes hematológicos en unos valores normales (ver figura 92). Por otra parte en este mismo paciente se realizó un seguimiento de su fragilidad cromosómica mediante el ensayo con DEB e interesantemente se observó una disminución de su fragilidad

cromosómica del rango de 50-60% CA a un rango de 38-40% CA en un periodo de tiempo de 1 año, el cual se ha mantenido por dos años (ver figura 90). Este resultado sugiere que el ensayo de fragilidad cromosómica podría ser útil a nivel clínico como herramienta de seguimiento para este tipo de pacientes.

En los dos pacientes la longitud telomérica estaba en rangos normales y no mostraban diferencias significativas con respecto a los demás mosaicos. Adicionalmente de las dos muestras de DNA del paciente FA438 (extraídas con tres años de diferencia) en las que se midió sus telómeros, no se encontró ninguna diferencia significativa (ver figura 93); mientras que se si las hubo en el ensayo de fragilidad cromosómica.

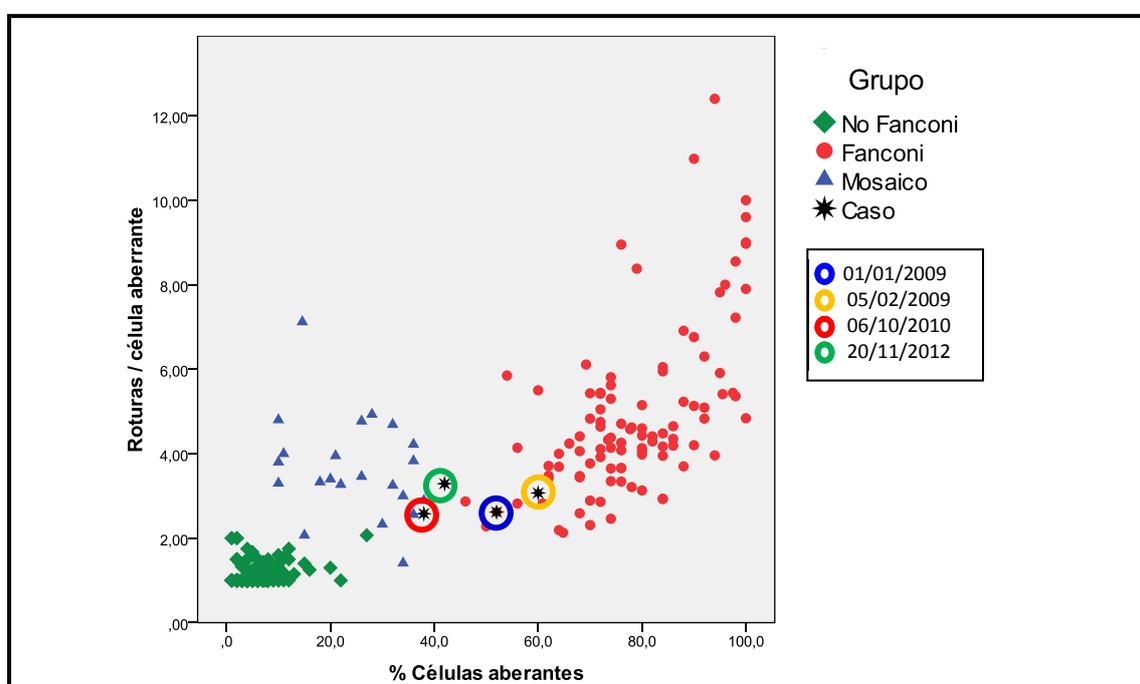


Figura 90. Seguimiento del paciente FA438 por el ensayo de fragilidad cromosómica con DEB en SP. Se documenta claramente dos rangos diferentes de fragilidad cromosómica en este paciente. Los círculos de colores representan las diferentes fechas en que fue realizado este ensayo de fragilidad cromosómica en SP.

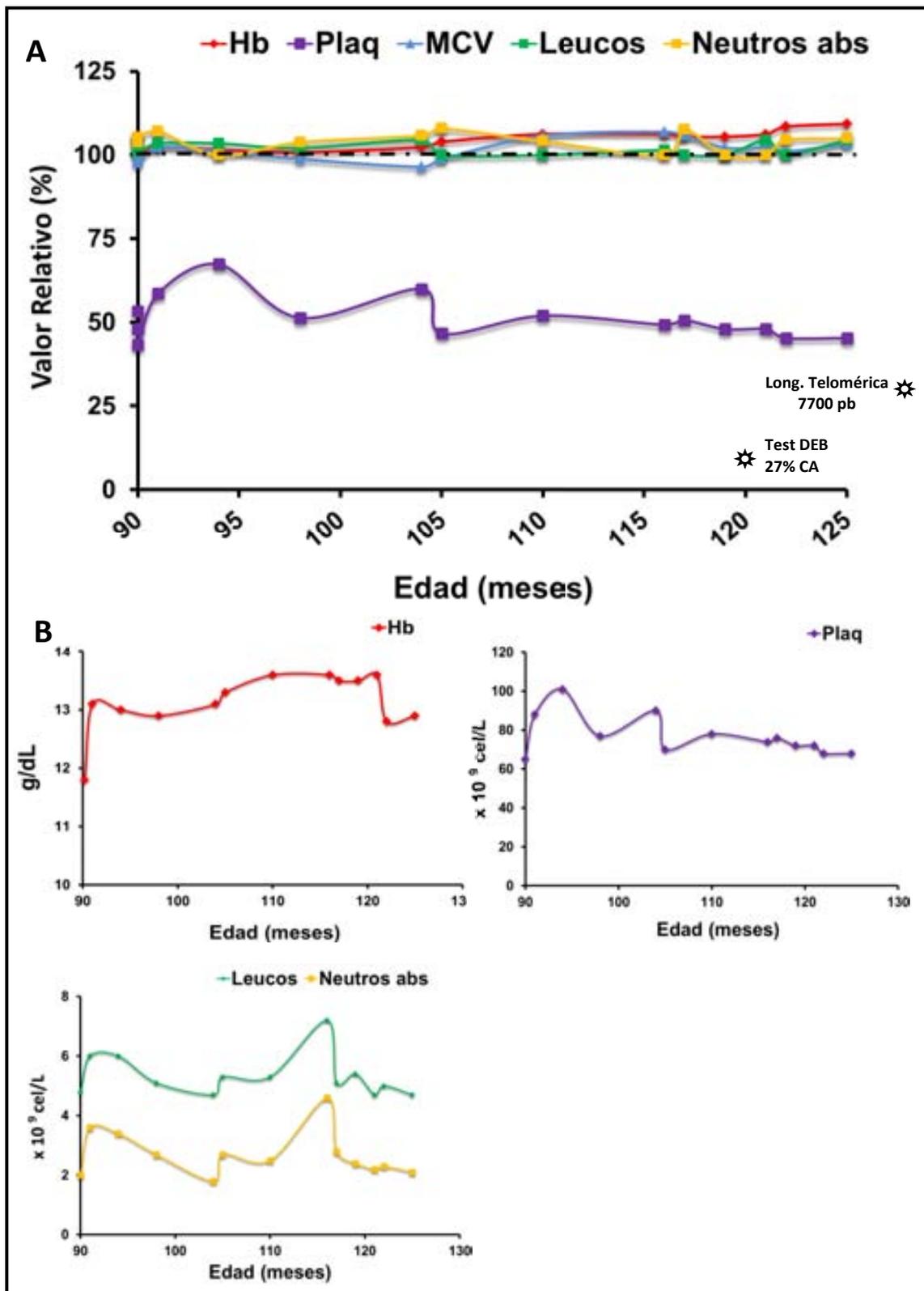


Figura 91. Evolución hematológica del paciente FA568. (A) Llama la atención que aunque presenta unos valores normales para la mayoría de sus conteos celulares sanguíneos, sus plaquetas no llegaron a un rango normal pero se mantuvieron estables. Presentando una fragilidad cromosómica muy baja a los 10 años y unos telómeros en un rango normal para su edad (11 años) **(B)** Las gráficas en bruto permiten seguir la evolución de los diferentes parámetros hematológicos de acuerdo a las unidades en que fueron cuantificadas en el hemograma clínico. Hb: hemoglobina, Plaq: plaquetas, Neutros abs: neutrófilos absolutos.

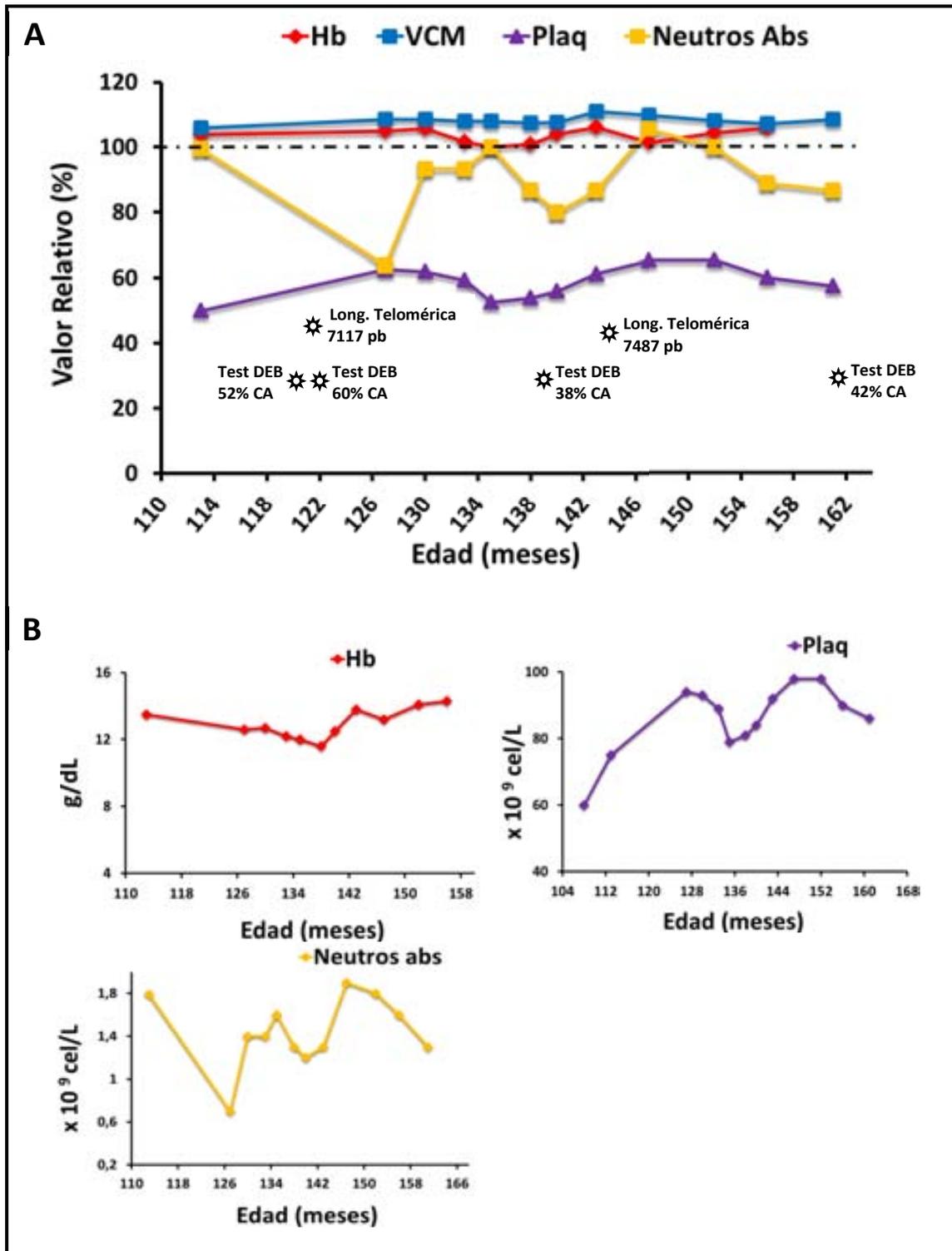


Figura 92. Evolución hematológica del paciente FA438. (A) Llama la atención que aunque presenta unos conteos estables en la mayoría de sus linajes sanguíneos, no hayan llegados todos los casos a un rango normal a pesar de tener una disminución de su fragilidad cromosómica (obtenida por el ensayo con DEB en SP). Por otra parte los valores de la longitud telomérica muestran que no hay un cabo significativo en este valor a pesar del cambio en el ensayo con DEB. Long: longitud. **(B)** Las gráficas en bruto permiten seguir la evolución de los diferentes parámetros hematológicos de acuerdo a las unidades en que fueron cuantificadas en el hemograma clínico. Hb: hemoglobina, Plaques: plaquetas, Neutros abs: neutrófilos absolutos.

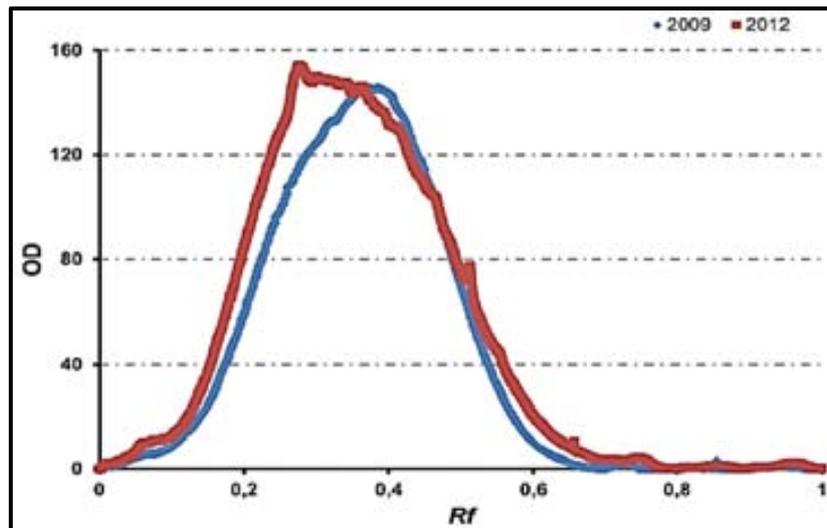


Figura 93. Gráfica de OD vs Rf del paciente FA438. Datos de la longitud telomérica obtenidos mediante *TRF-Southern blot* de dos muestras de DNA extraídos con dos años de diferencia en el mismo paciente.

Estos resultados en conjunto sugiere que este paciente a pesar de presentar una disminución del porcentaje de CA clínicamente no ha logrado tener unos conteos normales de plaquetas (situación similar se observa en los neutrófilos, aunque de manera más discreta) debido a que la célula que ha revertido esta envejecida y tiene poco potencial proliferativo.

4.4.3. Pacientes AF mosaicos con progresivo deterioro de todos sus linajes hematopoyéticos

También se ha identificado el caso de un paciente que a pesar de tener un ensayo de fragilidad cromosómica hecho en SP en un rango claramente mosaico su evolución hematológica fue progresivamente deteriorándose, con una caída de todos sus conteos sanguíneos hasta llevarle a la muerte. Este fue el caso del paciente FA94 (ver figura 94).

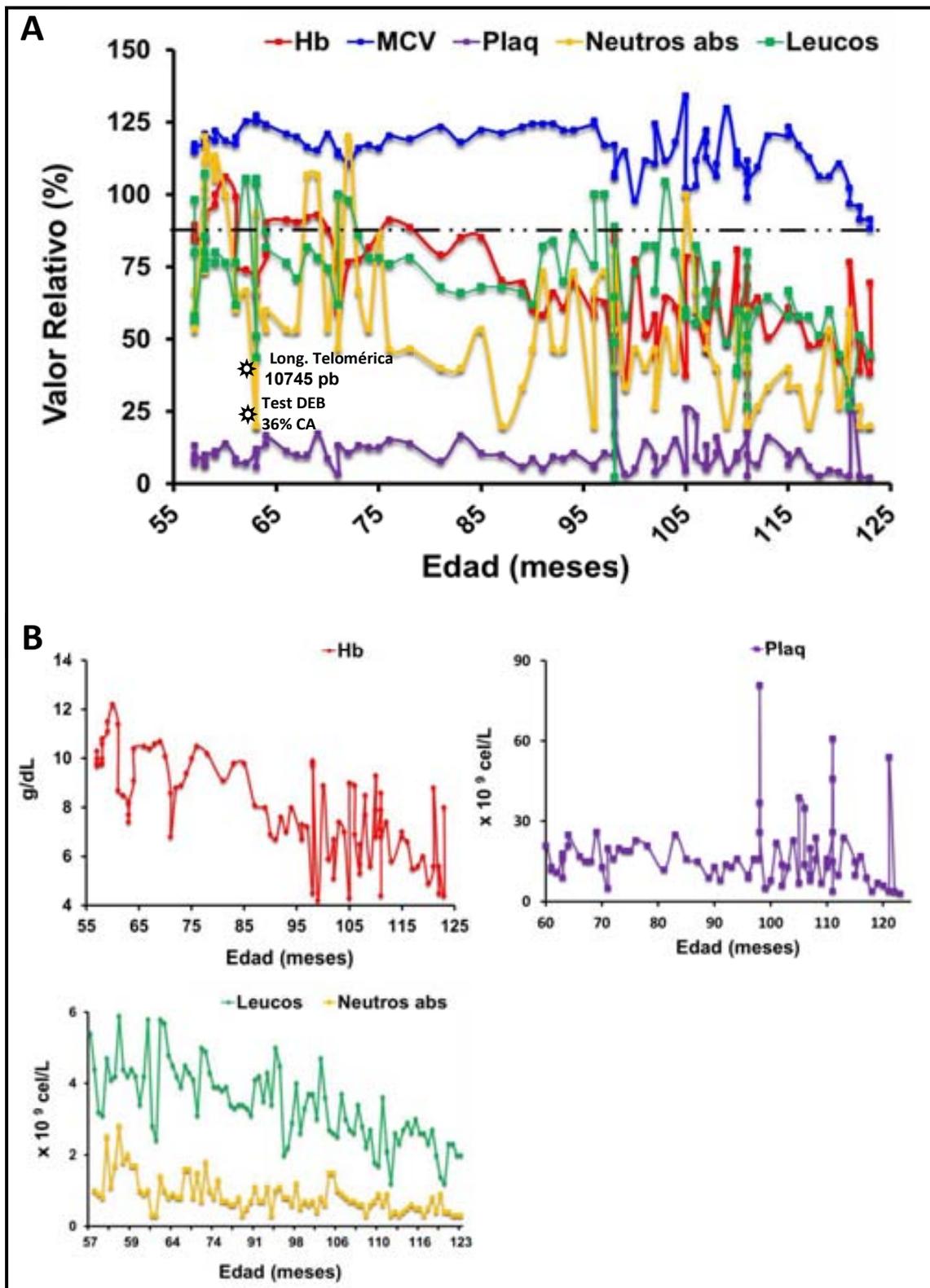


Figura 94. Evolución hematológica del paciente FA94. Desde el inicio de su seguimiento se observó una trombocitopenia severa con una macrocitosis marcada y una progresiva caída del resto de los conteos sanguíneos hasta llevarle a la muerte. **(A)** Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB en SP y la medición de los telómeros, para la misma fecha, muestran una baja fragilidad cromosómica con unos telómeros largos. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados separadamente con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico. Los puntos de subida súbita de los conteos corresponden a transfusiones recibidas. Long: longitud.

Con el fin de entender este caso se analizaron los diferentes estudios llevados a cabo en este paciente. De acuerdo a un análisis hecho por el grupo de la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT (Madrid) en colonias celulares de medula ósea, cuatro años después de haberse realizado el ensayo de fragilidad cromosómica con DEB en SP, vieron que persistía la sensibilidad de estas a la MMC. En cuanto a la longitud telomérica sólo se puede medir de DNA de una sola fecha, a muy temprana edad, y su resultado mostró unos telómeros largos pero en rangos normales para la edad (figuras 89A y 94).

De todos modos, los resultados en conjunto sugieren que no hubo mosaicismo a nivel medular y que por lo tanto el mosaicismo solo era del linaje linfóide, en otras palabras la reversión mutacional sólo ocurrió en los progenitores linfoides de este paciente.

4.4.4. Pacientes AF mosaicos con mejoría de todos los linajes celulares hematológicos pero con súbita recaída hematológica

Por otra parte siempre existe la posibilidad de la recaída como en cualquier otra enfermedad, lo cual es un fenómeno aún más difícil de predecir e incluso de prevenir. En esta situación identificamos dos pacientes, FA49 y FA50, los cuales presentan un periodo estable hematológico estable e incluso con tendencia hacia la mejoría de sus conteos sanguíneos y súbitamente empiezan a desmejorar a pesar de tener un ensayo de fragilidad cromosómica con DEB en SP con baja fragilidad e intermedia fragilidad cromosómica, respectivamente. El ensayo de fragilidad cromosómica en SP para el FA50 mostró una fragilidad cromosómica en un rango dudoso para AF mosaico (50% CA) justo en el periodo en que tres de sus linajes mostraban rangos normales a nivel hematológico (ver figura 96), mientras que en el FA49 el ensayo de fragilidad cromosómica en SP sí mostró un rango claramente para mosaicismo (34% CA) justo en el periodo en donde estaba presentando mejoría de sus conteos plaquetarios (ver figura 95). En el caso del FA50 su deterioro hematológico fue secundario a presentar una LMA, la cual no respondió favorablemente al tratamiento médico llevando al paciente a un fallo de médula ósea severa hasta su muerte. En cuanto al paciente FA49 no está clara la

causa de su deterioro hematológico, lo que se sabe por el registro de su historia clínica fue que presentó repetidos cuadros de neumonía y que estuvo hasta antes de ser sometido a trasplante manejado con estanozolol (andrógeno) a una dosis de 1mg/día. Finalmente hace fallo de médula ósea y se logró realizar un TPH de donante no emparentado y actualmente está clínicamente estable. Desafortunadamente de estos pacientes no se disponía de DNA de sangre y no se pudo realizar la medición de sus telómeros.

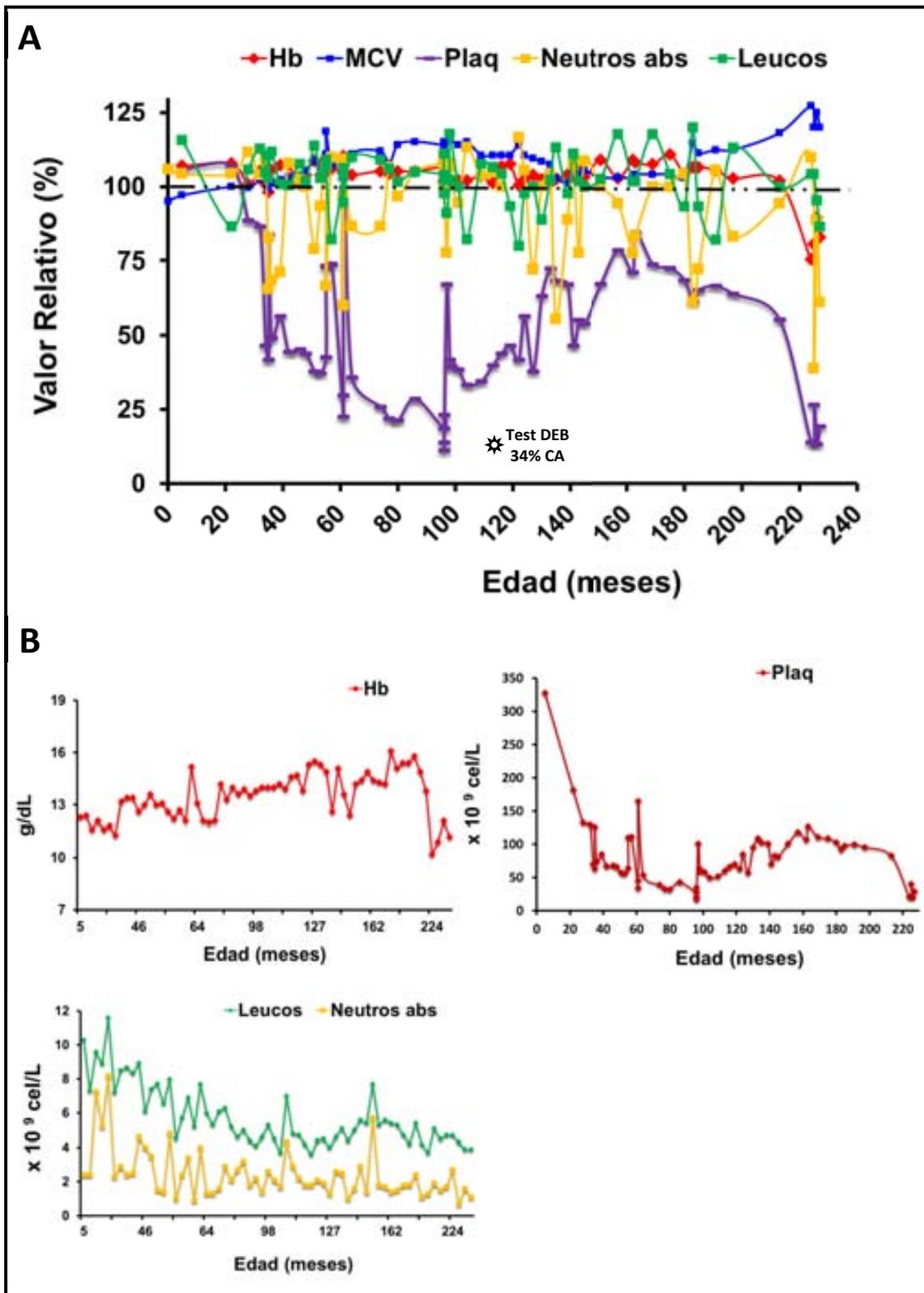


Figura 95. Seguimiento hematológico por 18 años del paciente FA49. (A) Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB fue realizado en SP a la edad de 9 años. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico. Ante el fallo de médula ósea progresivo el paciente es sometido a un TPH de donante no emparentado y actualmente está clínicamente estable.

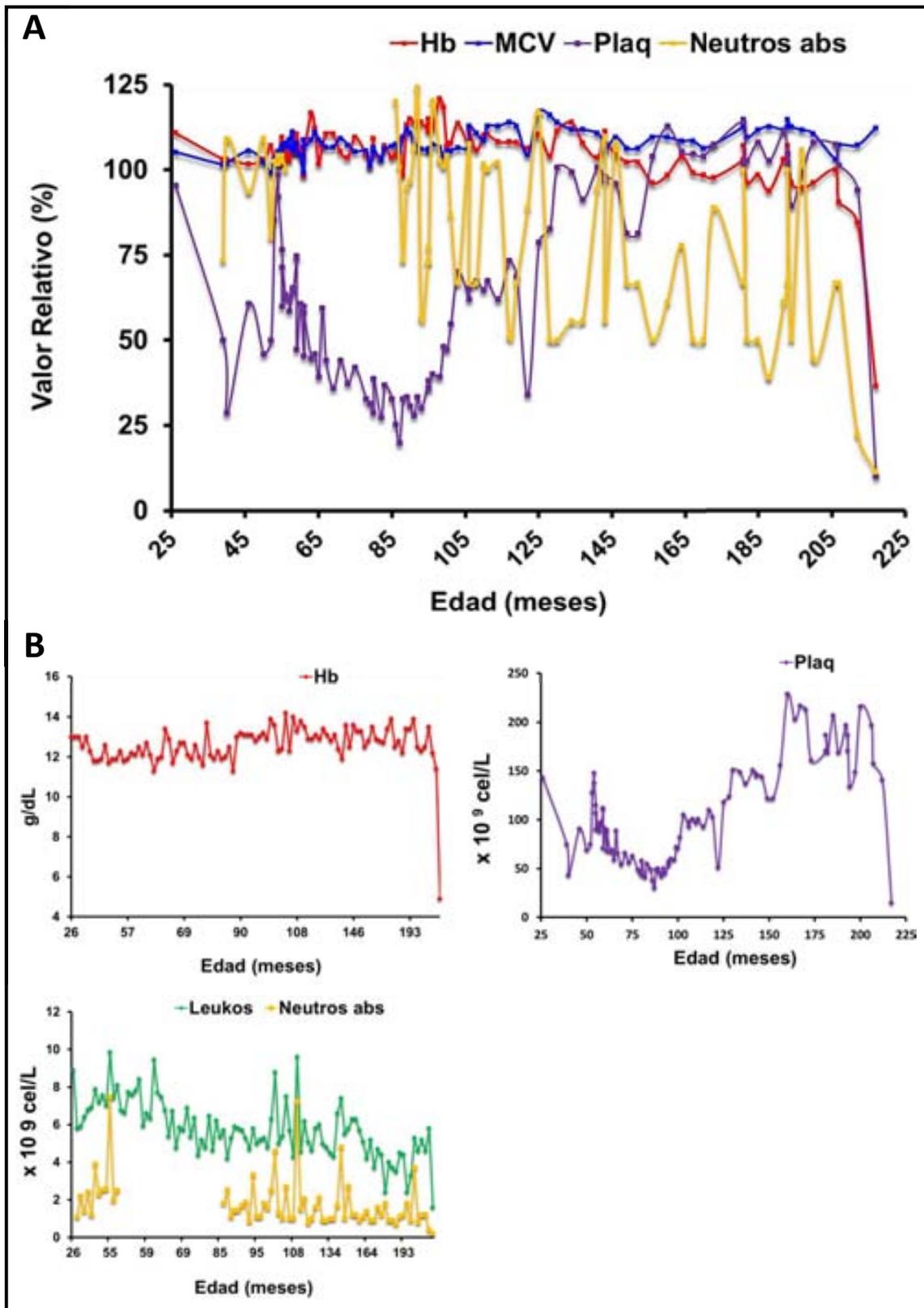


Figura 96. Seguimiento hematológico por 18 años del paciente FA50. (A) Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. El ensayo con DEB fue realizado en SP a la edad de 14 años. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados con sus respectivas unidades según el conteo del hemograma clínico. Paciente finalmente fallece a causa de una LMA que lo llevo a un fallo de médula ósea severa.

4.4.5. Pacientes AF mosaicos con mejoría de todos los linajes celulares hematológicos pero con un ensayo de fragilidad cromosómica en rango no mosaico

El análisis hecho en los datos recogidos de los diferentes seguimientos hematológicos de pacientes evidenció casos de pacientes que a pesar de tener un ensayo de fragilidad cromosómica en el rango de un paciente AF clásico, mostraban mejoría progresiva de su evolución clínica hematológica como si fueran mosaicos. Este fue el caso de los pacientes FA110 y FA378.

El caso del paciente FA110 fue muy interesante de estudiar debido a que por una parte era evidente su mejoría hematológica en todas su líneas celulares (ver figura 98), mientras que en los diferentes ensayos de fragilidad cromosómica hechos en SP no se observó cambios significativos (ver figura 97).

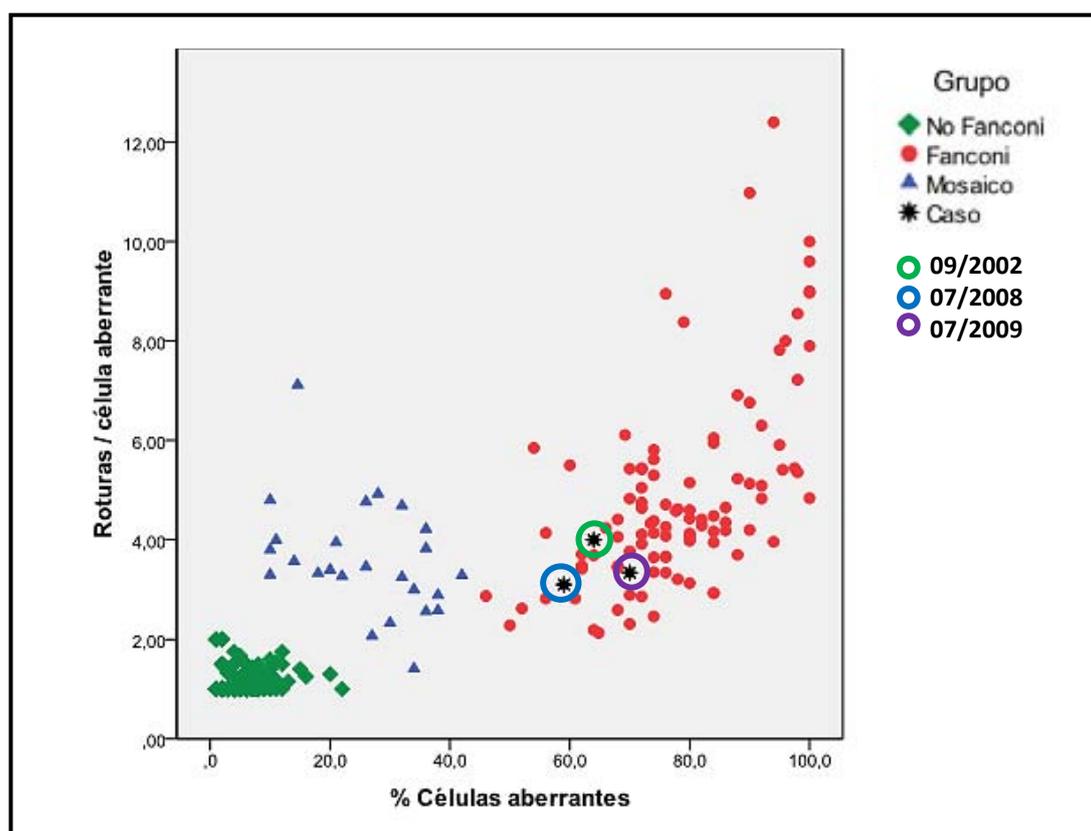


Figura 97. Ensayo de fragilidad cromosómica con DEB en SP del paciente FA110. Llama la atención que el paciente sigue en el mismo rango de fragilidad cromosómica a nivel de linfocitos de SP. Los círculos de colores indican el resultado obtenido por el mismo ensayo para diferentes fechas en el paciente FA 110.

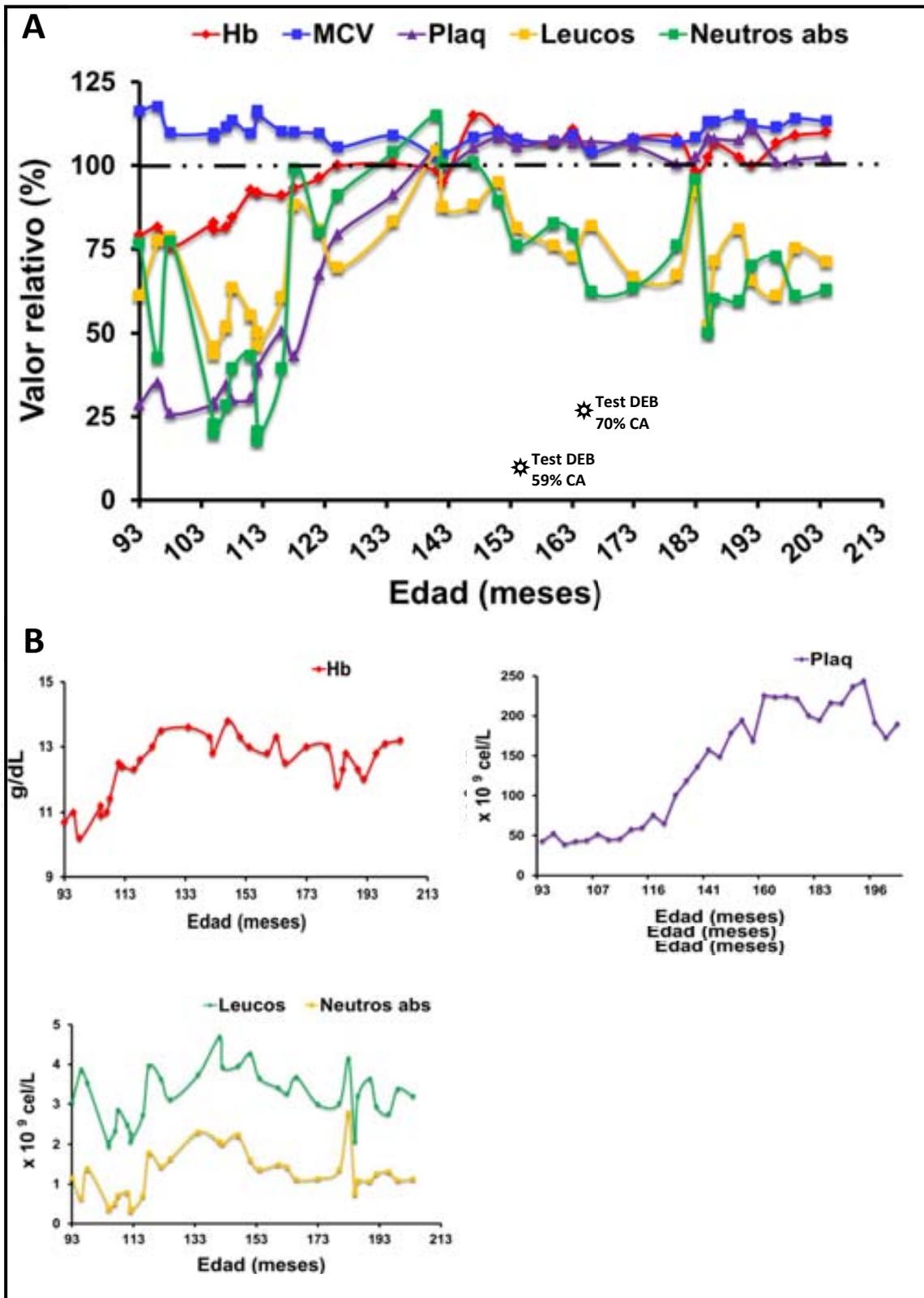


Figura 98. Seguimiento hematológico por 9 años del paciente FA110. (A) Gráfica con los diferentes parámetros sanguíneos relativizados al 100% del valor normal. A pesar de la mejoría clara a nivel hematológico los diferentes ensayos de fragilidad cromosómica en Linfocitos T de SP seguían mostrando una fragilidad cromosómica en rangos de AF clásico. **(B)** Gráficas de los diferentes parámetros hematológicos graficados con sus respectivas unidades según el conteo de un hemograma clínico.

El análisis completo de este caso se hizo gracias a la colaboración del especialista clínico (quien nos proporcionó los datos hematológicos de seguimiento) y al trabajo interdisciplinario realizado con el grupo de la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT, Madrid. Para tratar de entender que era lo que había sucedido en este paciente se hizo un ensayo de sensibilidad a la MMC en colonias celulares de medula ósea. Los resultados mostraron que las células de medula ósea presentaban una resistencia al tratamiento estándar de MMC, lo cual sugería que la reversión mutacional había sucedido muy posiblemente en los progenitores mieloides de MO y no en los linfoides. Por lo tanto la única forma de reafirmar la hipótesis planteada fue extrayendo el DNA de todas las células tratadas así como de los linfocitos de sangre periférica de la misma fecha y buscar la reversión mutacional. Es así como a partir de DNA se realizó el análisis de los dos alelos mutados y se logró identificar diferencias entre el alelo WT y el alelo mutado en la región del exón 11 del gen *FANCA* para el DNA de las colonias de MO tratadas a mayor dosis de MMC. En este DNA se observó un marcado mayor porcentaje del alelo WT con respecto al alelo que presentaba la mutación c.987_990delTCAC (Figura 99A). Esto se confirmó por medio de la cuantificación relativa alelo-específica hecha por medio de una *qPCR* (ver figura 99C), así mismo se evidenció en el ensayo del clonaje de alelos un mayor porcentaje de clones con el alelo WT sólo para las colonias de MO tratadas con la mayor dosis de MMC (ver figura 99B). Estos resultados sugerían que la hipótesis inicialmente planteada era correcta, quedaba la duda de si la reversión estaba solo en las células progenitoras del linaje mieloides o también en el linaje linfoides (ya que la tasa de renovación de los linfocitos puede durar años, células en las que se hizo el ensayo de fragilidad cromosómica en SP). Si era así podía haber la posibilidad de que la reversión mutacional hubiera ocurrido en las células madres hematopoyéticas (células *stem*, CS). Para ello se volvió a analizar una muestra de SP y de MO de la paciente y por selección por citometría de flujo se separaron las células de acuerdo a un marcador específico de membrana.

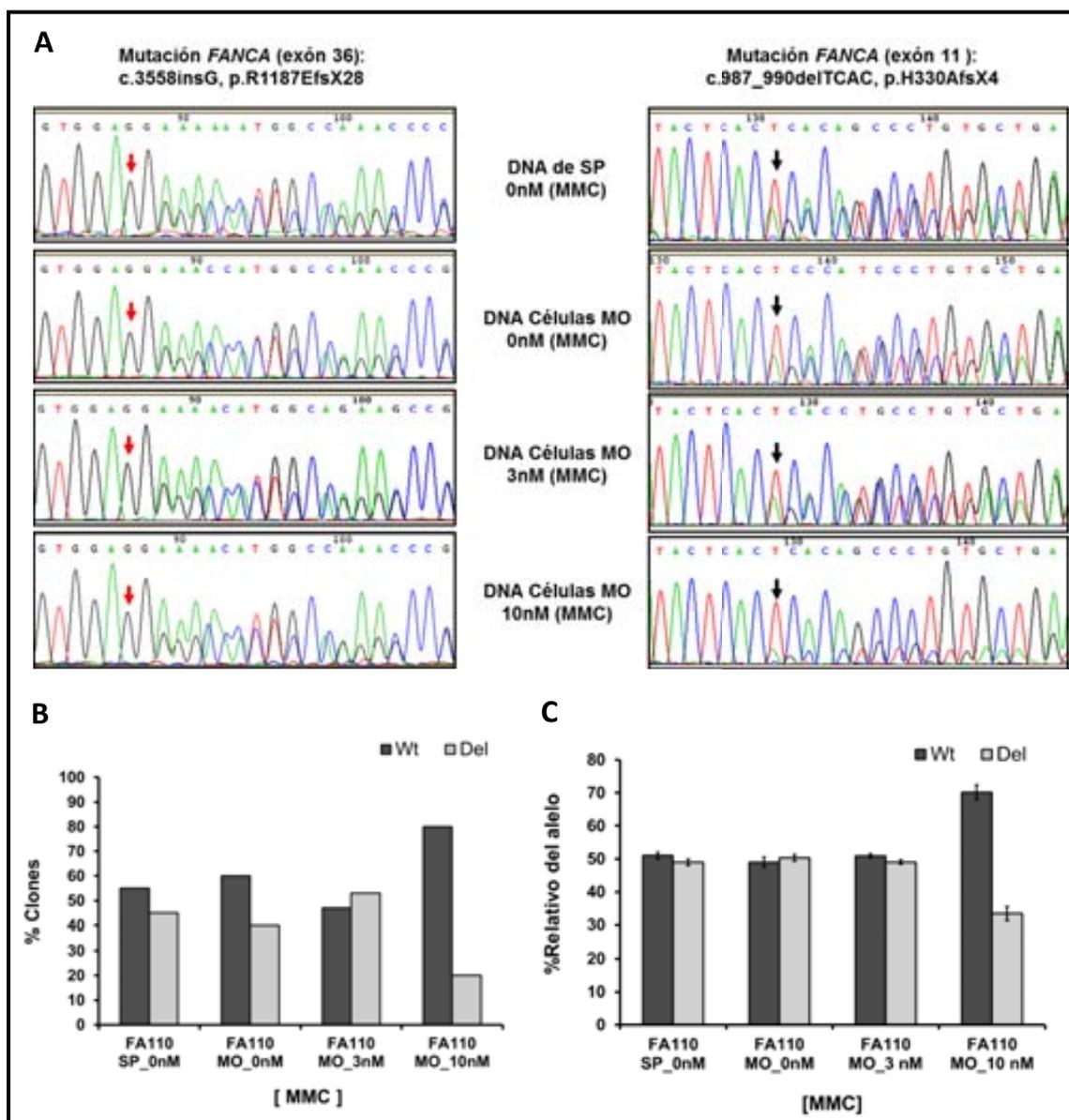


Figura 99. Análisis de la reversión mutacional del paciente FA110. (A) Análisis por secuenciación de regiones mutadas en el gen *FANCA* del paciente FA110. Llama la atención los picos de mayor tamaño de tipo WT en el DNA de las células de MO tratados con la mayor dosis de MMC para la región del exón 11. **(B)** Aislamiento específico de los dos diferentes alelos presentes en el exón 11 del gen *FANCA*. **(C)** Cuantificación relativa por *qPCR* de los diferentes alelos presentes en el exón 11. Tanto en **(B)** como en **(C)** se evidencia una mayor cantidad el alelo de tipo WT en relación con el alelo mutado para la muestra tratada con la mayor dosis de MMC.

Las células seleccionadas en SP fueron: células B (CD3⁺), células T (CD19⁺), células del linaje mieloide (CD14⁺, CD15⁺). Las células seleccionadas en MO fueron: células T, células formadoras de colonias (CFCs) y células madres hematopoyéticas (células CD34⁺). Estas células de MO fueron cultivadas en metilcelulosa con diferentes dosis de MMC con el fin de seleccionar las células resistentes a MMC y posteriormente extraer el DNA. A todas las células se les

extrajo el DNA, el cual fue procesado por secuenciación de Sanger para el exón 11 (*FANCA*) con el fin de determinar el punto donde se dio la reversión mutacional. Sorprendentemente la reversión mutacional se confirmó en todos los linajes celulares, excepto en las células T tanto de MO como de SP (ver figura 100). Estos resultados sugieren que la reversión está en las células madres hematopoyéticas (células $CD34^+$) pero que en las células progenitoras linfoides existe un importante mosaicismo con predominio de células AF.

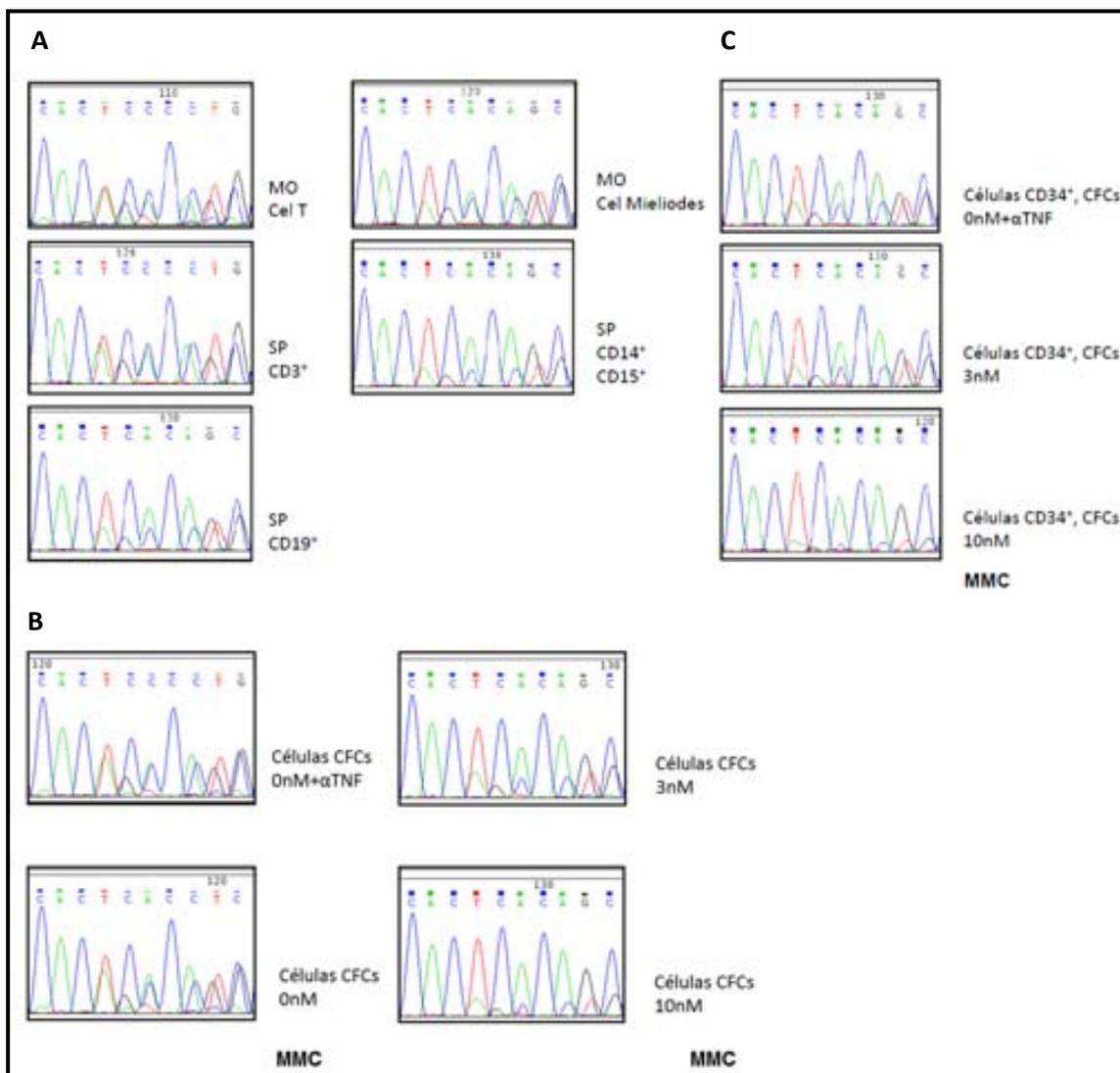


Figura 100. Análisis mutacional de los diferentes linajes hematopoyéticos del paciente FA110. (A) Análisis del exón 11 (*FANCA*) por secuenciación de Sanger de las células T ($CD3^+$), células B ($CD19^+$), células del linaje mieloide ($CD14^+$, $CD15^+$). **(B)** Análisis del exón 11 (*FANCA*) por secuenciación de Sanger de las CFCs tratadas a diferentes dosis de MMC. **(C)** Análisis del exón 11 (*FANCA*) por secuenciación de Sanger de las CSC ($CD34^+$) tratadas a diferentes dosis de MMC. Curiosamente se ve la reversión mutacional en todos los tipos celulares excepto en las células T tanto de MO como de SP.

Finalmente hay que resaltar que aunque el ensayo de fragilidad cromosómica en SP es muy útil para valorar pacientes con mosaicismo, no puede identificar todos los casos, debido a que solo está valorando la fragilidad en un linaje específico (linfocitos T). Por lo tanto se hace necesario analizar e interpretar los valores de un ensayo de fragilidad cromosómica junto con el estudio de la sensibilidad de las células de MO y la evolución clínica hematológica del paciente. De todos modos también queda clara la importancia que tiene el ensayo de fragilidad cromosómica en SP en el seguimiento de los pacientes AF.

Por otra parte, mirando los diferentes comportamientos de los pacientes mosaicos de esta cohorte analizada se puede hipotetizar que es importante tener en cuenta la influencia del microambiente y de la edad biológica de la célula o células revertidas. En el estudio de la longitud telomérica en la serie de pacientes FA mosaicos seguidos hematológicamente, de los 9 pacientes analizados que se pudieron analizar sus telómeros, uno mostró un aumento un año después de su primera medición (FA328). Este caso ya ha sido comentado anteriormente. Los resultados de las longitudes teloméricas para cada uno de los pacientes así como su correlación clínica hematológica se puede observar en la tabla 46 En el caso del paciente FA438 aunque la medición de los telómeros se hizo con un rango de diferencia de dos años no hubo una diferencia significativa en sus resultados, caso comentando ya anteriormente.

Por otra parte ya habíamos comentando el paciente FA94, el cual a pesar de tener un porcentaje de CA en rango de mosaicismo, nunca presentó mejoría clínica y por el contrario su involución hematológica lo llevo a la muerte. En este paciente se hizo el análisis de la longitud telomérica justo en el momento en donde sus conteos hematológicos estaban levemente bajos y curiosamente sus telómeros bastante largos para su edad en comparación con otro paciente AF mosaico que está en el mismo rango de edad (ver tabla 46 y figura 101).

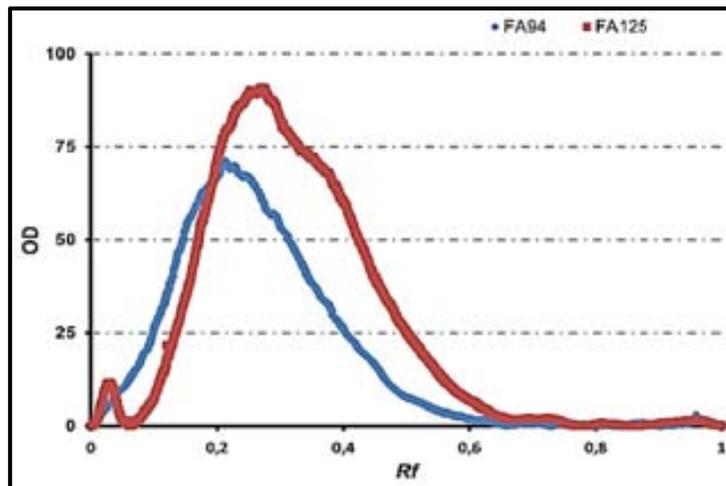


Figura 101. Gráfica de OD vs Rf de los paciente FA94 y FA125. Datos de la *TRF-Southern blot* de muestras de DNA extraídas de SP a la edad de 5 años en estos dos pacientes.

El otro paciente que sorprendió fue el paciente FA121 (ver figura 89A), el cual presentó unos telómeros bastante largos para su edad y coincidió curiosamente con 8 años posteriores al inicio de su mejoría hematológica (ver tabla 46).

Paciente	Fecha de Nac.	Sexo	Edad en el ensayo con DEB	% C.A.	Edad en la muestra de extracción de DNA	Longitud de Telómeros	Evolución clínica Hematológica
FA5	13/04/1984	F	10	36	14	9049 pb	Mejoría parcial en el momento de la muestra, Leucocitos 100% y Neutrófilos 100% en el momento de la muestra.
FA90	14/07/1987	F	14 años	14.6	14 años	8400 pb	Mejoría parcial en el momento de la muestra, Leucocitos y Neutrófilos 25% en el momento de la muestra.
FA94	24/12/1996	F	5 años	36	5 años	10745 pb	Clásica involución hematológica AF, Leucocitos 80% y Neutrófilos 60% en el momento de la muestra.
FA121	26/06/1986	M	15 años	15	16 años	11667 pb	8 años de mejoría hematológica antes al momento de extraer la muestra de SP, Leucocitos 80% y Neutrófilos 100% en el momento de la extracción de la muestra de SP.
FA124	28/04/1989	F	13 años	26	12 años	9111 pb	Mejoría parcial en el momento de la muestra, Leucocitos 80% y Neutrófilos 70% en el momento de la muestra
FA125	27/12/1997	F	5 años	10	5 años	8368 pb	Mejoría parcial en el momento de la muestra, Leucocitos y Neutrófilos en el 100% en el momento de la muestra.
FA328.1	18/12/2000	F	5 años	52	6 años	6789 pb	Muestra antes de mejoría, Leucocitos 62% y Neutrófilos 40% en el momento de la muestra.
FA328.1	18/12/2000	F	5 años	52	7 años	10015 pb	Muestra justo antes de mejoría, Leucocitos 62% y Neutrófilos 40% en el momento de la muestra.
FA438.1	11/06/1999	M	10 años	38	10 años	7117 pb	Muestra tomada dentro de la mejoría, Neutrófilos 90 % en el momento de la muestra
FA438.2	11/06/1999	M	12 años	42	12 años	7487 pb	Muestra tomada dentro de la mejoría, Neutrófilos 90 % en el momento de la muestra
FA568	12/04/2002	F	10 años	27	11 años	7700 pb	Muestra tomada dentro de la mejoría, Leucocitos y Neutrófilos 100% en el momento de la muestra

Tabla 46. Correlación hematológica y longitud telomérica de pacientes AF mosaicos. Estudios llevados a cabo a partir de muestras extraídas de SP.

4.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DEL DGP CON TIPIFICACIÓN HLA

Hemos estado trabajando en la recolección de los datos de las parejas que se han sometido a un proceso de DPG y de tipificación HLA con el fin de tener hijos libres de la enfermedad y a la vez sean HLA compatibles con su hermano AF. Gracias a la colaboración de las familias hemos podido recoger la mayor información posible sobre este proceso en siete parejas españolas realizadas entre el 2005 hasta la fecha (ver tabla 47).

En realidad, aunque parece una opción que resuelve varios problemas del drama de estas familias, el proceso se hace bastante laborioso y estresante para la pareja sometida al proceso de DGP. Como lo veremos por los datos recogidos, muchas parejas requieren de varias rondas de fecundación *in vitro* y de DGP para conseguir un embarazo clínico que finalmente resulte en un recién nacido vivo.

El objetivo de este estudio retrospectivo es recoger los datos de esta experiencia para generar un análisis informativo que sirva de referencia para el clínico que realiza consejo genético y para las parejas que en un futuro quieran considerar este procedimiento.

Lo primero que llama la atención de este proceso es la edad relativamente avanzada de las madres, que tienen una edad media de 39.3 años. Sin embargo, la media de ovocitos obtenidos por ciclo de estimulación fue de 14.1, lográndose una fecundación *in vitro* de un 57% de estos. La mayoría de los procesos de DGP con tipificación HLA fueron llevados a cabo en centros de DGP extranjeros (ver tabla 47).

Pareja	Fecha nac. (madre)	Fecha del ciclo	Centro DGP	Ciclo	Ovocitos log.	Emb. logrados	Emb. sanos	Emb. transferib	Emb. transferidos	Embarazos	Nacidos
1	27/08/1968	/02/2005	RGI (USA)	1	13	6	5	1	1	1	0
		/10/2005	RGI (USA)	2	11	8	4	2	1	1	0
		/02/2006	RGI (USA)	3	9	4	0	0	0	0	0
		/08/2006	RGI (USA)	4	12	9	5	0	0	0	0
		/09/2007	RGI (USA)	5	10	7	?	?	?	?	?
		/01/2009	RGI (USA)	6	5	4	1	?	?	?	?
		Subtotal		6	60	38	15	3	2	2	0
2	04/09/1962	04/07/2005	UZ (Bélgica)	1	4	2	1	0	0	0	0
		03/10/2005	UZ (Bélgica)	2	9	4	1	1	1	0	0
		27/11/2005	UZ (Bélgica)	3	12	6	3	0	0	0	0
		11/01/2006	UZ (Bélgica)	4	7	3	0 (1 Biop)	0	0	0	0
		/03/2006	UZ (Bélgica)	5	7	3	No biop	No biop	0	0	0
		/06/2006	UZ (Bélgica)	6	10	3	0	0	0	0	0
		26/10/2007	IVI (España)	7	10	5	2 (+3#)	2	?	?	0
				Subtotal		7	59	26	7	3	1
3	22/03/1967	/11/2005	RGI (USA)	1	12	9	4	1	0	0	0
		2006	RGI (USA)	2	25	9	5	2	1	1	1
				Subtotal		2	37	18	9	3	1
4	13/11/1967	/02/2006	RGI (USA)	1	17	13	2	1	0	0	0
		/04/2006	RGI (USA)	2	18	13	1	0	0	0	0
		/06/2006	RGI (USA)	3	16	7	0	0	0	0	0
		/08/2006	RGI (USA)	4	17	7	2	0	0	0	0
		/10/2006	RGI (USA)	5	28	13	1	0	0	0	0
		/12/2006	RGI (USA)	6	27	19	2	2	2	0	0
		/02/2007	RGI (USA)	7	29	23	2	3	1	?	0
		/08/2007	RGI (USA)	8	19	17	3	2	2	0	0
		/10/2007	RGI (USA)	9	29	17	3	0	0	0	0
		/02/2008	RGI (USA)	10	36	29	6	2	2	0	0
		Subtotal		10	236	158	22	10	7	0	0
5	03/11/1968	30/03/2009	UZ (Bélgica)	1	18	5	1	1	1	0	0
		13/07/2009	UZ (Bélgica)	2	13	5	1	1 (No T.)	0	0	0
		27/11/2009	UZ (Bélgica)	3	12	3	1	0	0	0	0
		2009	UZ (Bélgica)	4	13	4	0	0	0	0	0
		06/03/2010	UZ (Bélgica)	5	11	6	4 (+1 ^A)	1	1	0	0
		28/06/2010	UZ (Bélgica)	6	17	6	2 (+3 EA)	1	1	0	0
		13/01/2011	UZ (Bélgica)	7	8	3	1 (+2 EA)	0 (1 ^{**})			
		Subtotal		7	92	32	10	4	3	0	0
6	17/07/1971	12/07/2012	RGI (USA)	1	7	5	3 (+1 [*])	1	0	0	0
		10/10/2012	RGI (USA)	2	5	4	1 (+2 ¥)	0	0	0	0
		03/12/2012	RGI (USA)	3	12	6	5	1	1	1	0
		13/05/2013	RGI (USA)	4	10	7	0	0	0	0	0
				Subtotal		4	34	22	9	2	1
7	08/08/1973	12/10/2012	RGI (USA)	1	3	2	0 (+2c)	0	0	0	0
		26/11/2012	RGI (USA)	2	?	?	3	1	1	1	0
				Subtotal		2	6	5	3	1	1
		Total		38	524	299	75	26	16	5	1

Tabla 47. Resultados del Proceso de DGP y tipificación HLA en familias españolas con un hijo afecto de AF. En algunos centros de DGP se realizó un cribado de aneuploidías por *FISH* de los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y o por *PCR*. # 1 embrión con monosomía del 16, 18, 22 + 1 embrión haploide + 1 embrión con trisomía 21. ^ 1 embrión con monosomía del 6. EA= embriones con anormales no especificadas. * 1 embrión con monosomía 18. * 1 embrión con monosomía 6 + trisomía XXX, + 1 embrión con trisomía 21. ¢ 1 embrión con monosomía 21 + 1 embrión con anomalía compleja. ** Embrión y nacido HLA no compatible. No T: No transferido por baja calidad y poco crecimiento. Biop: biopsia.

4.5.1. Eficacia del diagnóstico genético preimplantacional en familias AF

El primero niño medicamento que se consiguió con el DGP y la tipificación de HLA fue para curar hematológicamente a un paciente AF por medio de un TPH (Verlinsky et al., 2001). Sin embargo un estudio específico de familias con hijos afectados por AF sometidas a este proceso valorando su efectividad no ha sido hasta la fecha publicado. Es por hemos que en este trabajo se incluye un

análisis retrospectivo de la tasa de éxito de este proceso en parejas españolas con hijos afectados de AF.

De acuerdo a lo esperado en cuanto a resultados en DGP y de tipificación HLA para los síndromes recesivos el porcentaje de eficiencia debería estar en 18,75% (3 en 16) para la obtención de un embrión no afecto y HLA compatible (Basille et al., 2009; Ingerslev & Hindkjær, 2012).

En la tabla 48 se muestran los resultados obtenidos en cada paso del proceso para cada una de las siete parejas de las cuales recogimos los datos del proceso de DGP y tipificación HLA.

Parejas españolas con un hijo afecto de AF sometidas al proceso de DGP y Tipificación HLA								Total	Media	SD
Pareja	1	2	3	4	5	6	7	7		
Edad Madre	37 años	42 años	38 años	38 años	40 años	41 años	39 años		39.3	1.8
# Ciclos	6	7	2	10	7	4	2	38	5.3	2.9
Ovocitos Logrados	60	59	37	236	92	34	6	524	14.1	7.9
Embriones Logrados	38	26	18	158	32	22	5	299	8.0	6.2
Embriones Sanos	15	7	9	22	10	9	3	75	2.2	1.8
Embriones Transferibles	3	3	3	10	4	2	1	26	0.8	0.8
Embriones Transferidos	2	1	1	7	3	1	1	16	0.5	0.6
Embriones Implantados	2	0	1	0	0	1	1	5	0.2	0.3
Nacidos	0	0	1	0	0	0	0	1	0.03	0.2

Tabla 48. Proceso de DGP y tipificación HLA asociado a AF. Relación de las 7 parejas españolas con un hijo afecto de AF que realizaron un proceso de DGP y tipificación ALH y el número de ciclos al que se sometieron. Cabe destacar que la media de edad de inicio de los ciclos de DGP fue a los 39,7 años.

Como se puede ver, los resultados observados en esta serie de parejas no está cerca de los datos esperados, ya que algunas parejas han requerido varios ciclos para obtener un embrión sano y HLA compatible y aun así no han conseguido que un embarazo que llegue a término.

Del total de 524 ovocitos obtenidos por estimulación en las 7 mujeres sometidas a este proceso, sólo 299 embriones, con una media de 8 embriones por ciclo. El proceso fue llevado a cabo por inyección espermática intracitoplasmática. De estos embriones, se seleccionaron los morfológicamente sanos de acuerdo a criterios de velocidad de crecimiento y número de células generadas por día. De estos embriones morfológicamente sanos en los que se logró realizar la biopsia de un blastómero, se realizó el cribado de las mutaciones responsables de su patología y a su vez la tipificación HLA con el fin de identificar los haplotipos idénticos al correspondiente paciente AF, utilizando un sistema de PCR múltiples. A su vez en algunos centros de DGP se realizó un cribado de aneuploidías de los

cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y, por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o por PCR. De estos embriones que se pudieron analizar genéticamente, 75 fueron hallados sanos (entre ellos se incluyeron portadores en heterocigosis de alguna mutación FANCA, además de los no portadores). De estos embriones solo fueron hallados HLA compatibles 26 embriones sanos y fueron clasificados como embriones transferibles. De estos embriones transferibles solo fueron transferidos al útero 16 de ellos. De estos 16 embriones transferidos solo 5 terminaron en embarazo (confirmado por pruebas hormonales y por ecografía) y finalmente sólo nació un niño. Finalmente, este niño nació en Barcelona para Agosto del 2006 y gracias a la donación de sus progenitores hematopoyéticos de CU y MO, el TPH se terminó realizando en su hermano afecto de AF en el 2007. Esta paciente presentó como complicación posterior al TPH una EICH la cual superó y actualmente está estable. Los resultados del este proceso están esquematizados en la figura 102.

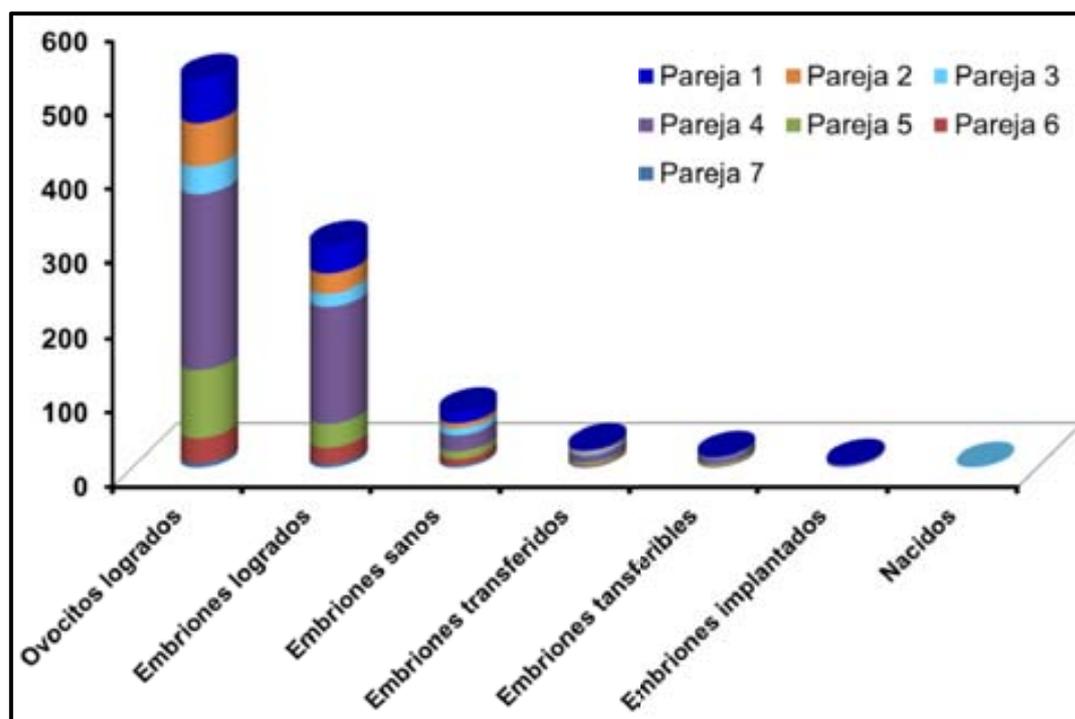


Figura 102. Resultados del Proceso de DGP y tipificación HLA en familias españolas con un hijo afecto de AF.

Es así como podemos decir, que la tasa de nacidos vivos por embrión transferido fue del 6.25% (1 de 16 embriones).

Por otra parte la causa de los 4 abortos no se ha podido documentar. Sin embargo, llama la atención que de un total de 28 embriones sanos cribados para la búsqueda de anormalidades numérica cromosómicas, por FISH o PCR, 15 (53.57%) fueron cromosómicamente anormales (ver tabla 47). Por lo tanto, dada la avanzada edad materna y los datos de aneuploidías hallados, la probabilidad que estos embriones fueran cromosómicamente anormales en algunos de sus 8 pares de cromosomas restante era extremadamente alta.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. ESTADO ACTUAL DEL DIAGNÓSTICO DE LA AF

A nivel mundial los avances en el diagnóstico de la población AF han sido muy dispares en el cual los Estados Unidos y algunos países Europeos, Japón e Israel son los más avanzados, mientras de los demás países apenas están empezando a caracterizar su población o simplemente no hay estudios al respecto. De todos modos, instituciones como el *International Registry Fanconi Anemia* (IFAR) en la *Rockefeller University*, New York y plataformas como la *Fanconi Anemia Mutation Database* han permitido impulsar a nivel mundial la investigación cooperativa, convirtiéndose en referentes no solo de consulta, sino también de apoyo tanto para investigadores, clínicos y pacientes involucrados en algún grado con esta patología. Hasta la fecha hay 1413 pacientes registrado en su base de datos, distribuidos en 16 diferentes grupos de complementación de manera no homogénea, siendo los grupos mayoritarios el FA-A (63.3% del total), FA-C (12.2% del total) y FA-G (8.7% del total).

Por otra parte la implementación de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha permitido mejorar la estrategia de subtipaje de pacientes AF, siendo un buen ejemplo de esto la identificación el grupo de complementación FA-Q por estas nuevas tecnologías (Bogliolo et al., 2013; Vaz et al., 2010).

5.1.1. Población AF española

En España gracias al trabajo conjunto llevado a cabo por la Red Nacional en AF del diagnóstico de estos pacientes el diagnóstico ha mejorado mucho, desde la entrada en funcionamiento del servicio de análisis de fragilidad cromosómica (creado en el 2000 en nuestro laboratorio), se ha enfocado a la confirmación diagnóstica de pacientes AF, que con el apoyo del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades raras (CIBERER), en el 2006, ha adquirido una plataforma especializada en AF. Con su oficialización como laboratorio de prestación de servicios de la UAB (en el 2009), hasta la fecha se han recibido aproximadamente unas 300 muestras de pacientes para

descartar AF ante la sospecha clínica de esta enfermedad de más de sesenta hospitales del servicio nacional de salud y de algunos otros centros extranjeros. Adicionalmente en materia de subtipaje, el grupo de la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético (CIEMAT, Madrid) con la implementación de la complementación con vectores retrovirales de los grupos AF más frecuentes empezó en su laboratorio en el 2000 el servicio de complementación para pacientes AF españoles. Hasta la fecha el trabajo conjunto de ambos grupos y la colaboración de diferentes profesionales clínicas ha permitido llevar a cabo la caracterización genética del 90% de la población AF española (Callén et al., 2005; Casado et al., 2007; Castilla et al., 2011). En cuanto a los estudios de análisis mutacional permitieron identificar una mutación fundadora en la población AF gitana española, lo cual facilitó el subtipaje en pacientes de esta etnia mediante el cribado de esta mutación (Callén et al., 2005). Así mismo, se identificó una alta prevalencia de la mutación brasileña en la población AF en la isla de la Palma, sur de España (Castilla et al., 2011). Además, con la identificación de las mutaciones más frecuentes en el gen *FANCA* en España, se propuso una estrategia de un cribado mutacional para pacientes FA-A (Castilla et al., 2011). En este sentido se ha continuado trabajando con la caracterización mutacional de la población FA-A española. Para analizar los datos encontrados en este trabajo se ha dividido el análisis genéticos de los pacientes en dos periodos, uno desde el 2000 a 2009 y el otro desde 2010 a 2013. Para estos dos periodos, llama la atención el aumento de los casos diagnosticados en el periodo 2010 a 2013, tanto para la población gitana como para la población no gitana. En el caso de la población española no gitana, hasta agosto del 2009 se confirmaron 111 casos de AF, mientras que para agosto del 2013 se confirmaron 157 casos totales, lo cual representa un 41% de la población diagnósticas hasta el 2009. En el caso de la población gitana en el periodo del 2010 al 2013 se identificaron 10 casos más, es decir, esta población aumentó un 43.5% con respecto a la población diagnosticada para el 2009. Este aumento de número de casos identificados también se ha visto en la población de los Estados Unidos, tal como lo plantea un reciente estudio en el cual calculan una mayor frecuencia de portadores de alteraciones genéticas para esta enfermedad (Rosenberg et al., 2011). Estos datos sugieren primero que existía una subestimación de la

población AF y de portadores, y segundo un mejoramiento en el diagnóstico y registro de estos pacientes. De todas formas, en la medida que se mejora el diagnóstico y el registro de estos pacientes se puede plantear un programa de identificación de portadores y de diagnóstico antenatal o prenatal en la población en riesgo con el fin de disminuir la tasa de incidencia de esta enfermedad. En este sentido se ha venido haciendo el cribado de familiares de pacientes (padres, hermanos y algunos otros familiares). Uno de estos casos es el estudio de segregación hecho en familias con hijos afectados (FA434 y FA438) cuya finalidad era iniciar un proceso de DGP. En otros casos se ha hecho el cribado mutacional en familiares de familias afectas (tía del paciente FA145) con el fin de aportar información a su consejo genético que deseaban planear un futuro embarazo o en hermanos asintomáticos de pacientes AF (hermanos de pacientes AF gitanos principalmente). Finalmente, se está iniciando un programa de cribado mutacional en la población de la etnia gitana con el fin de identificar portadores en edad fértil y de esta manera redirigir su consejo genético para futuros embarazos (diagnóstico prenatal). El objetivo final de este trabajo de cribado es contribuir a la disminución de la tasa de incidencia de esta enfermedad en los próximos años.

Con respecto al análisis mutacional del grupo FA-A, de los 119 pacientes FA-A subtipados sólo 88 han sido analizados mutacionalmente. En el 78.4% del total de pacientes se identificó al menos una mutación en la primera ronda (de acuerdo a la estrategia implementada). Si lo analizamos por alelos mutados el porcentaje sigue siendo alto (52.3% de las mutaciones). Aunque es evidente que esta estrategia resulta ser muy laboriosa, tanto en costes como en tiempo, sus resultados permiten afirmar que un alto porcentaje de pacientes podría confirmarse su subtipaje con sólo implementar la primera ronda y al menos en la mitad de los alelos mutados se podría identificar la mutación. Además de poder identificar mutaciones frecuentes en estos exones también cabe la posibilidad de identificar otras mutaciones en estas mismas regiones. Tal es el caso de la MLPA, con la cual en el periodo de tiempo entre 2010 y 2013 se identificaron 4 mutaciones nuevas, lo cual sugiere no sólo la posibilidad de seguir encontrando nuevas mutaciones, sino que sugieren una heterogeneidad mutacional mucho más elevada en *FANCA*. En este sentido, la identificación de mutaciones nuevas y/o no reportadas antes en la población española aportan

más información sobre el espectro mutacional de esta población y sugiere un espectro aún mayor. De todos modos, debido a lo laborioso que resultó la implementación de esta estrategia en el análisis mutacional de los pacientes FA-A (debido al tamaño del gen), el riesgo de no poder identificar mutaciones intrónicas profundas y el hecho de que hay tecnologías de mayor rendimiento y económicamente asequibles, no resulta rentable continuar con esta estrategia. Otro aspecto relevante, enfocado al ensayo de terapia génicas, fue la identificación de pacientes FA-A con al menos una mutación no truncadora (mayoritariamente eran mutaciones de cambio de base que producen una proteína FANCA no funcional y la mutación c.3788_3790delTCT que producen una proteína con un aminoácido menos y no funcional), ya que se tiene pensado iniciar la terapia en este tipo de pacientes debido a la posibilidad de reducción de inmunogenicidad relacionada con la proteína FANCA en pacientes que producen dicha proteína anómala. Del total de 88 pacientes analizados en 31 pacientes se identificó al menos uno de sus dos alelos con una mutación no truncadora (35% del total de pacientes).

Por otra parte, no se pudo encontrar la segunda mutación en DNA de sangre de 5 pacientes mosaicos habiendo finalizado el análisis mutacional, lo cual sugiere una posible retro mutación total de la segunda mutación en el DNA de de leucocitos de SP. En este sentido en dos pacientes (FA125 y FA568) se identificaron dos retromutaciones en el DNA de leucocitos de SP, curiosamente en el mismo tipo de mutación (c.1115_1118delTTGG).

En cuanto al cribado de la población gitana de los 22 pacientes FA-A analizados en 21 se ha identificado la mutación fundadora (95% del total de pacientes) y sólo en un caso se ha encontrado una mutación diferente, lo cual confirma la utilidad del cribado mutacional en esta población y su implementación como herramienta de subtipaje.

Con respecto al análisis mutacional de los otros grupos de complementación durante el periodo 2010 a 2013 es poco lo que se ha aportado, y por ende, dicho espectro mutacional es similar al descrito hasta el 2009, salvo por dos casos que se discutirán a continuación. Con la implementación de la secuenciación del exoma completa en dos pacientes AF sin aún subtipar (FA104 y FA287), se consiguió la identificación de las dos mutaciones implicadas en la enfermedad y se logró el subtipaje de dos pacientes. Cabe

aclarar que, aunque se obtuvo un gran número de datos en un número considerable de genes, el análisis bioinformático permitió descartar la mayoría de genes que no cumplían con el patrón de herencia que se esperaba y/o por variantes ya reportadas como SNPs, seleccionando sólo los genes que presentaban dos mutaciones en heterocigosis compuesta o en homocigosis.

En este caso se identificó un nuevo grupo de complementación en uno de los pacientes (FA104 se asignó al subtipo FA-Q) y se resolvió el subtipaje del otro paciente (FA287 se asignó al subtipo FA-J), lo cual demuestra su gran utilidad en el estudio mutacional de enfermedades monogénicas, así como su potencial aprovechamiento para mejorar la estrategia de subtipaje e identificación de nuevos genes implicados en esta patología (Ameziane et al., 2012; Knies et al., 2012).

En cuanto al paciente FA104 y la identificación de *ERCC4* como gen causante de su patología, permitió la asignación de este gen como nuevo gen AF (*FANCC*) (Bogliolo et al., 2013). Este hallazgo junto con el de otro estudio llevado en paralelo que también demostró la implicación de este gen en el síndrome de Cockayne, permitió establecer 4 síndromes diferentes que pueden generar la alteración genética de este gen (además de los ya mencionados pueden generar XP y XPE), dependiendo de la localización mutacional y la alteración funcional que produzca a nivel proteico (Bogliolo et al., 2013; Kashiyama et al., 2013). De modo que estos hallazgos dejan en evidencia las implicaciones de este gen en salud y enfermedad.

En cuanto al paciente FA287 y la identificación de *FANCF/BRIP1* permitió entender en parte la alta incidencia de casos de cáncer en el pedigrí de este paciente (tanto por rama paterna como por rama materna). Además generó el interés por indagar con otros investigadores sobre otros casos FA-J que tuvieran un fenotipo suave ya que antes no se había descrito en este subtipo de pacientes. Hasta la fecha, de las dos publicaciones hechas sobre pacientes FA-J solo una menciona el fenotipo clínico de estos pacientes, los datos reportados en ese estudio muestran una asociación entre mutaciones truncadoras y un fenotipo hematológico severo (Levran et al., 2005). En cuanto a la correlación genotipo-fenotipo quedó en evidencia que todos los pacientes que presentaban el fenotipo suave tenían al menos una mutación de cambio de base y en su mayoría localizadas en el dominio **Ia**. Resulta interesante poder

identificar este efecto de este tipo de mutaciones, ya que los pacientes en su mayoría han tenido una mayor longevidad con una sintomatología hematológica suave (sin presentar mosaicismo somático), pero a su vez con un riesgo a desarrollar no sólo cáncer de mama, sino también de otros cánceres (tal como se vió en la familia del paciente FA287).

En resumen, aunque estos estudios de secuenciación resultaron costosos (aproximadamente 7,500 euros cada uno en el 2011), actualmente el precio de este mismo estudio ha disminuido sustancialmente (aproximadamente 1,200 euros cada estudio en el 2013) y su costo es mucho más accesible, lo cual permite poder ampliarlo a un número mayor de pacientes.

Por otra parte, los resultados del análisis mutacional por estas nuevas tecnologías requieren su validación, aunque sean claramente patogénicas y estén en el registro de la IFAR. Estas mutaciones siempre debe ser confirmadas por medio de un estudio de segregación en el DNA parental (DNA del padre y de la madre). Es una comprobación de rutina pero necesaria ante un diagnóstico prenatal o preimplantacional. En los dos casos en los cuales se subtiparon por secuenciación del exoma completo se lleva a cabo el estudio de segregación como parte de la validación de los datos.

5.1.2. Población AF de algunos países americanos

En el estudio realizado con una serie de pacientes, en mayor o menor número, de algunos países americanos, parece ser que todos están en un mismo punto a nivel de estudio mutacional para esta enfermedad. Hay que resaltar que aunque algunos de estos ya tienen un servicio de citogenética con experiencia para el estudio de fragilidad cromosómica de los pacientes AF o están en proceso de adquirir dicha experiencia, no hay una red nacional que trabaje en dicha patología, ni tampoco una asociación que agrupe a las familias afectas por esta patología, excepto en Argentina (existe una asociación de pacientes AF). Teniendo en cuanto los lazos históricos entre la península ibérica y estos países americanos, y a su vez, de que los pacientes del subtipo FA-A son los más frecuentes a nivel mundial, se decidió implementar como estrategia de subtipaje la estrategia de cribado mutacional implementadas para el estudio de los pacientes FA-A españoles. Un total de 34 muestras de DNA pacientes AF

fueron recibidas y 5 muestras más procedían de pacientes americanos que vivían o estaban en España para el manejo médico (39 paciente en total). De estas muestras se descartó una para el análisis mutacional por esta estrategia, ya que tenía un patrón clínico recesivo ligado al X. Por lo tanto, de los 38 pacientes, en la primera ronda se identificaron un 18.4% de las mutaciones (14 mutaciones de los 76 alelos mutados). Para la segunda ronda no se puede dar unos datos globales ya que en muchos casos el DNA era de mala calidad o era muy escaso lo cual dificultó continuar con el proceso. De todos modos, vale la pena resaltar que no sólo se identificaron las mutaciones frecuentes de la población española, sino que además se identificaron dos mutaciones nuevas que amplían aún el espectro mutacional de este gen. Adicionalmente, gracias a esta ronda se pudo hacer el subtipaje completo en 13.2% de los pacientes (5 de 38 pacientes), así mismo se pudo identificar al menos uno de las mutaciones en el 31.6% paciente (12 de 38 pacientes). Revisando el tipo e mutaciones identificadas, en la población argentina y mexicana hubo grandes deleciones de exones, mientras que en dos pacientes colombianos se identificó la mutación común del exón 36 y en un paciente mexicano la mutación común del exón 38.

Con estos resultados se puede sugerir que la población AF de países americanos no parece tener la misma frecuencia de mutaciones encontradas en la población española. Sin embargo la población aun no es significativa para poder llegar a conclusiones y hace falta un gran trabajo para mejorar el diagnóstico y estudio de cada población específica.

En el futuro se espera que estos países organicen redes nacionales que permitan el estudio y análisis mutacional de estos pacientes. Para lo cual será necesario no sólo políticas de salud pública orientada en esta enfermedad sino un trabajo por parte de las asociaciones de enfermos para crear la necesidad de grupos de investigación enfocados en el estudio de estas enfermedades raras.

En cuanto al paciente argentino con un patrón recesivo ligado al X, gracias a la colaboración del grupo del Dr. Detlev Schindler se pudo identificar la mutación responsable en el gen *FANCB* y confirmar su subtipo. Adicionalmente, por medio de la colaboración con el grupo argentino no sólo se identificaron 4 pacientes más, sino que se realizó un cribado en todas las mujeres del pedigrí

y se identificaron las portadoras sanas, entre las cuales se hallaban, para ese momento, dos mujeres en estado de embarazo. Esperamos que nuestro trabajo haya sido oportuno para brindarles a estas familias un mejor consejo genético y un manejo ético-médico adecuado.

En cuanto al fenotipo clínico de estos pacientes FA-B, cabe destacar que el paciente I presentaba un conjunto de malformaciones que se enmarcarían dentro de la asociación del acrónimo VACTERL-H lo cual va en concordancia con diferentes publicaciones hechos al respecto en pacientes FANCB. Esta relación entre la asociación VACTERL-H y AF dentro de un patrón de herencia recesivo ligado a X agrega un caso más dentro de esta serie de pacientes y ayuda a darle robustez a la asociación que han visto entre este fenotipo y el subtipo de paciente FA-B (Alter & Rosenberg, 2012; McCauley et al., 2011).

Adicionalmente, en nuestro estudio se demostró en 6 de las 9 mujeres portadoras sanas que tenían inactivado el alelo mutado en DNA de células de SP, concordante con los resultados de estudios previos realizados, los cuales en conjunto identificaron 9 casos similares (McCauley et al., 2011; Holden et al., 2006; Meetei et al., 2004). En el estudio realizado por Meetei y colaboradores demostraron que la inactivación del alelo mutado se daba en células de sangre, piel y orina. Este patrón de inactivación sesgada en múltiples tejidos sugiere que la expresión celular del alelo mutado en *FANCB* está sujeta a una fuerte selección negativa durante la embriogénesis. Patrones similiares se han observado en otras enfermedades genéticas ligadas al sexo como el síndrome de Wiskott-Aldrich y el síndrome del X frágil (Andreu et al., 2003; Heine-Suñer et al., 2003).

5.1.3. Población AF de otros países

En cuanto a la colaboración prestada con algunos países europeos, está la cooperación con unos de los grupos de referencia de Portugal, así como algunos pacientes de Serbia y un paciente de Bélgica. Adicionalmente se recibieron muestras de dos pacientes africanos que provenían del grupo portugués. Solo en los pacientes europeos se obtuvieron resultados. En los pacientes portugueses se pudo subtipar uno completamente y en dos parcialmente (en estos casos se identificó una de las dos mutaciones). En

cuanto a los pacientes Serbios no solo se realizó su subtipaje por WB, sino que en el caso del paciente FA-A se reconfirmo el subtipo del paciente utilizando la estrategia de cribado mutacional para FA-A española. En cuanto al paciente Belga, su subtipaje se realizó por medio de la expresión proteica de linfocitos de SP y en la primera ronda se identificó una de las dos mutaciones de *FANCA*, reconfirmando su subtipo FA-A. Con respecto a los pacientes africanos, cuyos lazos históricos estaban ligados con Portugal, a pesar de implementar la primera y segunda ronda, no se obtuvieron resultados positivos. Con los resultados obtenidos en esta serie de pacientes es claro que aunque el cribado mutacional con el gen más frecuente es una buena estrategia, cuando se están analizando pacientes de otras poblaciones y en un número tan pequeño resulta muy laborioso el llegar a un subtipaje, más cuando no se sabe si se está ante un paciente FA-A. Por lo tanto implementar esta estrategia de cribado mutacional en FA-A en otras poblaciones no estudiadas solo tiene sentido después del subtipaje.

Por el contrario el poder disponer de SP o líneas celulares, es muy útil para abordar el subtipaje de pacientes AF. Un ejemplo claro fue el obtenido en la serie de pacientes serbios en los cuales 3 de los 4 pacientes analizados por expresión proteica mostraron ser FA-D2. Estos resultados de 3 pacientes FA-D2 junto con el dato de haber un paciente más FA-D2 (Joksic et al., 2012), aunque el número de pacientes es muy pequeño, sugiere la posibilidad de un efecto fundador en esta población. Para ello se requeriría en el futuro un análisis mutacional de estos pacientes. Adicional de los 3 pacientes FA-D2 subtipados en nuestro servicio dos presentaban microcefalia, dato que va en la dirección de la asociación de microcefalia con este subtipo AF (Kalb et al., 2007).

Así como ya se comentó, la implementación de las nuevas tecnologías facilitara la caracterización genética de estas poblaciones.

5.1.4. Estudios de secuenciación de alto rendimiento en el subtipaje y caracterización mutacional de los pacientes AF

En la actualidad diferentes grupos de investigación han puesto a punto plataformas de secuenciación de alto rendimiento para completar el subtipaje

de los pacientes que aún no han podido subtipar, así mismo, cambiar la estrategia de subtipaje de sus pacientes AF con la implementación de estas tecnologías. En estas plataformas se han incorporado diferentes técnicas de secuenciación de alto rendimiento (secuenciación genómica y transcriptómica) con el fin de obtener una mejor estrategia de subtipaje para los pacientes AF (Ameziane et al., 2012; Knies et al., 2012).

La ventaja que ofrece este abordaje es que permite capturar mucha más información, ya que, no sólo permite identificar los SNPs asociados a una enfermedad, sino también permite identificar mutaciones en un gen determinado asociados a la enfermedad que se está estudiando. Esto último ha tenido un gran impacto en el estudio de diversas enfermedades monogénicas.

Las diferentes publicaciones en este aspecto resaltan la importancia no sólo para la identificación de nuevos genes, sino la identificación de nuevas mutaciones dentro de los diferentes genes, ya que la informatización de estos datos permitirán en un futuro próximo tener una base de información más completa que incorporado a las nuevas tecnologías facilitarán el análisis de datos (Ameziane et al., 2012; Knies et al., 2012; Mamanova et al., 2010; Schuster, 2008).

En el aspecto ético, es importante tener claro, que el consentimiento informado para este tipo de estudios no puede ser el mismo que el que se realiza para una secuenciación tipo Sanger. Antes de realizar un estudio de secuenciación masivo no sólo hay que explicarle al paciente la cantidad de información que se puede obtener de este estudio, sino que además, dejar en el paciente la decisión de querer saber toda la información relevante obtenida (hallazgos incidentales) o sólo centrarse en lo que se relaciona con su patología o sencillamente poder renunciar al proceso de estudio en cualquier etapa del mismo (Ayuso et al., 2013). Además, en caso que el investigador desee conservar los datos para estudios bioinformáticas u otro tipo de investigación no solo debe pedir el consentimiento informado al paciente sino que además debe garantizar la confidencialidad de los datos del paciente.

Por todo lo comentado anteriormente sugerimos la implementación de plataformas de alto rendimiento, con adecuados consentimientos informados, para el subtipaje y diagnóstico molecular de esta patología en la población española, ya que ahora es posible reducir significativamente el tiempo y los

costos de la secuenciación del exoma completo. Una alternativa que se puede explorar y que nosotros la estamos trabajando es la de crear un panel de secuenciación de sólo genes candidatos enfocados a síndromes de inestabilidad genómica o a síndromes de fallo medular o a ambos. Hasta la fecha hemos diseñado dos modelos, un panel en donde se incluían la mayoría de genes implicados en los síndromes de inestabilidad y fallos medulares congénitos y un segundo panel donde se incluían 28 de estos genes (datos no mostrados). El objetivo de diseñar dichos paneles en AF es poder realizar no solo el diagnóstico molecular de AF sino también incluir los diagnósticos diferenciales de otros síndromes de inestabilidad genómica y de fallo medular congénito, especialmente aquellos síndromes en donde hay un solapamiento clínico, citogenética o de ambos. En la figura 103 se esquematiza el planteamiento de la nueva estrategia de subtipaje de pacientes con AF y otros síndromes relacionados.



Figura 103. Estrategia de subtipaje de pacientes AF y síndromes relacionados. Gracias a la implementación de las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento se pueden diseñar y validar un panel de genes candidatos para síndromes de inestabilidad (incluidos los genes AF) y fallos medulares congénitos, siguiendo el esquema de confirmación diagnóstico de esta gráfica. Cabe resaltar que los resultados de secuenciación siempre deben ser validados con estudios de segregación y en casos de genes nuevos con estudios funcionales.

Además la implementación de estos paneles de captura específica de genes evita llevar al paciente directamente a un proceso de secuenciación masiva del exoma, con todas las implicaciones éticas que ello puede conllevar. De todos modos en casos de que esta estrategia no permita identificar el gen afectado en estos pacientes, se hace necesario llevar al paciente a realizar una secuenciación masiva previo consentimiento informado específico para esta prueba.

5.2. CORRELACIÓN DEL FENOTIPO CLÍNICO Y CELULAR DE LOS PACIENTES FANCONI-LIKE Y OTROS FENOTIPOS CELULARES SOLAPANTES

Con resultados obtenidos en la serie de pacientes Fanconi-like, los cuales presentaban un fenotipo clínico solapante con AF y que a pesar de no tener una fragilidad cromosómica, presentaban una parada intermedia del ciclo celular en fase G2/M y una sensibilidad intermedia a MMC quedando de manifiesto cierto grado de correlación entre el fenotipo celular y clínico. En esta serie de pacientes hay que resaltar que todos tenían un cuadro clínico sindromático solapante y habían dos familias con un par de hijos afectados. Por los resultados hallados resulta interesante continuar el estudio genético de estos pacientes ya que se ha identificado una correlación evidente entre el fenotipo celular y clínico, en donde el posible gen implicado esté relacionado con una función redundante en la reparación de ICLs, como es el caso del gen *FAN1*.

Curiosamente, los estudios citogenéticos de pacientes con la microdelección 13q13.3 en homocigosis, que incluía la delección de *FAN1*, a pesar de presentar un fenotipo celular idéntico a los pacientes Fanconi-like no presentaban un fenotipo clínico-hematológico similar a AF. Adicionalmente un estudio hecho para la misma fecha identificaron pacientes con Nefritis intersticial cariomegálica causadas por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en *FAN1* (mutaciones identificadas por secuenciación exómica) (Zhou et al., 2012). Estos pacientes a pesar del presentar algunas de las anomalías congénitas de AF, las características clínicas de estos individuos diferían del fenotipo clínico de individuos con AF. Al igual que nuestro estudio

las células de estos pacientes (deficientes en FAN1) presentaban una sensibilidad intermedia a los agentes inductores de ICLs (Trujillo et al., 2012; Zhou et al., 2012). Estos resultados en conjunto sugieren que este gen tiene un papel redundante en la reparación de ICLs en el DNA.

Estos datos en conjunto remarcan la importancia del análisis citogenético completo de las células de pacientes con algún grado de solapamiento clínico y su interpretación de manera conjunta con la clínica. En este sentido, publicaciones sobre otros síndromes de inestabilidad genómica (síndrome de rupturas de Nijmegen, síndrome de Roberts y síndrome de rupturas de Varsovia) han mostrado una fragilidad cromosómica similar a la de un paciente AF mosaico, lo cual deja en evidencia que la fragilidad cromosómica también se presenta en otros síndromes además de AF (Lelij et al., 2010; New et al., 2005; Petra van der Lelij et al., 2010). Por ello los autores recomiendan en el estudio de pacientes clínicamente atípicos incluir otros análisis citogenéticos.

Además, debido al solapamiento del fenotipo clínico y/o celular resulta importante la implementación de la secuenciación masiva de exoma para la identificación del gen o genes implicados en la patología de estos pacientes, proceso en el cual actualmente se encuentran 6 de nuestros pacientes Fanconi-like.

5.3. FENOTIPOS HEMATOLÓGICOS EN LOS PACIENTES AF CON MOSAICISMO POR REVERSIÓN MUTACIONAL SOMÁTICA A NIVEL HEMATOPOYÉTICO

Debido a que hay muy pocos estudios realizados en pacientes AF mosaicos por reversión mutacional, y ninguno a largo plazo, es difícil poder establecer unos criterios claros de clasificación, seguimiento y pronóstico en estos pacientes. Su estudio es relevante por ser una “terapia génica natural”. Nuestro trabajo representa el análisis retrospectivo a largo plazo de una serie de pacientes AF de este tipo de mosaicos. Los resultados han permitido identificar unas características específicas dentro de la población analizada, establecer unos criterios de análisis, seguimiento y clasificación.

La identificación de los pacientes AF mosaicos normalmente se realiza por evidencia clínica de una mejora o una estabilidad hematológica de los

pacientes y/o por la evidencia en el ensayo de fragilidad cromosómica de unos porcentajes inferiores a los de un paciente AF clásico. De acuerdo a estos dos criterios los pacientes fueron tomados como mosaicos por reversión a nivel hematológico, identificando un 21.65% de pacientes (34 de 157 pacientes AF españoles) en la población española, rango muy similar a lo descrito por Lo Ten Foe y colaboradores (Lo Ten Foe et al., 1997). De estos pacientes en los que se pudo hacer la recolección de datos hematológicos, 14 de 34 pacientes, se evidenció cuatro tipos de evolución hematológica: los que mejoraban totalmente (la mayoría de pacientes), los que mejoraban solo uno o dos de sus linajes celulares sanguíneas mientras que el otro linaje o linajes se mantenían estables sin nunca llegar a los valores normales (2 de 14 pacientes), los que presentaban una mejoría prolongada y posteriormente hacia una recaída sin recuperación (un bajo porcentaje) y los que nunca mejoraban y finalmente fallecieron a pesar de ser mosaicos citogenéticamente (1 de los 14 pacientes). De acuerdo con estos patrones se revisaron los estudios de fragilidad cromosómica en SP y estudios de sensibilidad a MMC en MO, con estos dos datos se pudo establecer que todos aquellos pacientes que tuvieron una mejoría de parcial o total de sus linajes y que tenían estudios de sensibilidad tanto en SP como en MO, eran resistentes a agentes inductores de ICLs, lo cual indican que el mosaicismo se había dado en las células madre de MO. En este sentido los resultados de identificación del evento de reversión mutacional en uno de estos pacientes a nivel de células madre hematopoyéticas, permiten confirmar lo dicho anteriormente.

Adicionalmente los estudios de telómeros en algunos pacientes revelaron unos datos interesantes. En un caso de mejoría hematológica progresiva, la medición en dos tiempos diferentes de los telómeros, identificó un aumento significativo de los telómeros en este paciente. El alargamiento de sus telómeros lo hizo justo en paralelo de mejoría hematológica y la gráfica de la distribución de la longitud telomérica pasó de una curva heterogenea a una curva más homogénea, lo cual sugiere la medición telomérica de un mismo clon. Mientras que en otro paciente con mejoría de algunos de sus linajes hematológicos no mostró diferencias de la longitud de tamaño telomérico a pesar de tener una dismunición de la fragilidad cromosómica en los dos periodos en los que se hizo o se extrajo la muestra para ambos ensayos,

aunque hacen falta estudios más exhaustivos a nivel molecular. Estos resultados en conjunto sugieren que no sólo la reversión mutacional es importante para la mejoría hematológica sino que también es importante la edad biológica de la célula revertida, aunque no se descarta la influencia del microambiente hematopoyético. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de células CD34+ transducidas en un ensayo de terapia génica, mayor es la probabilidad que se infecten y expandan células altamente proliferativas que puedan mantener el estado hematológico del paciente de por vida. En este contexto será interesante analizar los telómeros de los pacientes pre-terapia y post-terapia génica.

En cuanto a los pacientes que presentaban una mejoría prolongada y posteriormente hacían una recaída sin recuperación, en uno de los pacientes la recaída estuvo asociada a la presentación de LMA (la cual lo llevó a la muerte). En el otro no está clara la causa de su recaída, en el cual fue hecho un TPH y está clínicamente estable. Estos resultados sugieren que el tener una mejoría hematológica no excluye una involución clínica hematológica posterior, ni protege de presentar una malignidad hematológica, pues inevitablemente aún persistían células no revertidas en MO. Estos resultados indican que la terapia génica, sobre todo en ausencia de desacondicionamiento, no eliminan al 100% el riesgo de LMA. Desafortunadamente en estos pacientes no se pudo hacer una medición de telómeros por no tener muestras de DNA.

En cuanto al paciente que presentó una involución progresiva de todos sus linajes hematológicos tenía una baja fragilidad cromosómica (rangos claramente mosaicos) en SP, el análisis de MO mostró sensibilidad a MMC, y los resultados de longitud telomérica mostraron unos telómeros normales para la fecha en que inició su involución hematológica. Estos resultados en conjunto sugieren que no hubo mosaicismo a nivel medular y que la reversión mutacional sólo ocurrió en los progenitores linfoides de este paciente. También permiten entender porque a pesar de tener un resultado de baja fragilidad cromosómica en SP no hubo mejoría de los diferentes linajes sanguíneos y su evolución fue la clásica de un paciente AF no mosaico.

Finalmente, queda claro que el fenómeno del mosaicismo por reversión mutacional a nivel hematológico presenta diferentes matices a nivel clínico, que está correlacionado con el nivel de diferenciación celular donde se da la

reversión mutacional (ver figura 104), estado biológico de la célula y posiblemente con el microambiente en el cual se produce la reversión mutacional.

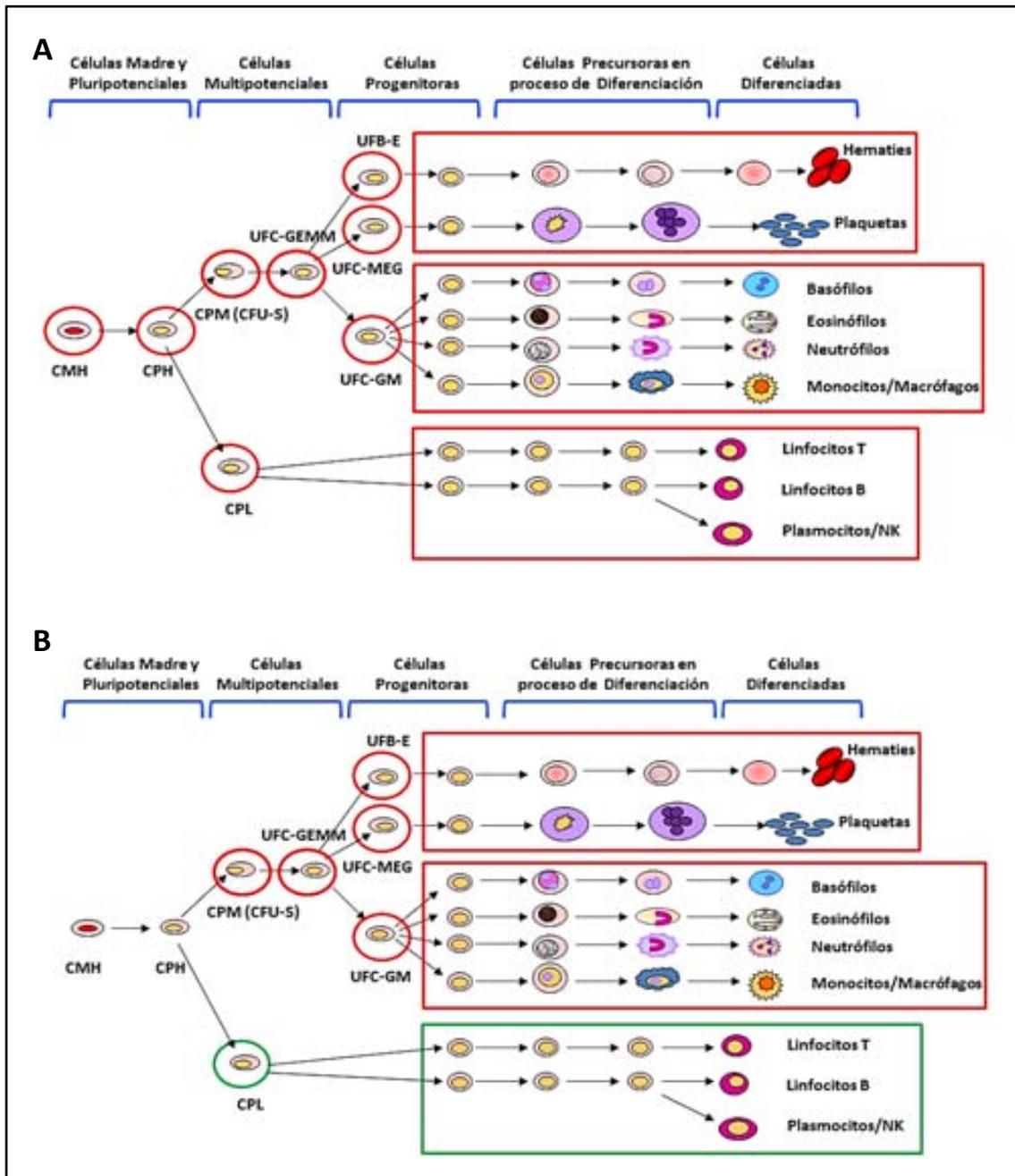


Figura 104. Fenómenos de mosaicismo hematopoyético por reversión mutacional. (A) reversión mutacional en célula madre hematopoyética (CMH) con repercusión favorable en todos los linajes sanguíneos. **(B)** Reversión mutacional en una de las células progenitoras linfocítica (CPL, resaltado en verde) o mieloide (CPM, resaltado en rojo) con repercusión favorable solamente en el linaje comprometido.

En este sentido, el ensayo de fragilidad cromosómica en SP combinado con el seguimiento de la evolución hematológica clínica adquiere mayor valor para la valoración de este tipo de mosaicismo somático. En casos de mejoría o estabilidad hematológica y con bajos rangos de fragilidad cromosómica en SP está claro que hay un mosaicismo total o de MO. En casos en de involución hematológica progresiva y con bajos rangos de fragilidad cromosómica en SP es recomendable realizar un estudio de sensibilidad a agentes inductores de ICLs en células de MO. Si los resultados en MO muestran sensibilidad a agentes inductores de ICLs se está frente a un caso de mosaicismo parcial del linaje linfoide. En casos de mejoría o estabilidad hematológica y con altos rangos de fragilidad cromosómica en SP también es recomendable realizar un estudio de sensibilidad a agentes inductores de ICLs en células de MO. Si los resultados en MO muestran resistencia a agentes inductores de ICLs se está frente a un caso de mosaicismo parcial del linaje mieloide. En la figura 113 se ilustra las diferentes posibilidades que se pueden dar. En cuanto al linaje mieloide, cabe la posible que la reversión sólo se de en una de las células de las diferentes unidades formadoras de colonias y sólo sea esta línea celular específica la que revierta y mejore a nivel hematológico.

Con respecto al ensayo de fragilidad cromosómica hay que tener claro que como se realiza en linfocitos T de SP es necesario tener presente la tasa de renovación variable de estas células (de días, meses a años) y el proceso dinámico y progresivo del fenómeno de mosaicismo. Por lo tanto, no es suficiente el quedarse con un el primer dato del ensayo de fragilidad cromosómica en SP, sino que se requiere de posteriores valoraciones de la fragilidad cromosómica, con una correlación con la evolución hematológica y en casos de incongruencia entre estos dos parámetros se hace necesario una valoración de sensibilidad a agentes inductores de ICLs en células de MO.

5.4. LA IMPLEMENTACIÓN DEL DGP CON TIPIFICACIÓN HLA EN FAMILIAS CON PACIENTES AF

De acuerdo los resultados obtenidos del análisis de datos de la serie de parejas sometidas a DPG con tipificación HLA caben resaltar cuatro aspectos importantes: la edad avanzada de las madres, el alto porcentaje de

aneuploidías, el alto número de ciclos empleados y la alta tasa de abortos y la baja tasa de embarazos llevados a término. Estos factores que se han tenido en cuenta en las diferentes publicaciones sobre este proceso (Basille et al., 2009; Mantikou et al., 2012; Zierhut et al., 2013).

En primer lugar, se conoce la fuerte asociación entre la edad materna y las aneuploidías (Bisignano et al., 2011; Mantikou et al., 2012; Rechitsky et al., 2006), por lo cual, era de esperarse que el cribado de los embriones de estas parejas tuvieran una alta tasa de aneuploidías. Debido a la edad cada vez más avanzada en las que las parejas deciden ser padres en Europa es difícil que este factor se pueda controlar favorablemente. Sin embargo, gracias a todos los avances médico-científicos en AF el diagnóstico de esta patología se puede realizar de manera precoz y en alguna medida permitir a la pareja que toman la decisión de tener un hijo sano y HLA compatible con su hermano afecto, someterse a este proceso de selección a una edad más temprana. Además, con el control de otros factores que influyen la tasa de aneuploidías de este tipo de embriones (periodo de blastulación y tipo de estimulación ovárica) probablemente se puedan disminuir significativamente estas tasas aneuploidías. Una opción para algunas familias es que el donante de óvulos sea una familiar materna haploidéntica de edad joven. Así en España se ha hecho un intento con una prima materna de una pareja con hijos afecto de AF.

En segundo lugar es evidente, que estas parejas requirieron un número alto de ciclos para obtener un resultado y en la mayoría no lograron el objetivo.

En tercer lugar está claro que debido a que no se realizó un cribado total de ploidías en todos los cromosomas de los embriones (sólo se llegó al 15.2% del total de cromosomas) quedó un alto porcentaje de cromosomas sin analizar de embriones procedentes de madres de edad avanzada, lo cual plantea una alta probabilidad de aneuploidías en los embriones que se terminaron transfiriendo. En este sentido, es lógico asociar el alto número de abortos presentes (80% del total de embarazos obtenidos) en estas parejas.

En cuarto lugar, la baja tasa de embarazos (13.2%, 5 embarazos por 38 ciclos de estimulación ovárica; 31.3%, 5 embarazos por 16 embriones transferidos) y de nacidos vivos obtenida en esta serie de parejas (2.63%, 1 nacido vivo logrado por 38 ciclos de estimulación ovárica) refleja no sólo la baja efectividad de este proceso de selección, sino también el fuerte impacto psicológico al cual

se exponen estas familias durante el proceso. Por lo tanto los resultados observados distan bastante en relación con los resultados deseados.

Finalmente, se espera que los diferentes avances en este campo, mejores protocolos de estimulación ovárica (más próximo a lo natural), un cribado de todos los cromosomas para aneuploidías en los embriones obtenidos durante este proceso y un mejoramiento en todos los puntos del ciclo tengan un impacto significativo en el mejoramiento de la eficiencia del proceso de selección embrionaria por DPG y tipificación HLA.

5.5. UNA APROXIMACIÓN AL CONSEJO GENÉTICO DE LOS PACIENTES CON AF

Con respecto al asesoramiento genético hay que resaltar tres aspectos: primero la importancia de la familiarización del asesor genético con AF, segundo el estado clínico en el cual se hace el diagnóstico inicial del paciente y tercero la accesibilidad a toda la información con un lenguaje apropiado para facilitarle al paciente y/o familiares (en casos de una menor edad del paciente) poder tomar cualquier decisión con autonomía propia.

En cuanto al primer aspecto, se debe estar consciente de que la entrada al sistema de salud de cualquier paciente se da por la asistencia primaria, por lo cual es fundamental la anamnesis y el examen clínico completo para su posterior direccionamiento hacia la asistencia especializada (muchas veces multidisciplinaria debido a su alta comorbilidad). Este paso no es sencillo ya que se trata de una enfermedad rara y el médico de familia no está familiarizado con su diagnóstico. Afortunadamente en España, gracias a la Red Nacional en AF, a la asociación de familias con AF y su mutua interacción ha permitido tanto a clínicos, básicos y pacientes tener un mejor conocimiento de esta enfermedad. Ello, a su vez, ha repercutido en un mejor y más temprano diagnóstico, la creación de una base de datos (actualmente en mejoramiento), el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en la población, el cribado de la población en riesgo, unos mejores y cada vez más estandarizados manejos médicos integrales y una mejor cooperación del paciente y su familia tanto en su seguimiento clínico como su participación en estudios de investigación. Sin embargo, los trabajos de investigación clínica y

básica plantean importantes cuestionamientos éticos tales como la equidad en el acceso, el equilibrio entre riesgos y beneficios, el respeto a la autonomía, intimidad y confidencialidad del paciente. Es por ello que se hace fundamental un adecuado asesoramiento genético para el paciente y/o la familia que permita el acceso comprensible a toda la información sobre su enfermedad, pruebas diagnósticas, evolución clínica, opciones terapéuticas, seguimiento médico y de rehabilitación y estudios de investigación relacionados. En este último punto hay que remarcar la necesidad de realizar un adecuado consentimiento informado específico y por escrito para cada procedimiento al cual va a ser sometido, con la opción de negarse a participar en alguno de ellos en cualquier momento del proceso y con previa información de que su decisión no repercutirá en su atención sanitaria.

En cuanto al segundo aspecto, cada paciente con AF y/o familiar responsable tiene que saber lo difícil que pueden resultar algunos casos para llegar al diagnóstico adecuado (casos de mosaicismo somático en AF y/o síndromes solapantes), requiriendo en algunas ocasiones de diferentes pruebas para dar con el diagnóstico, lo cual significa un mayor tiempo entre la primera consulta y la confirmación del diagnóstico.

Por otra parte, además del diagnóstico se hace necesario la identificación de todas las morbilidades presentes en el paciente en el momento del diagnóstico y durante su seguimiento clínico, así como sus antecedentes familiares clínicamente relevantes con el fin de establecer un plan de manejo integral dentro de su patología. La identificación del grupo de complementación es fundamental para identificar mayor o menor grado el riesgo de presentar algunos tipos de cáncer, así como la necesidad de hacer un estudio de cribado familiar, siempre con previo consentimiento informado de cada individuo. Aunque la mayoría de pacientes pertenecen al grupo de complementación FANCA, es relativamente fácil llegar a este. Otros grupos de complementación menos frecuentes requieren un mayor trabajo, y para la identificación de grupos nuevos resulta muy útil la implementación de pruebas la secuenciación masiva. Esta última técnica genera una gran cantidad de información, lo cual aumenta la probabilidad de hallazgos incidentales clínicamente relevantes. Por lo cual el uso de la secuenciación masiva plantea la necesidad de realizar un consentimiento informado específico previo a su implementación, que no sólo

contemple las características de un consentimiento informado clásico sino que adicione el tema de hallazgos incidentales a este, permitiendo al paciente tener la información necesaria para poder aceptar o no este procedimiento, o de negarse a recibir toda la información generada, centrándose sólo en la relacionada a su patología, así como el derecho a donar o negar la información para su uso en base de datos con fines investigativos.

Otro aspecto que debe tener en cuenta el profesional clínico encargado del asesoramiento genético en AF es el estado clínico del paciente en el momento en que se hace el diagnóstico. Se debe partir del concepto que la AF es una enfermedad crónica con una alta heterogeneidad clínica y por ello con una comorbilidad muy alta en un porcentaje significativo de los pacientes. Por lo tanto no sólo se debe enfocar en identificar y tratar las alteraciones hematológicas y esqueléticas, sino también descartar otras alteraciones menos evidentes como son las endocrinas de manera precoz. De todos modos como las alteraciones hematológicas son muchas veces las anomalías más relevante de esta patología (tienen mayor impacto de morbimortalidad) y por el cual muchas veces son el signo cardinal para la sospecha la enfermedad, se puede proponer un modelo en base a este para plantear el asesoramiento, tal como se esquematiza en la figura 105. Dos aspectos que generan verdadero retos para el clínico es poder dar una estimación entre los periodos de transición, especialmente entre E₀ y E_p, así como llegar a una estimación aproximada de la prevalencia del E_p hematológico; retos que cada vez más deberá afrontar el clínico con un mejor y precoz diagnóstico.

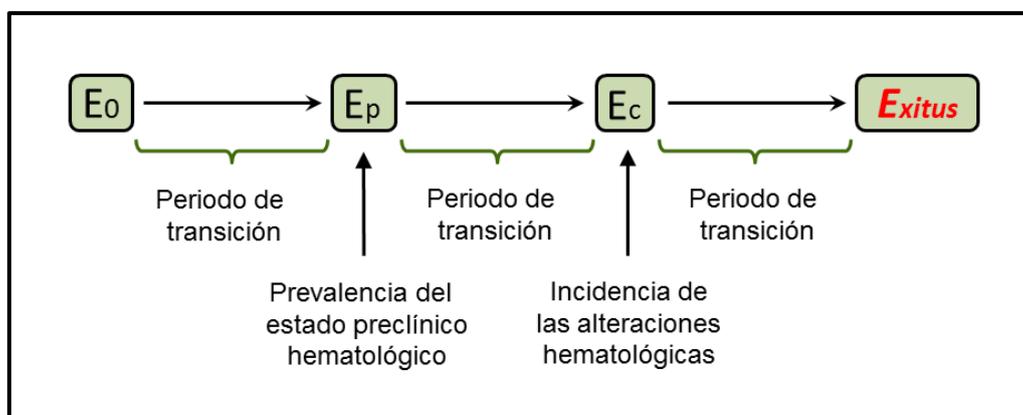


Figura 114. Evolución clínica hematológica de la AF. La AF debe plantearse como una enfermedad crónica enfocada a la vigilancia principalmente del tejido hematopoyético sin descuidar las demás morbilidades asociadas. En este sentido el curso natural de la enfermedad incluye un estado libre de alteraciones hematológicas (E₀), un estado preclínico

con sólo signos de la enfermedad (E_p), un estado clínico con signos y síntomas (E_c) y finalmente el proceso hacia la muerte (*Exitus*). Entre estos estados clínicos el paciente presenta periodos variables a los que denominamos periodos de transición.

El esquema de la figura 105 podemos valorar mejor el impacto de poder realizar un diagnóstico precoz y los retos que generan al clínico dar una estimación entre los periodos de transición, especialmente entre E_0 y E_p , así como llegar a una estimación aproximada de la prevalencia del E_p hematológico. Sólo en el periodo de transición entre E_0 y E_p y/o entre E_p y E_c , esta estimación es muy difícil de realizar por toda la variabilidad que existe para el inicio de las alteraciones hematológicas. En cuanto al periodo de transición entre E_c y *Exitus* hay que resalta que el uso de protocolos de TPH más adecuado a la patología van alargado este periodo y se espera que algún día con las nuevas terapias este periodo se aproxime al de la población general.

Finalmente, una herramienta útil en el cálculo de riesgo, aspecto importante en el asesoramiento genético, es la implementación del teorema de Bayes (Offit & Brown, 1994). Este representa un método muy útil para determinar la probabilidad global de un suceso o desenlace, como un estado de portador, al considerar todas las posibilidades iniciales y luego condicionar estas con la incorporación de nueva información, como los resultados de un estudio genético.

En cuanto al manejo, es fundamental dar toda la información que se conozca hasta el momento, así como derivarlo a los especialistas de cada morbilidad en concreto, dejándole siempre la posibilidad de recibir la mejor opción terapéutica que se crea necesaria así como el continuo asesoramiento en todo momento de su seguimiento. Cuando se trata de terapéuticas en proceso de investigación este proceso de asesoramiento debe ser más estricto, dejando desde el principio claro que su rechazo a participar no repercutirá en su manejo médico, así como su incorporación da la posibilidad de retirarse en cualquier momento del estudio.

En el tema del diagnóstico prenatal y preimplantacional, es fundamental así como en todos los aspectos de asesoramiento genético que el profesional clínico tenga un conocimiento amplio del tema relacionado con la patología. En este sentido la información sobre las pruebas prenatales en materia de riesgos,

sensibilidad y especificidad, tasa de error y periodos de realización deben estar deben quedar muy claros para la familia que decida hacerlo, ya que serán claves en el momento que tengan que tomar de una decisión con el resultado. Es por ello que resulta muy importante el cribado de poblaciones en riesgo para presentar esta patología (etnia gitana española, familiares de pacientes y poblaciones altamente consanguíneas) con el fin de ofrecerle a la familia una valoración de riesgo y un consejo genético del mismo previo a un embarazo.

En cuanto al DPG con tipificación de ALH, de acuerdo a lo encontrado en nuestro estudio las tasas de embarazo observadas en esta serie de pacientes distan bastante de lo esperado. Por lo tanto, la efectividad dado principalmente por la edad avanzada materna no es muy alta y ello debe quedarle claro a la familia que desea someterse a este proceso o que quiere inicialmente tener información al respecto. Por ello es muy importante no sólo realizar más estudios como este, sino promocionar su divulgación a nivel de profesionales clínicos implicados en el manejo de esta patología.

En cuanto al tercer aspecto, la asesoría genética debe tener una anamnesis completa del historial clínico y antecedentes del paciente y su familia y proporcionar toda la información necesaria al paciente en un lenguaje accesible con el fin de aclarar las formas como se hereda la AF y demás dudas que plantee en paciente y/o sus padres, y además, debe explicar el proceso del examen genético junto con sus ventajas, riesgos y limitaciones. Esta consulta debe incluir información sobre los grupos de respaldo en la actualidad, opciones de soporte psicosocial, opciones reproductivas en el futuro y sus implicaciones familiares, las oportunidades de investigación y su derecho a decidir sobre su participación sin ninguna consecuencia en su asistencia y manejo clínico.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

De los resultados presentados y la discusión de los mismos se derivan las siguientes conclusiones:

- I. El análisis mutacional de los pacientes AF españoles confirma que las grandes deleciones y las mutaciones en los exones 13, 36 y 38 del gen *FANCA* son las más frecuentes y representan el 51% de las mutaciones de la población española no gitana del subtipo FA-A. Por lo tanto, la estrategia de cribado mutacional basado en las mutaciones más frecuentes resulta muy útil para la confirmación del subtipaje hecho por complementación retroviral.
- II. La implementación de la secuenciación masiva del exoma no sólo plantea una forma más rápida y eficaz para el subtipaje de los pacientes AF, sino que en paralelo permite descartar diferentes genes AF e identificar nuevos genes AF a partir de una muestra de DNA.
- III. El subtipaje del paciente FA287 en el subtipo FA-J podría explicar la presencia de algunos casos de cáncer en el pedigrí de este paciente, tanto por rama paterna como por rama materna.
- IV. En el análisis de la correlación entre el genotipo y el fenotipo, el tipo de mutación (mutación de cambio de base “con efecto leve a nivel de la proteína”) en el gen *FANCI* puede explicar de forma relevante el fenotipo hematológico suave observado en algunos pacientes FA-J.
- V. La implementación de la estrategia de cribado mutacional planteado para la población española resulta ser poco eficiente para la caracterización mutacional de los pacientes AF de algunos países americanos y de otros países. Por lo que esta estrategia solo tiene razón de ser después de un estudio mutacional de cada población AF.

- VI. El análisis clínico del patrón de herencia genética en familias con AF permite en los casos del subtipo FA-B realizar de manera rápida el análisis mutacional del paciente.
- VII. La identificación de un paciente FA-B debe complementarse con el cribado mutacional en la familia de las mujeres en edad reproductiva con el fin de identificar mujeres portadoras sanas. Adicionalmente, los análisis de inactivación del cromosoma X confirma que alelo mutado en *FANCB* está sujeto a una fuerte selección negativa durante la embriogénesis.
- VIII. El subtipaje de 3 de los 4 pacientes serbios como FA-D2, analizados por WB, sugieren la posibilidad de una mutación fundadora en esta población. El subtipaje de esta serie de pacientes por expresión proteica por WB permite sugerir dicha técnica como una estrategia eficaz y barata para el subtipaje de poblaciones AF.
- IX. El análisis citogenético completo de las células de pacientes con algún grado de solapamiento clínico con AF resulta fundamental para la identificación de pacientes con fenotipo Fanconi-*like*. La implementación de la secuenciación masiva se hace vital para su análisis mutacional e identificación del gen afectado.
- X. Los pacientes con la microdeleción 13q13.3 en homocigosis, que incluyen la deleción de *FAN1*, a pesar de presentar un fenotipo celular idéntico a los pacientes Fanconi-*like* no presentan un fenotipo clínico-hematológico similar a AF. Lo que descarta a *FAN1* como un gen candidato para la AF.
- XI. El mosaicismo por reversión mutacional a nivel hematológico es un proceso dinámicamente progresivo que requiere para su análisis su correlación clínica y citogenética. Se hace necesario en todos los pacientes AF hacer un segundo ensayo de fragilidad cromosómica sobre todo si hay mejoría hematológica.

- XII. Aunque la mayoría de los pacientes con mosaicismo somático mejoran hematológicamente, existen casos excepcionales que son relevantes para la predicción de resultados de futuros ensayos de terapia génica. Los resultados moleculares sugieren que la evolución clínica en estos pacientes no sólo depende del nivel celular donde ocurrió la reversión mutacional, sino también de la edad biológica y el potencial proliferativo de la célula revertida.
- XIII. La mejoría hematológica que presentan los pacientes con mosaicismo somático no excluye el riesgo de involución hematológica o de desarrollar alguna malignidad a nivel hematopoyético.
- XIV. La clasificación del mosaicismo por reversión mutacional a nivel hematológico en pacientes AF requiere de criterios clínicos y biomoleculares. Ante la discordancia entre la evolución hematológica y los valores de fragilidad cromosómica en SP se hace necesario un estudio de sensibilidad a nivel de MO para su análisis y/o la identificación del nivel celular donde ocurrió el evento de reversión mutacional.
- XV. Las parejas con un hijo afecto de AF sometidas a un DGP combinado con la tipificación HLA presentaban una edad materna avanzada, una alta tasa de aneuploidías y requirieron un número alto de ciclos para obtener un hijo sano y HLA idéntico a su hermano afecto. Por lo que la baja tasa de éxito no sólo muestran una discordancia entre lo observado y lo esperado, sino que refleja el impacto psicológico y económico al cual se exponen estas familias durante el proceso.
- XVI. El consentimiento informado debe ser específico para cada procedimiento y debe estar supeditado a la autonomía del paciente. El consentimiento informado en investigación debe permitirle al paciente decidir sobre la opción de almacenamiento de su DNA y de que se lleven a cabo otras pruebas en el futuro a medida que se desarrollen otras técnicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

Abou-Zahr, F., Bejjani, B., Kruyt, F.A.E., Kurg, R., Bacino, C., Shapira, S.K., and Youssoufian, H. (1999). Normal expression of the Fanconi anemia proteins FAA and FAC and sensitivity to mitomycin C in two Patients with Seckel syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 83, 388–391.

Adamo, A., Collis, S.J., Adelman, C.A., Silva, N., Horejsi, Z., Ward, J.D., Martinez-Perez, E., Boulton, S.J., and Volpe, A.L. (2010). Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia. *Mol. Cell* 39, 25 – 35.

Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Stevens, J., Gutiérrez-Mateo, C., Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., and Wells, D. (2011). The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil. Steril.* 95, 520 – 524.

Ali, A.M., Singh, T.R., and Meetei, A.R. (2009). FANCM–FAAP24 and FANCI: FA proteins that metabolize DNA. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 668, 20 – 26.

Alpi, A.F., Pace, P.E., Babu, M.M., and Patel, K.J. (2008). Mechanistic Insight into Site-Restricted Monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Mol. Cell* 32, 767 – 777.

Alter, B.P. (2008). Fanconi anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 2: Diagnosis Evaluation of FA (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).

Alter, B.P., and Rosenberg, P.S. (2012). VACTERL-H Association and Fanconi Anemia. *Mol Syndr.* 4, 87–93.

Alter, B., Knobloch, M., and Weinberg, R. (1991a). Erythropoiesis in Fanconi's anemia. *Blood* 78, 602–608.

Alter, B.P., Frissora, C.L., Halpéirin, D.S., Freedman, M.H., Chitkara, U., Alvarez, E., Lynch, L., Adler-Brecher, B., and Auerbach, A.D. (1991b). Fanconi's anaemia and pregnancy. *Br. J. Haematol.* 77, 410–418.

Alter, B.P., Greene, M.H., Velazquez, I., and Rosenberg, P.S. (2003). Cancer in Fanconi anemia. *Blood* 101, 2072–2072.

Alter, B.P., Rosenberg, P.S., and Brody, L.C. (2007). Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in FANCD1/BRCA2. *J. Med. Genet.* 44, 1–9.

Alter, B.P., Giri, N., Savage, S.A., Quint, W.G.V., de Koning, M.N.C., and Schiffman, M. (2013). Squamous cell carcinomas in patients with Fanconi

- anemia and dyskeratosis congenita: A search for human papillomavirus. *Int. J. Cancer* *133*, 1513–1515.
- Ambrose, M., and Gatti, R.A. (2013). Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions. *Blood* *121*, 4036–4045.
- Ameziane, N., Sie, D., Dentre, S., Ariyurek, Y., Kerkhoven, L., Joenje, H., Dorsman, J., Ylstra, B., Gille, J., Sistermans, E., et al. (2012). Diagnosis of fanconi anemia: mutation analysis by next-generation sequencing. *Anemia* *2012*, 132856.
- Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D., and Taniguchi, T. (2004). ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev.* *18*, 1958–1963.
- Andreu, N., Pujol-Moix, N., Martinez-Lostao, L., Oset, M., Muñoz-Diaz, E., Estivill, X., Volpini, V., and Fillat, C. (2003). Wiskott–Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation. *Blood Cells. Mol. Dis.* *31*, 332 – 337.
- Armanios, M., Chen, J.-L., Chang, Y.-P.C., Brodsky, R.A., Hawkins, A., Griffin, C.A., Eshleman, J.R., Cohen, A.R., Chakravarti, A., Hamosh, A., et al. (2005). Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15960–15964.
- Auerbach, A. (2003a). Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* *8.7.1–8.7.15*.
- Auerbach, A. (2003b). Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* *8.7.1–8.7.15*.
- Auerbach, A.D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Fanconi Anemia Paradigm Discov. Mol. Pathways Patients* *668*, 4–10.
- Auerbach, A., Min, Z., Ghosh, R., Pergament, E., Verlinsky, Y., Nicolas, H., and Boué, J. (1986). Clastogen-induced chromosomal breakage as a marker for first trimester prenatal diagnosis of Fanconi anemia. *Hum. Genet.* *73*, 86–88.
- Auerbach, A., Rogatko, A., and Schroeder-Kurth, T. (1989). International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* *73*, 391–396.
- Auerbach, A.D., Sagi, M., and Adler, B. (1985). Fanconi Anemia: Prenatal Diagnosis in 30 Fetuses at Risk. *Pediatrics* *76*, 794–800.

- Ayuso, C., Millan, J.M., Mancheno, M., and Dal-Re, R. (2013). Informed consent for whole-genome sequencing studies in the clinical setting. Proposed recommendations on essential content and process. *Eur J Hum Genet.*
- Baart, E.B., Martini, E., Eijkemans, M.J., Van Opstal, D., Beckers, N.G.M., Verhoeff, A., Macklon, N.S., and Fauser, B.C.J.M. (2007). Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 22, 980–988.
- Bachrati CZ, and Hickson ID (2003). RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J* 374, 577–606.
- Ball, S., Gibson, F., Rizzo, S., Tooze, J., Marsh, J., and Gordon-Smith, E. (1998). Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* 91, 3582–3592.
- Basille, C., Frydman, R., Aly, A.E., Hesters, L., Fanchin, R., Tachdjian, G., Steffann, J., LeLorc'h, M., and Achour-Frydman, N. (2009). Preimplantation genetic diagnosis: State of the art. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 145, 9 – 13.
- Begg CB, Haile RW, Borg Å, and et al (2008). Variation of breast cancer risk among *brca1/2* carriers. *JAMA* 299, 194–201.
- Bhisitkul, R.B., and Rizen, M. (2004). Bloom syndrome: multiple retinopathies in a chromosome breakage disorder. *Br. J. Ophthalmol.* 88, 354–357.
- Van Blerkom, J., and Davis, P. (2001). Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum. Reprod.* 16, 757–764.
- Bogliolo, M., Lyakhovich, A., Callen, E., Castella, M., Cappelli, E., Ramirez, M.J., Creus, A., Marcos, R., Kalb, R., Neveling, K., et al. (2007). Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J* 26, 1340–1351.
- Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C., Derkunt, B., Su, Y., Raams, A., Trujillo, J.P., Minguillón, J., Ramírez, M.J., Pujol, R., et al. (2013). Mutations in ERCC4, Encoding the DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 800 – 806.
- Briot, D., Macé-Aimé, G., Subra, F., and Rosselli, F. (2008). Aberrant activation of stress-response pathways leads to TNF- α oversecretion in Fanconi anemia. *Blood* 111, 1913–1923.
- Brittenham, G.M., Griffith, P.M., Nienhuis, A.W., McLaren, C.E., Young, N.S., Tucker, E.E., Allen, C.J., Farrell, D.E., and Harris, J.W. (1994). Efficacy of

Deferoxamine in Preventing Complications of Iron Overload in Patients with Thalassemia Major. *N. Engl. J. Med.* *331*, 567–573.

Butturini, A., Gale, R., Verlander, P., Adler-Brecher, B., Gillio, A., and Auerbach, A. (1994). Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study [see comments]. *Blood* *84*, 1650–1655.

Callen, E., Samper, E., Ramirez, M., Creus, A., Marcos, R., Ortega, J., Olive, T., Badell, I., Blasco, M., and Surrallés, J. (2002). Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in fanconi anemia. *Hum Mol Genet* *11*, 439–444.

Callén, E., and Surrallés, J. (2004). Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutat. Res. Mutat. Res.* *567*, 85 – 104.

Callén, E., Tischkowitz, M., Creus, A., Marcos, R., Bueren, J., Casado, J., Mathew, C., and Surrallés, J. (2004). Quantitative PCR analysis reveals a high incidence of large intragenic deletions in the FANCA gene in Spanish Fanconi anemia patients. *Cytogenet. Genome Res.* *104*, 341–345.

Callén, E., Casado, J.A., Tischkowitz, M.D., Bueren, J.A., Creus, A., Marcos, R., Dasí, A., Estella, J.M., Muñoz, A., Ortega, J.J., et al. (2005). A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* *105*, 1946–1949.

Cantor, S.B., and Guillemette, S. (2011). Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCI/BACH1/BRIP1. *Future Oncol.* *7*, 253–261.

Cantor, S.B., Bell, D.W., Ganesan, S., Kass, E.M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D.C.R., Sgroi, D.C., Lane, W.S., Haber, D.A., et al. (2001). BACH1, a Novel Helicase-like Protein, Interacts Directly with BRCA1 and Contributes to Its DNA Repair Function. *Cell* *105*, 149 – 160.

Casado, J.A., Callén, E., Jacome, A., Río, P., Castella, M., Lobitz, S., Ferro, T., Muñoz, A., Sevilla, J., Cantalejo, Á., et al. (2007). A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J. Med. Genet.* *44*, 241–249.

Castella, M., Pujol, R., Callén, E., Trujillo, J.P., Casado, J.A., Gille, H., Lach, F.P., Auerbach, A.D., Schindler, D., Benítez, J., et al. (2011a). Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood* *117*, 3759–3769.

Castella, M., Pujol, R., Callén, E., Ramírez, M.J., Casado, J.A., Talavera, M., Ferro, T., Muñoz, A., Sevilla, J., Madero, L., et al. (2011b). Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J. Med. Genet.* *48*, 242–250.

Castillo, P., Bogliolo, M., and Surralles, J. (2011). Coordinated action of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia pathways in response to oxidative damage. *DNA Repair* 10, 518 – 525.

Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhauser, N., Carlo Marchisio, P., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426, 579–584.

Celli, G., and de Lange, T. (2005). DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* 7, 712–718.

Chandra, S., Levran, O., Jurickova, I., Maas, C., Kapur, R., Schindler, D., Henry, R., Milton, K., Batish, S.D., Cancelas, J.A., et al. (2005). A Rapid Method for Retrovirus-Mediated Identification of Complementation Groups in Fanconi Anemia Patients. *Mol Ther* 12, 976–984.

Chaudhury, I., Sareen, A., Raghunandan, M., and Sobek, A. (2013). FANCD2 regulates BLM complex functions independently of FANCI to promote replication fork recovery. *Nucleic Acids Res.* 41, 6444–6459.

Chrzanowska, K., Gregorek, H., Dembowska-Baginska, B., Kalina, M., and Digweed, M. (2012). Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 13.

Ciccio, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* 40, 179 – 204.

Cincotta, N.F. (2008). Fanconi anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 16: Psychosocial Issues (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).

Cohen-Haguenauer, O., Péault, B., Bauche, C., Daniel, M.-T., Casal, I., Levy, V., Dausset, J., Boiron, M., Auclair, C., Gluckman, E., et al. (2006). In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2340–2345.

Cohn, M.A., Kowal, P., Yang, K., Haas, W., Huang, T.T., Gygi, S.P., and D'Andrea, A.D. (2007). A UAF1-Containing Multisubunit Protein Complex Regulates the Fanconi Anemia Pathway. *Mol. Cell* 28, 786 – 797.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.

Cremona, C.A., and Behrens, A. (2013). ATM signalling and cancer. *Oncogene*.

Cumming, R.C., Lightfoot, J., Beard, K., Youssoufian, H., O'Brien, P.J., and Buchwald, M. (2001). Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Med* 7, 814–820.

D'Andrea, A.D. (2001). Cellular function of the Fanconi anemia pathway. *Nat Med* 7, 1259–1259.

D'Andrea, A.D. (2010). Susceptibility Pathways in Fanconi's Anemia and Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 362, 1909–1919.

D'Antonio, M., D'Onorio De Meo, P., Paoletti, D., Elmi, B., Pallocca, M., Sanna, N., Picardi, E., Pesole, G., and Castrignano, T. (2013). WEP: a high-performance analysis pipeline for whole-exome data. *BMC Bioinformatics* 14, S11.

Davis, M.P.A., Dongen, S. van, Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N., and Enright, A.J. (2013). Kraken: A set of tools for quality control and analysis of high-throughput sequence data. *Methods* -.

Deans, A.J., and West, S.C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 467–480.

Digweed, M., and Sperling, K. (2004). Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to {DNA} double-strand breaks. *DNA Repair* 3, 1207 – 1217.

Dokal, I., and Vulliamy, T. (2008). Inherited aplastic anaemias/bone marrow failure syndromes. *Blood Rev.* 22, 141 – 153.

Dokal, I., and Vulliamy, T. (2010a). Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 95, 1236–1240.

Dokal, I., and Vulliamy, T. (2010b). Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 95, 1236–1240.

Dror, Yigal (2011). Genetic Basis of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. In *Advances in the Study of Genetic Disorders*, (Kenji Ikehara (Ed.)), pp. 357–392.

Du, W., Adam, Z., Rani, R., Zhang, X., and Pang, Q. (2008). Oxidative Stress in Fanconi Anemia Hematopoiesis and Disease Progression. *Antioxid Redox Signal* 10, 1909–1921.

Dufour, C., Corcione, A., Svahn, J., Haupt, R., Poggi, V., Béka'ssy, A.N., Scimè, R., Pistorio, A., and Pistoia, V. (2003). TNF- α and IFN- γ are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF- α suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood* 102, 2053–2059.

Dutrillaux, B., Aurias, A., Dutrillaux, A.-M., Buriot, D., and Prieur, M. (1982). The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum. Genet.* 62, 327–332.

Dutrillaux, B., Gerbault-Seureau, M., Zafrani, B., and Prieur, M. (1991). Prolonged G2 phase of breast cancer cells and chromosome damage. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 27, 1307 – 1312.

Fackenthal, J.D., and Olopade, O.I. (2007). Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 7, 937–948.

Fagerlie, S.R., and Bagby, G.C. (2006). Immune Defects in Fanconi Anemia. *Crit. Rev. Immunol.* 26, 81–96.

Faivre, L., Guardiola, P., Lewis, C., Dokal, I., Ebell, W., Zatterale, A., Altay, C., Poole, J., Stones, D., Kwee, M.L., et al. (2000). Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. *Blood* 96, 4064–4070.

Faivre, L., Le Merrer, M., Lyonnet, S., Plauchu, H., Dagoneau, N., Campos-Xavier, A.B., Attia-Sobol, J., Verloes, A., Munnich, A., and Cormier-Daire, V. (2002). Clinical and genetic heterogeneity of Seckel syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 112, 379–383.

Fan, H.C., Gu, W., Wang, J., Blumenfeld, Y.J., El-Sayed, Y.Y., and Quake, S.R. (2012). Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* 487, 320–324.

Franco, S., van de Vrugt, H.J., Fernández, P., Aracil, M., Arwert, F., and Blasco, M.A. (2004). Telomere dynamics in Fancg-deficient mouse and human cells. *Blood* 104, 3927–3935.

Fu, K.-L., Foe, J.R.L.T., Joenje, H., Rao, K.W., Liu, J.M., and Walsh, C.E. (1997). Functional Correction of Fanconi Anemia Group A Hematopoietic Cells by Retroviral Gene Transfer. *Blood* 90, 3296–3303.

Futaki, M., and Liu, J.M. (2001). Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex. *Trends Mol. Med.* 7, 560 – 565.

Futaki, M., Yamashita, T., Yagasaki, H., Toda, T., Yabe, M., Kato, S., Asano, S., and Nakahata, T. (2000). The IVS4+4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood* 95, 1493–1498.

Futaki, M., Igarashi, T., Watanabe, S., Kajigaya, S., Tatsuguchi, A., Wang, J., and Liu, J.M. (2002). The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 23, 67–72.

Garaycochea, J.I., Crossan, G.P., Langevin, F., Daly, M., Arends, M.J., and Patel, K.J. (2012). Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature* 489, 571–575.

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2001). Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. *Mol. Cell* 7, 249 – 262.

Garner, E., and Smogorzewska, A. (2011). Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. *FEBS Lett.* 585, 2853 – 2860.

Gennery, A.R., Slatter, M.A., Bhattacharya, A., Barge, D., Haigh, S., O'Driscoll, M., Coleman, R., Abinun, M., Flood, T.J., Cant, A.J., et al. (2004). The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia. *Clin. Immunol.* 113, 214 – 219.

Gerton, J.L. (2012). Translational mechanisms at work in the cohesinopathies. *Nucleus* 3, 520–525.

Gillio, A.P., Verlander, P.C., Batish, S.D., Giampietro, P.F., and Auerbach, A.D. (1997). Phenotypic Consequences of Mutations in the Fanconi Anemia FAC Gene: An International Fanconi Anemia Registry Study. *Blood* 90, 105–110.

Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., et al. (1989). Hematopoietic Reconstitution in a Patient with Fanconi's Anemia by Means of Umbilical-Cord Blood from an HLA-Identical Sibling. *N. Engl. J. Med.* 321, 1174–1178.

Gluckman, E., Auerbach, A., Horowitz, M., Sobocinski, K., Ash, R., Bortin, M., Butturini, A., Camitta, B., Champlin, R., and Friedrich, W. (1995). Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood* 86, 2856–2862.

Godthelp, B.C., Wiegant, W.W., Waisfisz, Q., Medhurst, A.L., Arwert, F., Joenje, H., and Zdzienicka, M.Z. (2006). Inducibility of nuclear Rad51 foci after {DNA} damage distinguishes all Fanconi anemia complementation groups from D1/BRCA2. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 594, 39 – 48.

Gollin, S.M. (2005). Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin. Cancer Biol.* 15, 33 – 42.

González-Murillo, Á., Lozano, M.L., Álvarez, L., Jacome, A., Almarza, E., Navarro, S., Segovia, J.C., Hanenberg, H., Guenechea, G., Bueren, J.A., et al. (2010). Development of Lentiviral Vectors with Optimized Transcriptional Activity for the Gene Therapy of Patients with Fanconi Anemia. *Hum. Gene Ther.* 21, 623–630.

- Greenberger, S., Berkun, Y., Ben-Zeev, B., Levi, Y.B., Barziliai, A., and Nissenkorn, A. (2013). Dermatologic manifestations of ataxia-telangiectasia syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.* **68**, 932 – 936.
- Gregory, J.J., Wagner, J.E., Verlander, P.C., Levrán, O., Batish, S.D., Eide, C.R., Steffenhagen, A., Hirsch, B., and Auerbach, A.D. (2001). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 2532–2537.
- Gregory, R.C., Taniguchi, T., and D'Andrea, A.D. (2003). Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 77 – 82.
- Gross, M., Hanenberg, H., Lobitz, S., Friedl, R., Herterich, S., Dietrich, R., Gruhn, B., Schindler, D., and Hoehn, H. (2002). Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* **98**, 126–135.
- Guardiola, P., Pasquini, R., Dokal, I., Ortega, J.J., van Weel-Sipman, M., Marsh, J.C.W., Ball, S.E., Locatelli, F., Vermynen, C., Skinner, R., et al. (2000). Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* **95**, 422–429.
- Guillouf, C., Wang, T.S., Liu, J., Walsh, C.E., Poirier, G.G., Moustacchi, E., and Rosselli, F. (1999). Fanconi Anemia C Protein Acts at a Switch between Apoptosis and Necrosis in Mitomycin C-Induced Cell Death. *Exp. Cell Res.* **246**, 384 – 394.
- Guinan, E.C., Lopez, K.D., Huhn, R.D., Felser, J.M., and Nathan, D.G. (1994). Evaluation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of pancytopenia in children with Fanconi anemia. *J. Pediatr.* **124**, 144 – 150.
- Gush, K.A., Fu, K.-L., Grompe, M., and Walsh, C.E. (2000). Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice. *Blood* **95**, 700–704.
- Hadjur, S., Ung, K., Wadsworth, L., Dimmick, J., Rajcan-Separovic, E., Scott, R.W., Buchwald, M., and Jirik, F.R. (2001). Defective hematopoiesis and hepatic steatosis in mice with combined deficiencies of the genes encoding Fancg and Cu/Zn superoxide dismutase. *Blood* **98**, 1003–1011.
- Hanenberg, H., Batish, S.D., Pollok, K.E., Vieten, L., Verlander, P.C., Leurs, C., Cooper, R.J., Götttsche, K., Haneline, L., Clapp, D.W., et al. (2002). Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp. Hematol.* **30**, 410 – 420.

- Hayani, A., Suarez, C.R., Molnar, Z., LeBeau, M., and Godwin, J. (1994). Acute myeloid leukaemia in a patient with Seckel syndrome. *J. Med. Genet.* *31*, 148–149.
- Heine-Suñer, D., Torres-Juan, L., Morlà, M., Busquets, X., Barceló, F., Picó, G., Bonilla, L., Govea, N., Bernués, M., and Rosell, J. (2003). Fragile-X syndrome and skewed X-chromosome inactivation within a family: A female member with complete inactivation of the functional X chromosome. *Am. J. Med. Genet. A.* *122A*, 108–114.
- Heinrich, M.C., Hoatlin, M.E., Zigler, A.J., Silvey, K.V., Bakke, A.C., Keeble, W.W., Zhi, Y., Reifsteck, C.A., Grompe, M., Brown, M.G., et al. (1998). DNA Cross-Linker–Induced G2/M Arrest in Group C Fanconi Anemia Lymphoblasts Reflects Normal Checkpoint Function. *Blood* *91*, 275–287.
- Hiom, K. (2010a). FANCI: Solving problems in DNA replication. *DNA Repair* *9*, 250 – 256.
- Hiom, K. (2010b). FANCI: Solving problems in DNA replication. *DNA Repair* *9*, 250 – 256.
- Hirschhorn, R. (2003). In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. *J. Med. Genet.* *40*, 721–728.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* *419*, 135–141.
- Holden, S.T., Cox, J.J., Kesterton, I., Thomas, N.S., Carr, C., and Woods, C.G. (2006). Fanconi anaemia complementation group B presenting as X linked VACTERL with hydrocephalus syndrome. *J. Med. Genet.* *43*, 750–754.
- Hoskins, E.E., Morreale, R.J., Werner, S.P., Higginbotham, J.M., Laimins, L.A., Lambert, P.F., Brown, D.R., Gillison, M.L., Nuovo, G.J., Witte, D.P., et al. (2012). The Fanconi Anemia Pathway Limits Human Papillomavirus Replication. *J. Virol.* *86*, 8131–8138.
- Howe, S.J., Mansour, M.R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempfski, H., Brugman, M.H., Pike-Overzet, K., Chatters, S.J., de Ridder, D., et al. (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Invest.* *118*, 3143–3150.
- Howlett, N.G., Harney, J.A., Rego, M.A., Kolling, F.W., and Glover, T.W. (2009). Functional Interaction between the Fanconi Anemia D2 Protein and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) via a Conserved Putative PCNA Interaction Motif. *J. Biol. Chem.* *284*, 28935–28942.

- Huang, M., Kim, J.M., Shiotani, B., Yang, K., Zou, L., and D'Andrea, A.D. (2010). The FANCM/FAAP24 Complex Is Required for the DNA Interstrand Crosslink-Induced Checkpoint Response. *Mol. Cell* 39, 259 – 268.
- Huang, P.-J., Yeh, Y.-M., Gan, R.-C., Lee, C.-C., Chen, T.-W., Lee, C.-Y., Liu, H., Chen, S.-J., and Tang, P. (2013). CPAP: Cancer Panel Analysis Pipeline. *Hum. Mutat.* n/a–n/a.
- Huck, K., Hanenberg, H., Gudowius, S., Fenk, R., Kalb, R., Neveling, K., Betz, B., Niederacher, D., Haas, R., Göbel, U., et al. (2006). Delayed diagnosis and complications of Fanconi anaemia at advanced age – a paradigm. *Br. J. Haematol.* 133, 188–197.
- Ingerslev, H.J., and Hindkjær, J. (2012). Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching – a way to save a child. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 91, 765–768.
- Jacome, A., Navarro, S., Rio, P., Yanez, R.M., Gonzalez-Murillo, A., Luz Lozano, M., Lamana, M.L., Sevilla, J., Olive, T., Diaz-Heredia, C., et al. (2009). Lentiviral-mediated Genetic Correction of Hematopoietic and Mesenchymal Progenitor Cells From Fanconi Anemia Patients. *Mol Ther* 17, 1083–1092.
- Jaspers, N.G.J., Raams, A., Silengo, M.C., Wijgers, N., Niedernhofer, L.J., Robinson, A.R., Giglia-Mari, G., Hoogstraten, D., Kleijer, W.J., Hoeijmakers, J.H.J., et al. (2007). First Reported Patient with Human ERCC1 Deficiency Has Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal Syndrome with a Mild Defect in Nucleotide Excision Repair and Severe Developmental Failure. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 457 – 466.
- Joenje, H. (2011). Metabolism: Alcohol, DNA and disease. *Nature* 475, 45–46.
- Joenje, H., and Patel, K.J. (2001). The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2, 446–459.
- Joenje, H., Arwert, F., Eriksson, A., de Koning, H., and Oostra, A. (1981). Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* 290, 142–143.
- Joksic, I., Vujic, D., Guc-Scekic, M., Leskovac, A., Petrovic, S., Ojani, M., Trujillo, J., Surralles, J., Zivkovic, M., Stankovic, A., et al. (2012). Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integr.* 3, 6.
- Kahraman, S., Karlikaya, G., Sertyel, S., Karadayi, H., and Findikli, N. (2004). Clinical aspects of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders combined with HLA typing. *Reprod. Biomed. Online* 9, 529 – 532.

Kahraman, S., Beyazyurek, C., and Ekmekci, C.G. (2011). Seven years of experience of preimplantation HLA typing: a clinical overview of 327 cycles. *Reprod. Biomed. Online* 23, 363 – 371.

Kalb, R., Neveling, K., Hoehn, H., Schneider, H., Linka, Y., Batish, S., Hunt, C., Berwick, M., Callen, E., and Surralles, J. (2007). Hypomorphic mutations in the gene encoding a key fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 80, 895–910.

Kamenisch, Y., and Berneburg, M. (2009). Progeroid Syndromes and UV-Induced Oxidative DNA Damage. *J Invest Derm Symp P* 14, 8–14.

Kamiya, M., Yamanouchi, H., Yoshida, T., Arai, H., Yokoo, H., Sasaki, A., Hirato, J., Nakazato, Y., Sakazume, Y., and Okamoto, K. (2001). Ataxia telangiectasia with vascular abnormalities in the brain parenchyma: Report of an autopsy case and literature review. *Pathol. Int.* 51, 271–276.

Kaneko, H., and Kondo, N. (2004). Clinical features of Bloom syndrome and function of the causative gene, BLM helicase. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4, 393–401.

Kannouche, P.L., Wing, J., and Lehmann, A.R. (2004). Interaction of Human DNA Polymerase η with Monoubiquitinated PCNA: A Possible Mechanism for the Polymerase Switch in Response to DNA Damage. *Mol. Cell* 14, 491 – 500.

Karmakar, P., Seki, M., Kanamori, M., Hashiguchi, K., Ohtsuki, M., Murata, E., Inoue, E., Tada, S., Lan, L., Yasui, A., et al. (2006). BLM is an early responder to DNA double-strand breaks. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 62 – 69.

Kashiyama, K., Nakazawa, Y., Pilz, D.T., Guo, C., Shimada, M., Sasaki, K., Fawcett, H., Wing, J.F., Lewin, S.O., Carr, L., et al. (2013). Malfunction of Nuclease ERCC1-XPF Results in Diverse Clinical Manifestations and Causes Cockayne Syndrome, Xeroderma Pigmentosum, and Fanconi Anemia. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 807 – 819.

Knies, K., Schuster, B., Ameziane, N., Rooimans, M., Bettecken, T., de Winter, J., and Schindler, D. (2012). Genotyping of fanconi anemia patients by whole exome sequencing: advantages and challenges. *PLoS One* 7, e52648.

Killoran MP, and Keck JL (2006). Sit down, relax and unwind: structural insights into RecQ helicase mechanisms. *Nucleic Acids Res* 34, 4098–4105.

Kim, H., and D'Andrea, A.D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev.* 26, 1393–1408.

Kim, H., Yang, K., Dejsuphong, D., and D'Andrea, A.D. (2012). Regulation of Rev1 by the Fanconi anemia core complex. *Nat Struct Mol Biol* 19, 164–170.

- Kim, H.J., Zalewski, C., and Brewer, C.C. (2008). Fanconi anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 8: Hearing and Ear Abnormalities in Fanconi Anemia. (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).
- Kim, Y., Spitz, G.S., Veturi, U., Lach, F.P., Auerbach, A.D., and Smogorzewska, A. (2013). Regulation of multiple DNA repair pathways by the Fanconi anemia protein SLX4. *Blood* 121, 54–63.
- Kojis, T.L., Gatti, R.A., and Sparkes, R.S. (1991). The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 56, 143 – 156.
- Kong, C.M., Lee, X.W., and Wang, X. (2013). Telomere shortening in human diseases. *FEBS J.* 280, 3180–3193.
- Kottemann, M.C., and Smogorzewska, A. (2013). Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature* 493, 356–363.
- Kozin, S.H. (2008). Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 5: Hand and Arm Differences in FA (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).
- Kratz, K., Schöpf, B., Kaden, S., Sendoel, A., Eberhard, R., Lademann, C., Cannavó, E., Sartori, A.A., Hengartner, M.O., and Jiricny, J. (2010). Deficiency of FANCD2-Associated Nuclease KIAA1018/FAN1 Sensitizes Cells to Interstrand Crosslinking Agents. *Cell* 142, 77 – 88.
- Kroener, L., Ambartsumyan, G., Briton-Jones, C., Dumesic, D., Surrey, M., Munné, S., and Hill, D. (2012). The effect of timing of embryonic progression on chromosomal abnormality. *Fertil. Steril.* 98, 876 – 880.
- Kruyt, F.A.E., Hoshino, T., Liu, J.M., Joseph, P., Jaiswal, A.K., and Youssoufian, H. (1998). Abnormal Microsomal Detoxification Implicated in Fanconi Anemia Group C by Interaction of the FAC Protein With NADPH Cytochrome P450 Reductase. *Blood* 92, 3050–3056.
- Kubbies, M., Schindler, D., Hoehn, H., Schinzel, A., and Rabinovitch, P. (1985). Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet* 37, 1022–30.
- Kuhn, E.M., and Therman, E. (1986). Cytogenetics of Bloom's syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 22, 1 – 18.
- Kuliev, A., and Verlinsky, Y. (2004). Preimplantation HLA typing and stem cell transplantation: report of International Meeting, Cyprus, 27–28 March, 2004. *Reprod. Biomed. Online* 9, 205 – 209.

- Kuliev, A., Rechitsky, S., Tur-Kaspa, I., and Verlinsky, Y. (2005). Preimplantation Genetics: Improving Access to Stem Cell Therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1054*, 223–227.
- Kutler, D., and Auerbach, A. (2004). Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. *Fam. Cancer* *3*, 241–248.
- Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S.D., Berwick, M., Giampietro, P.F., Hanenberg, H., and Auerbach, A.D. (2003a). A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* *101*, 1249–1256.
- Kutler, D.I., Wreesmann, V.B., Goberdhan, A., Ben-Porat, L., Satagopan, J., Ngai, I., Huvos, A.G., Giampietro, P., Levran, O., Pujara, K., et al. (2003b). Human Papillomavirus DNA and p53 Polymorphisms in Squamous Cell Carcinomas From Fanconi Anemia Patients. *J. Natl. Cancer Inst.* *95*, 1718–1721.
- Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, and et al (2003). High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with fanconi anemia. *Arch. Otolaryngol. Neck Surg.* *129*, 106–112.
- Langevin, F., Crossan, G.P., Rosado, I.V., Arends, M.J., and Patel, K.J. (2011). Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* *475*, 53–58.
- Lans, H., and Hoeijmakers, J.H.J. (2012). Genome stability, progressive kidney failure and aging. *Nat Genet* *44*, 836–838.
- Launay, F., Glard, Y., Jacopin, S., Jouve, J.-L., and Bollini, G. (2008). Centralisation progressive de la main dans la main bote radiale congénitale. *Chir. Main* *27*, *Supplement 1*, S211–S214.
- Lavin, M.F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 759–769.
- Lehmann, A.R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J.F., Kannouche, P.L., and Green, C.M. (2007). Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* *6*, 891 – 899.
- Lelij, P. van der, Chrzanowska, K.H., Godthelp, B.C., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Stumm, M., Zdzienicka, M.Z., Joenje, H., and Winter, J.P. de (2010). Warsaw Breakage Syndrome, a Cohesinopathy Associated with Mutations in the {XPD} Helicase Family Member DDX11/ChIR1. *Am. J. Hum. Genet.* *86*, 262 – 266.
- Leteurtre, F., Li, X., Guardiola, P., Le Roux, G., Sergere, J., Richard, P., Carosella, E., and Gluckman, E. (1999). Accelerated telomere shortening and telomerase activation in fanconi's anaemia. *Br J Haematol* *105*, 883–893.

- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., Vries, Y. de, Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M.A., Pals, G., et al. (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 37, 934–935.
- Levran, O., Attwooll, C., Henry, R.T., Milton, K.L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S.D., Kalb, R., Velleuer, E., Barral, S., et al. (2005a). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 37, 931–933.
- Levran, O., Diotti, R., Pujara, K., Batish, S.D., Hanenberg, H., and Auerbach, A.D. (2005b). Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: An International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum. Mutat.* 25, 142–149.
- Levy-Lahad, E. (2010). Fanconi anemia and breast cancer susceptibility meet again. *Nat Genet* 42, 368–369.
- Li, J., Sejas, D.P., Zhang, X., Qiu, Y., Nattamai, K.J., Rani, R., Rathbun, K.R., Geiger, H., Williams, D.A., Bagby, G.C., et al. (2007). TNF- α induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells. *J. Clin. Invest.* 117, 3283–3295.
- Ling, C., Ishiai, M., Ali, A.M., Medhurst, A.L., Neveling, K., Kalb, R., Yan, Z., Xue, Y., Oostra, A.B., Auerbach, A.D., et al. (2007). FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J* 26, 2104–2114.
- Liu, J., and Krantz, I. (2009). Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond. *Clin. Genet.* 76, 303–314.
- Liu, J.M., Auerbach, A.D., and Young, N.S. (1991). Fanconi anemia presenting unexpectedly in an adult kindred with no dysmorphic features. *Am. J. Med.* 91, 555 – 557.
- Liu, N., Schild, D., Thelen, M.P., and Thompson, L.H. (2002). Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucleic Acids Res.* 30, 1009–1015.
- Liu, T., Ghosal, G., Yuan, J., Chen, J., and Huang, J. (2010). FAN1 Acts with FANCI-FANCD2 to Promote DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Science* 329, 693–696.
- Liu, Y., Masson, J.-Y., Shah, R., O'Regan, P., and West, S.C. (2004). RAD51C Is Required for Holliday Junction Processing in Mammalian Cells. *Science* 303, 243–246.
- Lo, Y.M.D., and Chiu, R.W.K. (2012). Genomic Analysis of Fetal Nucleic Acids in Maternal Blood. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 13, 285–306.

Lobitz, S., and Velleuer, E. (2006). Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer* 6, 893–898.

Lu, H., Guo, X., Meng, X., Liu, J., Allen, C., Wray, J., Nickoloff, J.A., and Shen, Z. (2005). The BRCA2-Interacting Protein BCCIP Functions in RAD51 and BRCA2 Focus Formation and Homologous Recombinational Repair. *Mol. Cell Biol.* 25, 1949–1957.

Macdougall, I.C., and Cooper, A.C. (2002). Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17, 39–43.

Machida, Y.J., Machida, Y., Chen, Y., Gurtan, A.M., Kupfer, G.M., D'Andrea, A.D., and Dutta, A. (2006). UBE2T Is the E2 in the Fanconi Anemia Pathway and Undergoes Negative Autoregulation. *Mol. Cell* 23, 589 – 596.

MacKay, C., Déclais, A.-C., Lundin, C., Agostinho, A., Deans, A.J., MacArtney, T.J., Hofmann, K., Gartner, A., West, S.C., Helleday, T., et al. (2010). Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA Repair Nuclease Recruited to DNA Damage by Monoubiquitinated FANCD2. *Cell* 142, 65 – 76.

MacMillan, M.L., and Wagner, J.E. (2010). Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia – when and how? *Br. J. Haematol.* 149, 14–21.

MacMillan, M.L., Auerbach, A.D., Davies, S.M., DeFor, T.E., Gillio, A., Giller, R., Harris, R., Cairo, M., Dusenbery, K., Hirsch, B., et al. (2000). Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of a total body irradiation dose escalation trial. *Br. J. Haematol.* 109, 121–129.

MacMillan, M.L., Scott, B., and Wagner, J.E. (2008). Fanconi anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 11: Late Effects in Fanconi Anemia Patients Post-Transplant (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).

Magdalena, N., Pilonetto, D.V., Bitencourt, M.A., Pereira, N.F., Ribeiro, R.C., Jeng, M., and Pasquini, R. (2005). Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the FANCA 3788-3790del mutation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 669–673.

Mankad, A., Taniguchi, T., Cox, B., Akkari, Y., Rathbun, R.K., Lucas, L., Bagby, G., Olson, S., D'Andrea, A., and Grompe, M. (2006). Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia. *Blood* 107, 3084–3090.

Martin, G.M., and Oshima, J. (2000). Lessons from human progeroid syndromes. *Nature* 408, 263–266.

McCauley, J., Masand, N., McGowan, R., Rajagopalan, S., Hunter, A., Michaud, J.L., Gibson, K., Robertson, J., Vaz, F., Abbs, S., et al. (2011). X-linked

VACTERL with hydrocephalus syndrome: Further delineation of the phenotype caused by FANCB mutations. *Am. J. Med. Genet. A.* 155, 2370–2380.

Medeiros, C., Zanis-Neto, J., and Pasquini, R. (1999). Bone marrow transplantation for patients with Fanconi anemia: reduced doses of cyclophosphamide without irradiation as conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 24, 849–852.

Meetei, A.R., Levitus, M., Xue, Y., Medhurst, A.L., Zwaan, M., Ling, C., Roomans, M.A., Bier, P., Hoatlin, M., Pals, G., et al. (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 36, 1219–1224.

Meyer, S., Neitzel, H., and Tönnies, H. (2012). Chromosomal Aberrations Associated with Clonal Evolution and Leukemic Transformation in Fanconi Anemia: Clinical and Biological Implications. *Anemia*, vol. 2012 *Anemia*, vol. 2012, 1–6.

Moldovan, G.-L., and D'Andrea, A.D. (2009). How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annu. Rev. Genet.* 43, 223–249.

Moore, J.B., Farrar, J.E., Arceci, R.J., Liu, J.M., and Ellis, S.R. (2010). Distinct ribosome maturation defects in yeast models of Diamond-Blackfan anemia and Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica* 95, 57–64.

Morgan, N.V., Tipping, A.J., Joenje, H., and Mathew, C.G. (1999). High Frequency of Large Intragenic Deletions in the Fanconi Anemia Group A Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1330 – 1341.

Mukhopadhyay, S.S., Leung, K.S., Hicks, M.J., Hastings, P.J., Youssoufian, H., and Plon, S.E. (2006). Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia. *J. Cell Biol.* 175, 225–235.

Müller, L.U.W., Schlaeger, T.M., DeVine, A.L., and Williams, D.E. (2012). Induced pluripotent stem cells as a tool for gaining new insights into Fanconi anemia. *Cell Cycle* 11, 2985–2990.

Nakata, S., Matsumura, I., Tanaka, H., Ezoe, S., Satoh, Y., Ishikawa, J., Era, T., and Kanakura, Y. (2004). NF- κ B Family Proteins Participate in Multiple Steps of Hematopoiesis through Elimination of Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* 279, 55578–55586.

Narla, A., and Ebert, B.L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115, 3196–3205.

Neveling, K., Endt, D., Hoehn, H., and Schindler, D. (2009). Genotype–phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 668, 73 – 91.

- New, H.V., Cale, C.M., Tischkowitz, M., Jones, A., Telfer, P., Veys, P., D'Andrea, A., Mathew, C.G., and Hann, I. (2005). Nijmegen breakage syndrome diagnosed as Fanconi anaemia. *Pediatr. Blood Cancer* 44, 494–499.
- Nicotera, T.M. (1991). Molecular and biochemical aspects of Bloom's syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 53, 1 – 13.
- Niedernhofer, L.J., Lalai, A.S., and Hoeijmakers, J.H.J. (2005). Fanconi Anemia Crosslinked to DNA Repair. *Cell* 123, 1191 – 1198.
- Nijman, S.M.B., Huang, T.T., Dirac, A.M.G., Brummelkamp, T.R., Kerkhoven, R.M., D'Andrea, A.D., and Bernards, R. (2005). The Deubiquitinating Enzyme USP Regulates the Fanconi Anemia Pathway. *Mol. Cell* 17, 331 – 339.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., and Goodship, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein ATR results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 33, 497–501.
- O'Driscoll, M., Gennery, A.R., Seidel, J., Concannon, P., and Jeggo, P.A. (2004). An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair* 3, 1227 – 1235.
- Oestergaard, V.H., Langevin, F., Kuiken, H.J., Pace, P., Niedzwiedz, W., Simpson, L.J., Ohzeki, M., Takata, M., Sale, J.E., and Patel, K.J. (2007). Deubiquitination of FANCD2 Is Required for DNA Crosslink Repair. *Mol. Cell* 28, 798 – 809.
- Offit, K., and Brown, K. (1994). Quantitating familial cancer risk: a resource for clinical oncologists. *J. Clin. Oncol.* 12, 1724–1736.
- Ogilvie, C.M., Braude, P.R., and Scriven, P.N. (2005). Preimplantation Genetic Diagnosis—An Overview. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 255–260.
- Oostra, A.B., Nieuwint, A.W.M., Joenje, H., and de Winter, J.P. (2012). Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. *Anemia*, vol. 2012 *Anemia*, vol. 2012, 1–9.
- Pace, P., Mosedale, G., Hodskinson, M.R., Rosado, I.V., Sivasubramaniam, M., and Patel, K.J. (2010). Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway. *Science* 329, 219–223.
- Pagano, G., Degan, P., D'Ischia, M., Kelly, F.J., Nobili, B., Pallardó, F.V., Youssoufian, H., and Zatterale, A. (2005). Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur. J. Haematol.* 75, 93–100.
- Pagano, G., Talamanca, A.A., Castello, G., d' Ischia, M., Pallardó, F.V., Petrović, S., Porto, B., Tiano, L., and Zatterale, A. (2013). From clinical

description, to in vitro and animal studies, and backward to patients: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Fanconi anemia. *Free Radic. Biol. Med.* 58, 118 – 125.

Papadogeorgou, E.V., and Soucacos, P.N. (2008). Treatment alternatives of congenital hand differences with thumb hypoplasia involvement. *Microsurgery* 28, 121–130.

Papapetrou, E.P. (2012). FA iPS: correction or reprogramming first? *Blood* 119, 5341–5342.

Park, Y., and Gerson, S.L. (2004). DNA Repair Defects in Stem Cell Function and Aging*. *Annu. Rev. Med.* 56, 495–508.

Park, S.-J., Ciccone, S.L.M., Beck, B.D., Hwang, B., Freie, B., Clapp, D.W., and Lee, S.-H. (2004). Oxidative Stress/Damage Induces Multimerization and Interaction of Fanconi Anemia Proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 30053–30059.

Patel, A.G., Sarkaria, J.N., and Kaufmann, S.H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 3406–3411.

Pedersen, M., Bruunsgaard, H., Weis, N., Hendel, H.W., Andreassen, B.U., Eldrup, E., Dela, F., and Pedersen, B.K. (2003). Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. *Mech. Ageing Dev.* 124, 495 – 502.

Peng, M., Litman, R., Xie, J., Sharma, S., Brosh, R.M., and Cantor, S.B. (2007). The FANCI/MutL[alpha] interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. *EMBO J* 26, 3238–3249.

Perreault, S., Bernard, G., Lortie, A., Deist, F.L., and Decaluwe, H. (2012). Ataxia-Telangiectasia Presenting With a Novel Immunodeficiency. *Pediatr. Neurol.* 46, 322 – 324.

Petra van der Lelij, Anneke B. Oostra, Martin A. Rooimans, Hans Joenje, and Johan P. de Winter (2010). Diagnostic Overlap between Fanconi Anemia and the Cohesinopathies: Roberts Syndrome and Warsaw Breakage Syndrome. *Anemia* 2010.

Pettersson, E., Lundeberg, J., and Ahmadian, A. (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics* 93, 105 – 111.

Pilonetto, D.V., Pereira, N.F., Bitencourt, M.A., Magdalena, N.I.R., Vieira, E.R., Veiga, L.B.A., Cavalli, I.J., Ribeiro, R.C., and Pasquini, R. (2009). FANCD2

Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 237–243.

Poot, M., Groß, O., Epe, B., Pflaum, M., and Hoehn, H. (1996). Cell Cycle Defect in Connection with Oxygen and Iron Sensitivity in Fanconi Anemia Lymphoblastoid Cells. *Exp. Cell Res.* 222, 262 – 268.

Qasim, W., Gaspar, H.B., and Thrasher, A.J. (2009). Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies. *Gene Ther* 16, 1285–1291.

Rackoff, W., Orazi, A., Robinson, C., Cooper, R., Alter, B., Freedman, M., Harris, R., and Williams, D. (1996). Prolonged administration of granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) to patients with Fanconi anemia: a pilot study. *Blood* 88, 1588–1593.

Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., et al. (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 39, 165–167.

Rajasingh, J. (2012). Chapter 3 - Reprogramming of Somatic Cells. In *Genetics of Stem Cells, Part A*, Y. Tang, ed. (Academic Press), pp. 51 – 82.

Rastogi, M., and LaFranchi, S. (2010). Congenital hypothyroidism. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 17.

Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J., Consiglio, A., Castella, M., Rio, P., Sleep, E., et al. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460, 53–59.

Rechitsky, S., Kuliev, A., Tur-Kaspa, I., Morris, R., and Verlinsky, Y. (2004). Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching. *Reprod. Biomed. Online* 9, 210 – 221.

Rechitsky, S., Kuliev, A., Sharapova, T., Laziuk, K., Ozen, S., Barsky, I., Verlinsky, O., Tur-Kaspa, I., and Verlinsky, Y. (2006). Preimplantation {HLA} typing with aneuploidy testing. *Reprod. Biomed. Online* 12, 89 – 100.

Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., et al. (2007). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 39, 162–164.

Ridet, A., Guillouf, C., Duchaud, E., Cundari, E., Fiore, M., Moustacchi, E., and Rosselli, F. (1997). Deregulated Apoptosis Is a Hallmark of the Fanconi Anemia Syndrome. *Cancer Res.* 57, 1722–1730.

Ridpath, J.R., Nakamura, A., Tano, K., Luke, A.M., Sonoda, E., Arakawa, H., Buerstedde, J.-M., Gillespie, D.A.F., Sale, J.E., Yamazoe, M., et al. (2007). Cells Deficient in the FANCD1/BRCA1 Pathway Are Hypersensitive to Plasma Levels of Formaldehyde. *Cancer Res.* *67*, 11117–11122.

Ro, P., Segovia, J.C., Hanenberg, H., Casado, J., Martinez, J., Gotsche, K., Cheng, N.C., Van de Vrugt, H.J., Arwert, F., Joenje, H., et al. (2002). In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood* *100*, 2032–2039.

Rochowski, A., Olson, S.B., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Lange, B.J., and Alter, B.P. (2012). Patients with Fanconi anemia and AML have different cytogenetic clones than de novo cases of AML. *Pediatr. Blood Cancer* *59*, 922–924.

Rosado, I.V., Langevin, F., Crossan, G.P., Takata, M., and Patel, K.J. (2011). Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1432–1434.

Rose, S.R., Petryk, A., and Stratakis, C.A. (2008). Fanconi anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 7: Endocrine Disorders in Fanconi Anemia. (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).

Rose, S.R., Myers, K.C., Rutter, M.M., Mueller, R., Khoury, J.C., Mehta, P.A., Harris, R.E., and Davies, S.M. (2012). Endocrine phenotype of children and adults with Fanconi anemia. *Pediatr. Blood Cancer* *59*, 690–696.

Rosenberg, P.S., Greene, M.H., and Alter, B.P. (2003). Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* *101*, 822–826.

Rosenberg, P.S., Tamary, H., and Alter, B.P. (2011). How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am. J. Med. Genet. A.* *155*, 1877–1883.

Rosselli, F., Sanceau, J., Wietzerbin, J., and Moustacchi, E. (1992). Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. *Hum. Genet.* *89*, 42–48.

Rosselli, F., Sanceau, J., Gluckman, E., Wietzerbin, J., and Moustacchi, E. (1994). 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* *83*, 1216–1225.

Rossouw, J., Anderson, G., Prentice, R., LaCroix, A., Kooperberg, C., Stefanick, M., Jackson, R., Beresford, S., Howard, B., Johnson, K., et al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* *288*, 321–333.

- Rothbaum, R., Perrault, J., Vlachos, A., Cipolli, M., Alter, B.P., Burroughs, S., Durie, P., Elghetany, M.T., Grand, R., Hubbard, V., et al. (2002). Shwachman-Diamond syndrome: Report from an international conference. *J. Pediatr.* *141*, 266 – 270.
- Rudd, M.F., Williams, R.D., Webb, E.L., Schmidt, S., Sellick, G.S., and Houlston, R.S. (2005). The Predicted Impact of Coding Single Nucleotide Polymorphisms Database. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *14*, 2598–2604.
- Saadatzadeh, M.R., Bijangi-Vishehsaraei, K., Hong, P., Bergmann, H., and Haneline, L.S. (2004). Oxidant Hypersensitivity of Fanconi Anemia Type C-deficient Cells Is Dependent on a Redox-regulated Apoptotic Pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 16805–16812.
- Sale, J.E., Lehmann, A.R., and Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 141–152.
- Sandhu, S., and Sekeres, M. (2008). Myelodysplastic syndromes: more prevalent than we know. *Geriatrics* *63*, 10–17.
- Satagopan, J.M., Ben-Porat, L., Berwick, M., Robson, M., Kutler, D., and Auerbach, A.D. (2004). A note on competing risks in survival data analysis. *Br J Cancer* *91*, 1229–1235.
- Savino, M., Borriello, A., d' Apolito, M., Criscuolo, M., Del Vecchio, M., Bianco, A.M., Di Perna, M., Calzone, R., Nobili, B., Zatterale, A., et al. (2003). Spectrum of FANCA mutations in Italian Fanconi anemia patients: Identification of six novel alleles and phenotypic characterization of the S858R variant. *Hum. Mutat.* *22*, 338–339.
- Scheckenbach, K., Morgan, M., Filger-Brillinger, J., Sandmann, M., Strimling, B., Scheurlen, W., Schindler, D., Göbel, U., and Hanenberg, H. (2012). Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol. *Blood Cells. Mol. Dis.* *48*, 128 – 131.
- Schultz, J.C., and Shahidi, N.T. (1993). Tumor necrosis factor- α overproduction in Fanconi's anemia. *Am. J. Hematol.* *42*, 196–201.
- Schuster, S.C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Meth* *5*, 16–18.
- Schwarzenberg, S.J., and Yagizi, N. (2008). Fanconi anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 4: Gastrointestinal, Hepatic, and Nutritional Problems in FA. (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).
- Seal, S., Thompson, D., Renwick, A., Elliott, A., Kelly, P., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., Ahmed, M., Spanova, K., et al. (2006). Truncating mutations

in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38, 1239–1241.

Seyschab, H., Sun, Y., Friedl, R., Schindler, D., and Hoehn, H. (1993). G2 phase cell cycle disturbance as a manifestation of genetic cell damage. *Hum. Genet.* 92, 61–68.

Seyschab, H., Friedl, R., Sun, Y., Schindler, D., Hoehn, H., Hentze, S., and Schroeder-Kurth, T. (1995). Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 85, 2233–2237.

Shalitin, S., Phillip, M., Stein, J., Goshen, Y., Carmi, D., and Yaniv, I. (2006). Endocrine dysfunction and parameters of the metabolic syndrome after bone marrow transplantation during childhood and adolescence. *Bone Marrow Transpl.* 37, 1109–1117.

Shanske, A., Caride, D.G., Menasse-Palmer, L., Bogdanow, A., and Marion, R.W. (1997). Central nervous system anomalies in Seckel syndrome: Report of a new family and review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* 70, 155–158.

Shereda, R.D., Machida, Y., and Machida, Y.J. (2010). Human KIAA1018/FAN1 localizes to stalled replication forks via its ubiquitin-binding domain. *Cell Cycle* 9, 4007–4013.

Shimamura, A. (2008). Fanconi anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 3: Treatment of Hematologic Abnormalities in Fanconi Anemia. (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).

Shimamura, A., and Alter, B.P. (2010). Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev.* 24, 101 – 122.

Shimamura, A., de Oca, R.M., Svenson, J.L., Haining, N., Moreau, L.A., Nathan, D.G., and D'Andrea, A.D. (2002). A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 100, 4649–4654.

Sims, A.E., Spiteri, E., Sims, R.J., Arita, A.G., Lach, F.P., Landers, T., Wurm, M., Freund, M., Neveling, K., Hanenberg, H., et al. (2007). FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* 14, 564–567.

Singh, T.R., Saro, D., Ali, A.M., Zheng, X.-F., Du, C., Killen, M.W., Sachpatzidis, A., Wahengbam, K., Pierce, A.J., Xiong, Y., et al. (2010). MHF1-MHF2, a Histone-Fold-Containing Protein Complex, Participates in the Fanconi Anemia Pathway via FANCM. *Mol. Cell* 37, 879 – 886.

Smith, D.W.E. (1993). *Human Longevity*. Oxf. Univ. Press New York Oxf. 84–85.

Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E., Hurov, K., Luo, J., Ballif, B., Gygi, S., Hofmann, K., D'Andrea, A., et al. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* *129*, 289–301.

Smogorzewska, A., Desetty, R., Saito, T.T., Schlabach, M., Lach, F.P., Sowa, M.E., Clark, A.B., Kunkel, T.A., Harper, J.W., Colaiácovo, M.P., et al. (2010). A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair. *Mol. Cell* *39*, 36 – 47.

SociÉ, G., Devergie, A., Girinski, T., Piel, G., Ribaud, P., Esperou, H., Parquet, N., Maarek, O., Noguera, M.-H., Richard, P., et al. (1998). Transplantation for Fanconi's anaemia: long-term follow-up of fifty patients transplanted from a sibling donor after low-dose cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning. *Br. J. Haematol.* *103*, 249–255.

Sohn, Y.-D., Han, J.W., and Yoon, Y. (2012). Chapter 1 - Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Somatic Cells. In *Genetics of Stem Cells, Part A*, Y. Tang, ed. (Academic Press), pp. 1 – 26.

Soldado, F., Zlotolow, D.A., and Kozin, S.H. (2013). Thumb Hypoplasia. *J. Hand Surg.* *38*, 1435 – 1444.

Soulier, J., Leblanc, T., Larghero, J., Dastot, H., Shimamura, A., Guardiola, P., Esperou, H., Ferry, C., Jubert, C., Feugeas, J.-P., et al. (2005). Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood* *105*, 1329–1336.

Stern, P.L., Burg, S.H. van der, Hampson, I.N., Broker, T.R., Fiander, A., Lacey, C.J., Kitchener, H.C., and Einstein, M.H. (2012). Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine* *30*, Supplement 5, F71–F82.

Stray-Pedersen, A., Borresen-Dale, A.L., Paus, E., Lindman, C.R., Burgers, T., and Abrahamsen, T.G. (2007). Alpha fetoprotein is increasing with age in ataxia–telangiectasia. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* *11*, 375 – 380.

Struewing, J.P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S.M., Berlin, M., McAdams, M., Timmerman, M.M., Brody, L.C., and Tucker, M.A. (1997). The Risk of Cancer Associated with Specific Mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* *336*, 1401–1408.

Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O'Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair. *Cell* *138*, 63 – 77.

Syrrou, M., Georgiou, I., Paschopoulos, M., and Lolis, D. (1995). Seckel syndrome in a family with three affected children and hematological manifestations associated with chromosome instability. *Genet. Couns. Geneva Switz.* 6, 37–41.

Taniguchi, T., and D'Andrea, A. (2006). Molecular pathogenesis of fanconi anemia: recent progress. *Blood* 107, 4223–4233.

Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2002). S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100, 2414–2420.

Lo Ten Foe, J., Kwee, M., Rooimans, M., Oostra, A., Veerman, A., van Weel, M., Pauli, R., Shahidi, N., Dokal, I., Roberts, I., et al. (1997a). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 5, 137–148.

Lo Ten Foe, J., Kwee, M., Rooimans, M., Oostra, A., Veerman, A., van Weel, M., Pauli, R., Shahidi, N., Dokal, I., Roberts, I., et al. (1997b). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 5, 137–148.

Lo Ten Foe, J.R., Rooimans, M.A., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Wijker, M., Parker, L., Lightfoot, J., Carreau, M., Callen, D.F., Savoia, A., et al. (1996). Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* 14, 320–323.

The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group (2000). Nijmegen breakage syndrome. *Arch. Dis. Child.* 82, 400–406.

Thoms, K.-M., Kuschal, C., and Emmert, S. (2007). Lessons learned from DNA repair defective syndromes. *Exp. Dermatol.* 16, 532–544.

Tischkowitz, M., and Dokal, I. (2004). Fanconi anaemia and leukaemia – clinical and molecular aspects. *Br. J. Haematol.* 126, 176–191.

Tolar, J., Adair, J.E., Antoniou, M., Bartholomae, C.C., Becker, P.S., Blazar, B.R., Bueren, J., Carroll, T., Cavazzana-Calvo, M., Clapp, D.W., et al. (2011). Stem Cell Gene Therapy for Fanconi Anemia: Report from the 1st International Fanconi Anemia Gene Therapy Working Group Meeting. *Mol Ther* 19, 1193–1198.

Tomoo Ogi, Sarah Walker, Tom Stiff, Emma Hobson, Siripan Limsirichaikul, Gillian Carpenter, Katrina Prescott, Mohnish Suri, Philip J. Byrd, Michiko Matsuse, et al. (2012). Identification of the First ATRIP-Deficient Patient and Novel Mutations in ATR Define a Clinical Spectrum for ATR-ATRIP Seckel Syndrome. *PLoS Genet.* 8.

Tonkin, M.A. (2012). Thumb Duplication: Concepts and Techniques. *Clin Orthop Surg* 4, 1–17.

Tönnies, H., Huber, S., Kühl, J.-S., Gerlach, A., Ebell, W., and Neitzel, 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, 3872–3874.

Törnquist, A.L., Martin, L., Winiarski, J., and Fahnehjelm, K.T. (2013). Ocular manifestations and visual functions in patients with Fanconi anaemia. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* no–no.

Tremblay, J.P., Xiao, X., Aartsma-Rus, A., Barbas, C., Blau, H.M., Bogdanove, A.J., Boycott, K., Braun, S., Breakefield, X.O., Bueren, J.A., et al. (2013). Translating the Genomics Revolution: The Need for an International Gene Therapy Consortium for Monogenic Diseases. *Mol Ther* 21, 266–268.

Trujillo, J.P., Mina, L.B., Pujol, R., Bogliolo, M., Andrieux, J., Holder, M., Schuster, B., Schindler, D., and Surrallés, J. (2012). On the role of FAN1 in Fanconi anemia. *Blood* 120, 86–89.

Tsangaris, E., Klaassen, R., Fernandez, C.V., Yanofsky, R., Shereck, E., Champagne, J., Silva, M., Lipton, J.H., Brossard, J., Michon, B., et al. (2011). Genetic analysis of inherited bone marrow failure syndromes from one prospective, comprehensive and population-based cohort and identification of novel mutations. *J. Med. Genet.* 48, 618–628.

Tsuchida, K., and Komatsu, K. (2008). Impaired removal of DNA interstrand cross-link in Nijmegen breakage syndrome and Fanconi anemia, but not in BRCA-defective group. *Cancer Sci.* 99, 2238–2243.

Urban, M., Rogalla, P., Tinschert, S., and Krietsch, P. (1997). Tetrphocomelia and bilateral cleft lip in a historical case of Roberts syndrome [Virchow, 1898]. *Am. J. Med. Genet.* 72, 307–314.

Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., Endt, D., Kesterton, I., Autore, F., et al. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet* 42, 406–409.

Ventura, J.-J., Cogswell, P., Flavell, R.A., Baldwin, A.S., and Davis, R.J. (2004). JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev.* 18, 2905–2915.

Verberg, M.F.G., Eijkemans, M.J.C., Macklon, N.S., Heijnen, E.M.E.W., Baart, E.B., Hohmann, F.P., Fauser, B.C.J.M., and Broekmans, F.J. (2009). The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 15, 5–12.

- Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, and Kuliev A (2001). Preimplantation diagnosis for fanconi anemia combined with hla matching. *JAMA* 285, 3130–3133.
- Vlachos, A., Rosenberg, P.S., Atsidaftos, E., Alter, B.P., and Lipton, J.M. (2012). Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood* 119, 3815–3819.
- Vrouwe, M.G., Elghalbzouri-Maghrani, E., Meijers, M., Schouten, P., Godthelp, B.C., Bhuiyan, Z.A., Redeker, E.J., Mannens, M.M., Mullenders, L.H.F., Pastink, A., et al. (2007). Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: evidence for impaired recombinational repair. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1478–1487.
- Vulliamy, T., Marrone, A., Szydlo, R., Walne, A., Mason, P.J., and Dokal, I. (2004). Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet* 36, 447–449.
- Vuorela, M., Pylkäs, K., Hartikainen, J., Sundfeldt, K., Lindblom, A., Wachenfeldt Wäppling, A., Haanpää, M., Puistola, U., Rosengren, A., Anttila, M., et al. (2011). Further evidence for the contribution of the RAD51C gene in hereditary breast and ovarian cancer susceptibility. *Breast Cancer Res. Treat.* 130, 1003–1010.
- Waisfisz, Q., Morgan, N.V., Savino, M., de Winter, J.P., van Berkel, C.G.M., Hoatlin, M.E., Ianzano, L., Gibson, R.A., Arwert, F., Savoia, A., et al. (1999). Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet* 22, 379–383.
- Wajnrajch, M.P., Gertner, J.M., Huma, Z., Popovic, J., Lin, K., Verlander, P.C., Batish, S.D., Giampietro, P.F., Davis, J.G., New, M.I., et al. (2001). Evaluation of Growth and Hormonal Status in Patients Referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics* 107, 744–754.
- Wang, J., Otsuki, T., Youssoufian, H., Foe, J.L.T., Kim, S., Devetten, M., Yu, J., Li, Y., Dunn, D., and Liu, J.M. (1998). Overexpression of the Fanconi Anemia Group C Gene (FAC) Protects Hematopoietic Progenitors from Death Induced by Fas-mediated Apoptosis. *Cancer Res.* 58, 3538–3541.
- Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M., and Enomoto, T. (2004). The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in {DT40} cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1688, 137 – 144.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J., and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* 14, 927–939.

Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsurimoto, T., Inoue, H., and Yamaizumi, M. (2004). Rad18 guides pol[eta] to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J* 23, 3886–3896.

Woods, C.G., Leversha, M., and Rogers, J.G. (1995). Severe intrauterine growth retardation with increased mitomycin C sensitivity: a further chromosome breakage syndrome. *J. Med. Genet.* 32, 301–305.

Writing Group for the Women’s Health Initiative Investigators (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women’s health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321–333.

Wu, Y., and Brosh, R.M. (2009). FANCD1 Helicase Operates in the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway and the Response to Replicational Stress. *Curr Mol Med.* 9, 470–482.

Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., and Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, {PALB2}. *Mol. Cell* 22, 719 – 729.

Xu, X., Yi, F., Pan, H., Duan, S., Ding, Z., Yuan, G., Qu, J., Zhang, H., and Liu, G. (2013). Progress and prospects in stem cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* 34, 741–746.

Yagasaki, H., Hamanoue, S., Oda, T., Nakahata, T., Asano, S., and Yamashita, T. (2004). Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi anemia gene FANCA in the Japanese population. *Hum. Mutat.* 24, 481–490.

Yamamoto, K.N., Kobayashi, S., Tsuda, M., Kurumizaka, H., Takata, M., Kono, K., Jiricny, J., Takeda, S., and Hirota, K. (2011). Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6492–6496.

Yamashita, T., Wu, N., Kupfer, G., Corless, C., Joenje, H., Grompe, M., and D’Andrea, A. (1996). Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood* 87, 4424–4432.

Yan, Z., Guo, R., Paramasivam, M., Shen, W., Ling, C., Fox III, D., Wang, Y., Oostra, A.B., Kuehl, J., Lee, D.-Y., et al. (2012). A Ubiquitin-Binding Protein,

FAAP20, Links RNF8-Mediated Ubiquitination to the Fanconi Anemia DNA Repair Network. *Mol. Cell* 47, 61–75.

Yu, X., Chini, C.C.S., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003). The BRCT Domain Is a Phospho-Protein Binding Domain. *Science* 302, 639–642.

Zatterale, A., Kelly, F.J., Degan, P., d' Ischia, M., Pallardó, F.V., Calzone, R., Dunster, C., Lloret, A., Manini, P., Coğulu, O., et al. (2007). Oxidative stress biomarkers in four Bloom syndrome (BS) patients and in their parents suggest in vivo redox abnormalities in BS phenotype. *Clin. Biochem.* 40, 1100 – 1103.

Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., and Yu, X. (2009). {PALB2} Links {BRCA1} and {BRCA2} in the DNA-Damage Response. *Curr. Biol.* 19, 524 – 529.

Zhang, Q.-S., Eaton, L., Snyder, E.R., Houghtaling, S., Mitchell, J.B., Finegold, M., Van Waes, C., and Grompe, M. (2008). Tempol Protects against Oxidative Damage and Delays Epithelial Tumor Onset in Fanconi Anemia Mice. *Cancer Res.* 68, 1601–1608.

Zhou, W., Otto, E.A., Cluckey, A., Airik, R., Hurd, T.W., Chaki, M., Diaz, K., Lach, F.P., Bennett, G.R., Gee, H.Y., et al. (2012). FAN1 mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair. *Nat Genet* 44, 910–915.

Zierhut, H. (2008). Fanconi anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Chapter 15: Genetic Counseling (Fanconi Anemia Research Fund, Inc.).

Zierhut, H., MacMillan, M., Wagner, J., and Bartels, D. (2013). More than 10 Years After the First —Senior Siblings”: Parental Experiences Surrounding Preimplantation Genetic Diagnosis. *J. Genet. Couns.* 1–9.

8. ANEXOS

ANEXO 1:

On the role of FAN1 in Fanconi anemia.

Blood. 2012 Jul 5;120(1):86-9. doi: 10.1182/blood-2012-04-420604.

blood

2012 120: 86-89
Prepublished online May 18, 2012;
doi:10.1182/blood-2012-04-420604

On the role of FAN1 in Fanconi anemia

Juan P. Trujillo, Leonardo B. Mina, Roser Pujol, Massimo Bogliolo, Joris Andrieux, Muriel Holder, Beatrice Schuster, Detlev Schindler and Jordi Surrallés

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/120/1/86.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Brief Reports](#) (1643 articles)
[Hematopoiesis and Stem Cells](#) (3125 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>



Brief report

On the role of FAN1 in Fanconi anemia

*Juan P. Trujillo,^{1,2} *Leonardo B. Mina,^{1,2} Roser Pujol,^{1,2} Massimo Bogliolo,^{1,2} Joris Andrieux,³ Muriel Holder,⁴ Beatrice Schuster,⁵ Detlev Schindler,⁵ and Jordi Surrallés^{1,2}

¹Genome Instability and DNA Repair Group, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain;

²Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Bellaterra, Barcelona, Spain; ³Institut de Génétique Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; ⁴Génétique Clinique, Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; and ⁵Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Fanconi anemia (FA) is a rare bone marrow failure disorder with defective DNA interstrand crosslink repair. Still, there are FA patients without mutations in any of the 15 genes individually underlying the disease. A candidate protein for those patients, FA nuclease 1 (FAN1), whose gene is located at chromosome 15q13.3, is recruited to stalled replication forks by binding to monoubiquitinated FANCD2 and is required for interstrand crosslink

repair, suggesting that mutation of FAN1 may cause FA. Here we studied clinical, cellular, and genetic features in 4 patients carrying a homozygous 15q13.3 microdeletion, including FAN1 and 6 additional genes. Biallelic deletion of the entire FAN1 gene was confirmed by failure of 3'- and 5'-PCR amplification. Western blot analysis failed to show FAN1 protein in the patients' cell lines. Chromosome fragility was normal in all 4 FAN1-deficient pa-

tients, although their cells showed mild sensitivity to mitomycin C in terms of cell survival and G₂ phase arrest, dissimilar in degree to FA cells. Clinically, there were no symptoms pointing the way to FA. Our results suggest that FAN1 has a minor role in interstrand crosslink repair compared with true FA genes and exclude FAN1 as a novel FA gene. (*Blood*. 2012;120(1):86-89)

Introduction

Fanconi anemia (FA) is characterized by chromosome breakage, congenital malformations, pancytopenia, and cancer susceptibility.¹ FA is a rare disease with a carrier frequency of 1:65 to 1:209.^{2,3} FA cells are hypersensitive to DNA interstrand crosslinking (ICL) drugs, such as mitomycin C (MMC) and diepoxybutane (DEB), and the diagnosis relies on an excess chromosome fragility after in vitro exposing patients' cells to these agents. There are at least 15 independent FA subtypes, each resulting from mutation of a distinct FA gene.⁴⁻⁷ However, a minority of FA patients remain unassigned, suggesting the existence of additional FA genes. Recently, 4 groups reported that FA nuclease 1 (FAN1) is a good candidate for a novel FA gene.⁸⁻¹¹ The reason is that FAN1 is recruited to stalled replication forks by binding to monoubiquitinated FANCD2, and its nuclease activity is required for ICL repair. Transient depletion of FAN1 in human transformed fibroblasts led to increased MMC-induced chromosome breakage rates. Consequently, all 4 groups suggested that FAN1 mutations may cause FA.⁸⁻¹¹

FAN1 maps to 15q13.3. Heterozygous 15q13.3 microdeletion has been associated with a variety of symptoms, including mental retardation, epilepsy, psychiatric disease, autism spectrum disorders, muscular hypotonia, and dysmorphic facial features. Penetrance of the microdeletion disorder is variable and encompasses severely affected patients to normal persons.¹² Apart from FAN1, 6 additional genes are located in 15q13.3 (ARHGAP11B, MTMR10, TRPM1, KLF13, OTUD7A, and CHRNA7). Here we studied 4 patients with homozygous 15q13.3 microdeletion^{12,13} to clarify whether lack of FAN1 may lead to FA.

Methods

Clinical features and blood samples were obtained from 4 homozygous 15q13.3 microdeletion patients (MD1-MD4) all previously diagnosed by array comparative genomic hybridization and quantitative PCR. Two of these patients (MD1 and MD2) have been mentioned before.^{12,13} Lack of FAN1 was confirmed at the gene level by PCR and at the protein level by Western blotting. The PCR primers used to amplify the 3' and 5' flanking regions of FAN1 were as follows: ex1 forward, 5'AGGGTTGTCTCCTCGT-TACAGGA3'; ex1 reverse, 5'GCTGAATCACTTTGGCCAGG3'; ex15 forward, 5'CTTCCTAAAACCTGCTGGAGG3'; and ex15 reverse, 5'AATGTACTGACCGTGTGCTCA3'. PCR, Western blot analysis, survival assays, and chromosome breakage assays were performed as described elsewhere.^{3,14-18} FAN1-monospecific antibody was kindly provided by Dr John Rouse (Dundee, United Kingdom) and used at 1:500 dilution. A total of 27 genetically unassigned FA cell lines had previously been excluded from belonging to any of the reported 15 FA complementation groups. This study was ethically approved by the Universitat Autònoma de Barcelona Institutional Review Board. Informed consent was obtained from all families in accordance with the Declaration of Helsinki.

Results and discussion

Study of FA candidate genes may enable the final classification of unassigned FA patients. Four recent studies have proposed FAN1 as a putative FA gene.⁸⁻¹¹ Here we studied 4 patients (MD1-MD4) with homozygous 15q13.3 microdeletion to clarify whether FAN1 deficiency leads to features consistent with FA. Two of these

Submitted March 30, 2012; accepted May 15, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 18, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-04-420604.

*J.P.T. and L.B.M. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

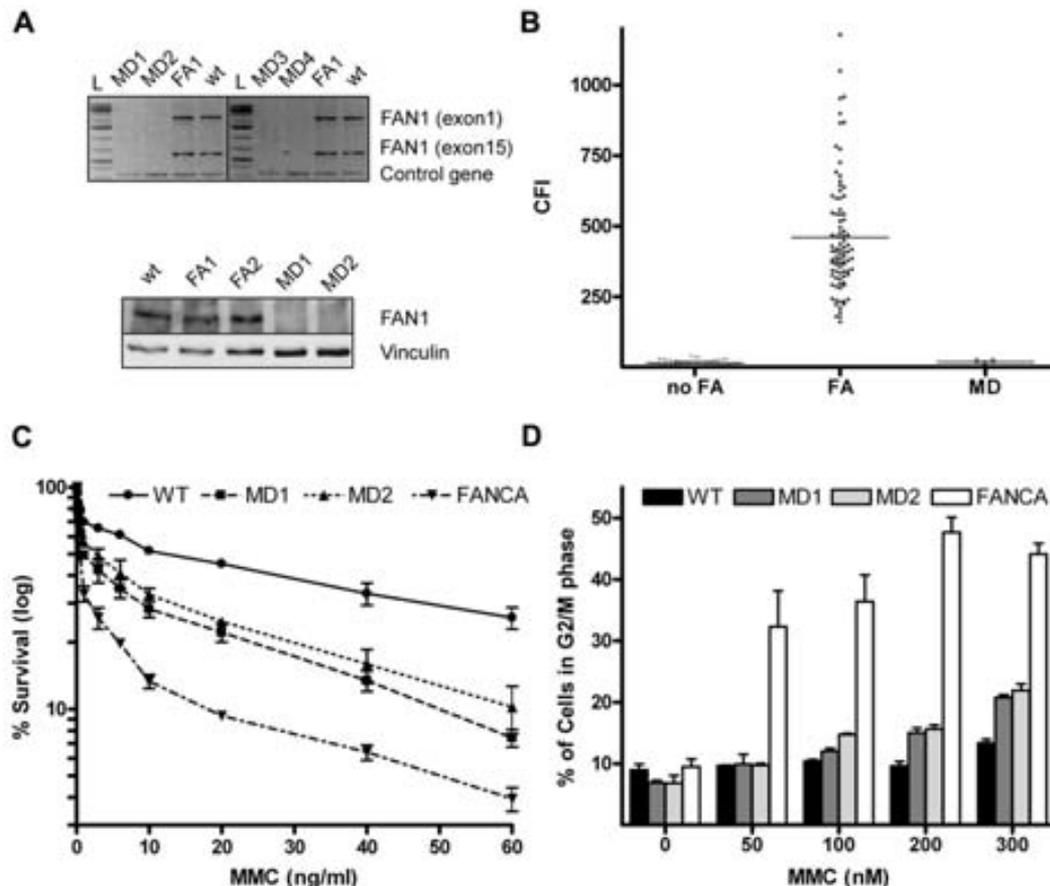


Figure 1. Absence of FAN1 and FA cellular phenotype in MD patients. (A) Fragments amplified by PCR corresponding to exons 1 and 15 of the *FAN1* gene were observed using DNA templates from a healthy person (WT) and a FANCA-deficient FA patient included as controls, whereas they were absent when templates from microdeletion patients (MD1 to MD4) were used, confirming the biallelic deletion of *FAN1* in the MD patients (top panel). Immunoblotting against FAN1 protein revealed a FAN1-specific band in WT and FA (FA1 and FA2) LCL that failed to be detected in MD1 and MD2. (bottom panel). (B) Dot plot of CFI showing individual values and average (solid line) of DEB-induced chromosome breakage from non-FA ($n = 56$), FA ($n = 90$, excluding mosaics) and MD ($n = 4$) persons. The CFI values of all MD patients ranged within the non-FA population. (C) Mild sensitivity of MD LCL to MMC on survival assay. The graph shows intermediate sensitivity to MMC of MD1 and MD2 compared with the highly sensitive FA (FANCA) cell line. (D) Near-normal sensitivity of MD LCL to MMC on cell cycle analysis. The graph plots the percentage of cells in G2/M phase after exposure to increasing concentrations of MMC for 72h. A WT and a FANCA cell lines were included as controls.

patients (MD1 and MD2) have previously been mentioned in unrelated reports^{12,13} and the other 2 are newly recognized siblings, detected by array comparative genomic hybridization (supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Considering that 15q13.3 microdeletion may have 3 different extensions,¹⁹ we aimed to corroborate homozygous absence of the *FAN1* gene by failure to PCR amplify its first (exon 1) and last (exon 15) exon from genomic DNA. DNA of 2 additional lymphoblastoid cell lines (LCLs), from a normal person and from a FANCA-deficient patient, served as controls. As shown in Figure 1A top panel, FAN1 PCR products are absent in all MD patients, confirming that all 4 MD patients have biallelic deletion of the entire *FAN1* gene. Moreover, lack of FAN1 expression was confirmed by FAN1 immunoblotting. Clearly, the FAN1-specific band was missing in the 2 available LCLs from MD patients (MD1 and MD2), whereas FAN1 was readily detected in the control LCLs (Figure 1A bottom panel).

To check whether FAN1 deficiency leads to DEB-induced chromosome fragility,^{20,21} we performed DEB tests on an LCL from patient MD1 and on blood T cells from patients MD2 to MD4. Chromosome breakage rates were quantified with the recently described chromosome fragility index (CFI)¹⁷ and the results

compared with our historical database.¹⁷ Clearly, the CFI of all MD patients fell into the range of the non-FA group (Figure 1B). Similar results were obtained with MMC (data not shown).

We next tested the survival of the 2 available MD LCLs in response to MMC. MD1, MD2, a wild-type and a FANCA LCL were challenged with 0 to 100 ng/mL of MMC. Based on LD₅₀ values, the MD cell lines showed mild sensitivity to MMC: whereas FANCA-deficient cells were more than 30-fold more sensitive to MMC than WT cells, MD1 and MD2 cells were, on average, 5-fold more sensitive to MMC than WT cells (Figure 1C). Silencing of the *FAN1* gene by siRNA was previously shown to impair ICL repair, leading to hypersensitivity of cells to ICL. However, this hypersensitivity was also intermediate compared with mRNA depletion of authentic FA genes, such as *FANCA*, *FANCD2*, or *FANCF*.⁸⁻¹⁰ This set of data suggests that the cellular response of FAN1-deficient cells to MMC is not fully functional but not impaired as in FA.

To further study the FA pathway in the absence of FAN1, cell cycle distributions of FAN1-deficient cell lines were analyzed by flow cytometry.²² Exposure to increasing concentrations of MMC for 72 hours resulted in G₂ arrest at low MMC concentrations in FA-A LCL, whereas G₂ arrest was very mild in the MD samples (Figure 1D), compatible with the mild sensitivity to MMC shown

Table 1. Patient characteristics

Patient no.	Age, y	Nationality	Clinical features	Hematology	Chromosome fragility	Sensitivity to MMC	G ₂ /M block	Reference
MD1	11	United States	Visual impairment, hypotonia, areflexia, absent language, epilepsy, microsomy, and microcephaly	Normal	Negative	Mild	Mild	13
MD2	6	France	Hypotonia, severe developmental delay; rod–cone dystrophy, epilepsy, and autistic features	Normal	Negative	Mild	Mild	12
MD3	1	France	Severe developmental delay, visual impairment, microsomy, and microcephaly	Normal	Negative	ND	ND	Present study
MD4	3	France	Severe developmental delay, absent language, visual impairment, microsomy, and microcephaly	Normal	Negative	ND	ND	Present study

MMC indicates mitomycin C; and MD, microdeletion.

before. These results are consistent with a recent report on Δ FAN1-DT40 cells showing that FAN1 protects cells against ICL agents in a pathway, which is not epistatic with the FA pathway and that FAN1 assumes in the processing of ICL only a secondary role or functions independently of the FA pathway.²³ We finally analyzed FAN1 protein expression levels in 27 cell line from unassigned FA patients by Western blotting. All of the unassigned FA cell lines expressed FAN1 protein at control levels, suggesting that none of these patients had major deficiency of this protein (supplemental Figure 2).

To assess the hematologic impact of FAN1 deficiency, we obtained clinical data and hemograms of MD2, MD3, and MD4. Normal hematology had earlier been reported for MD1.¹² As shown in Table 1, MD patients do not present with anemia, bone marrow failure, skin pigmentation anomalies, or FA-typical malformations, such as skeletal abnormalities of the upper limbs. Three of the MD patients (MD1, MD3, and MD4) showed microsomy and microcephaly, which is often seen in FA patients but also in other syndromes with defective processing of stalled replication forks, such as Seckle and Bloom syndromes and can be regarded as common symptoms of patients with DNA repair defects.²⁴ Yet we cannot conclude for certain that microcephaly and microsomy found in MD patients are caused by FAN1 deficiency because 6 additional genes are included in the 15q13.3 region. However, it is tempting to speculate that this is the case as FAN1 directly interacts with FANCD2, and 90% of patients with FANCD2 mutations have microcephaly.¹⁵

Even though LCLs with total FAN1 deficiency reveal mild sensitivity to MMC on some assays, normal expression of FAN1 in 27 unassigned FA cell lines, the lack of DEB- or MMC-induced chromosome fragility, and the absence of hematologic defects or FA-archetypal malformations exclude FAN1 as being an FA gene.

References

- Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003;101(4):1249-1256.
- Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(8):1877-1883.
- Callén E, Casado JA, Tischkowitz MD, et al. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood*. 2005;105(5):1946-1949.
- Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet*. 2007;8(10):735-748.
- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. 2010;42(5):410-414.
- Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, et al. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet*. 2005;37(9):958-963.
- Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet*. 2011;43(2):142-146.
- Kratz K, Schopf B, Kaden S, et al. Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell*. 2010;142(1):77-88.
- Liu T, Ghosal G, Yuan J, Chen J, Huang J. FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science*. 2010;329(5992):693-696.
- MacKay C, Declais AC, Lundin C, et al. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell*. 2010;142(1):65-76.
- Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, et al. A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA

Acknowledgments

The authors thank Dr B. C. Bittel (University of Missouri–Kansas City School of Medicine, Kansas City, MO) for providing an LCL from patient MD1 and Dr J. Rouse (University of Dundee, Dundee, United Kingdom) for sharing his anti-FAN1 antibody.

The laboratory of J.S. was supported by the Generalitat de Catalunya (SGR0489-2009), the Institut Català de Recerca i Estudis Avançats-Academia award, the Spanish Ministry of Science and Innovation (projects CB06/07/0023, and SAF2009-11936), and the European Regional Development Funds. Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

Authorship

Contribution: J.P.T., L.B.M., R.P., M.B., and B.S. performed experiments and helped write the manuscript; J.A. and M.H. provided essential research materials and clinical data and performed experiments; D.S. designed experiments and provided essential research materials; and J.S. coordinated and supervised the study, designed experiments, and wrote the paper with the help of L.B.M.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Jordi Surrallés, Genome Instability and DNA Repair Group, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra S/N, 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain; e-mail: jordi.surralles@uab.es.

- interstrand crosslink repair. *Mol Cell*. 2010;39(1):36-47.
12. Masurel-Paulet A, Andrieux J, Callier P, et al. Delineation of 15q13.3 microdeletions. *Clin Genet*. 2010;78(2):149-161.
 13. Lepichon JB, Bittel DC, Graf WD, Yu S. A 15q13.3 homozygous microdeletion associated with a severe neurodevelopmental disorder suggests putative functions of the TRPM1, CHRNA7, and other homozygously deleted genes. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(5):1300-1304.
 14. Bogliolo M, Lyakhovich A, Callen E, et al. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J*. 2007;26(5):1340-1351.
 15. Kalb R, Neveling K, Hoehn H, et al. Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *Am J Hum Genet*. 2007;80(5):895-910.
 16. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009;460(7251):53-59.
 17. Castella M, Pujol R, Callen E, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet*. 2011;48(4):242-250.
 18. Castella M, Pujol R, Callen E, et al. Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood*. 2011;117(14):3759-3769.
 19. Liao J, DeWard SJ, Madan-Khetarpal S, Surti U, Hu J. A small homozygous microdeletion of 15q13.3 including the CHRNA7 gene in a girl with a spectrum of severe neurodevelopmental features. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(11):2795-2800.
 20. Antonio Casado J, Callen E, Jacome A, et al. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet*. 2007;44(4):241-249.
 21. Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet*. 2003;Chapter 8:Unit 8.7.
 22. Ceccaldi R, Briot D, Larghero J, et al. Spontaneous abrogation of the G2DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. *J Clin Invest*. 2011;121(1):184-194.
 23. Yoshikiyo K, Kratz K, Hirota K, et al. KIAA1018/FAN1 nuclease protects cells against genomic instability induced by interstrand cross-linking agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21553-21557.
 24. O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of the DNA damage response pathways in brain development and microcephaly: insight from human disorders. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(7):1039-1050.

ANEXO 2:

Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients.

Genome Integr. 2012 Sep 14;3(1):6. doi: 10.1186/2041-9414-3-6.



RESEARCH

Open Access

Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients

Ivana Joksic^{1,2}, Dragana Vujic^{3,4}, Marija Guc-Scekic^{4,5}, Andreja Leskovic¹, Sandra Petrovic¹, Maryam Ojani⁶, Juan P Trujillo⁷, Jordi Surrallés⁷, Maja Zivkovic¹, Aleksandra Stankovic¹, Predrag Slijepcevic^{6*} and Gordana Joksic^{1*}

Abstract

Background: Fanconi anemia (FA) is characterized by sensitivity to DNA cross-linking agents, mild cellular, and marked clinical radio sensitivity. In this study we investigated telomeric abnormalities of non-immortalized primary cells (lymphocytes and fibroblasts) derived from FA patients of the FA-D2 complementation group, which provides a more accurate physiological assessment than is possible with transformed cells or animal models.

Results: We analyzed telomere length, telomere dysfunction-induced foci (TIFs), sister chromatid exchanges (SCE), telomere sister chromatid exchanges (T-SCE), apoptosis and expression of shelterin components TRF1 and TRF2. FANCD2 lymphocytes exhibited multiple types of telomeric abnormalities, including premature telomere shortening, increase in telomeric recombination and aberrant telomeric structures ranging from fragile to long-string extended telomeres. The baseline incidence of SCE in FANCD2 lymphocytes was reduced when compared to control, but in response to diepoxybutane (DEB) the 2-fold higher rate of SCE was observed. In contrast, control lymphocytes showed decreased SCE incidence in response to DEB treatment. FANCD2 fibroblasts revealed a high percentage of TIFs, decreased expression of TRF1 and invariable expression of TRF2. The percentage of TIFs inversely correlated with telomere length, emphasizing that telomere shortening is the major reason for the loss of telomere capping function. Upon irradiation, a significant decrease of TIFs was observed at all recovery times. Surprisingly, a considerable percentage of TIF positive cells disappeared at the same time when incidence of γ -H2AX foci was maximal. Both FANCD2 leucocytes and fibroblasts appeared to die spontaneously at higher rate than control. This trend was more evident upon irradiation; the percentage of leucocytes underwent apoptosis was 2.59- fold higher than that in control, while fibroblasts exhibited a 2- h delay before entering apoptosis.

Conclusion: The results of our study showed that primary cells originating from FA-D2 patients display shorten telomeres, elevated incidence of T-SCEs and high frequency of TIFs. Disappearance of TIFs in early response to irradiation represent distinctive feature of FANCD2 cells that should be examined further.

Keywords: Primary FA cells, Telomere dysfunction, Expression of TRF1 and TRF2

Background

Located at the ends of chromosomes, telomeres protect chromosomal termini from nucleolytic degradation and erroneous DNA repair; they also prevent activation of DNA damage checkpoints. Human telomeres consist of tandem arrays of a short repetitive DNA sequence (TTAGGG) oriented 5' to 3' towards the chromosome and ending in a single-stranded G rich 3' overhang. In human cells, the size of telomeric DNA is genetically regulated, as

they vary between individuals (e.g., from 10 to 15 kb in newborns). Telomere length is maintained by dynamic lengthening and shortening. Shortening results from nucleolytic degradation and incomplete DNA replication, whereas lengthening primarily results from telomerase activity, which restores telomeric sequences lost during DNA replication [1]. Telomeric repeats act as binding sites for shelterin: a six-subunit protein complex that protects chromosome ends [2]. Three shelterin subunits, TRF1, TRF2 and POT1, directly recognize TAAGGG repeats. TRF1 and TRF2 bind to double-stranded repeats of the telomere sequence, while POT1 binds single-stranded sites. TRF1 negatively regulates telomere length [3,4] but

* Correspondence: predrag.slijepcevic@brunel.ac.uk; gjoksic@vin.bg.ac.rs

⁶Brunel University, West London, United Kingdom

¹Vinca Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Full list of author information is available at the end of the article

facilitates the replication of telomeres in S-phase [5]. TRF2 protects chromosome ends by repressing DNA damage induced signaling, non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination repair (HRR) [6-8]. Telomere dysfunction occurs *via* the loss of telomere capping function or critical telomere shortening. Both mechanisms lead to the recruitment of DNA damage response (DDR) proteins and formation of telomere dysfunction-induced foci (TIFs) [9-11]. Defects in several DDR factors lead to telomere dysfunction in humans and mice [12]. Fanconi anemia (FA) is characterized by sensitivity to DNA cross-linking agents, mild cellular radio sensitivity and marked clinical radio sensitivity. Dysfunctional telomeres could account for this mild cellular radio sensitivity as a source of endogenous DNA damage. It is already known that FA cells show altered telomere maintenance [13-16], defects in DDR [17] and significant delay in repair kinetics of radiation-induced lesions [18]. We analyzed several telomere maintenance parameters, including telomere length, TIFs and recombination frequencies in the whole genome (sister chromatid exchange (SCE)) as well as at telomeres (telomere sister chromatid exchange (T-SCE)). In addition, we measured apoptosis and expression of the shelterin components TRF1 and TRF2 following exposure to ionizing radiation and the cross-linking agent diepoxybutane (DEB). The study was performed using non-immortalized primary cells derived from FA patients of the FANCD2 complementation group, providing a more accurate physiological assessment than is possible with transformed cells or animal models.

Results

Assignment of FA patients to complementation group D2

FA patients were assigned to FA-D2 subtype by immunoblotting. The absence of FANCD2 bands on standard exposure immunoblots suggested that all three patients (1823, 1866 and 1879) belong to complementation group FA-D2 (Figure 1). The over-exposure of the films showed faint FANCD2 bands upon MMC treatment unequivocally indicating that all patients have hypomorphic mutations in FANCD2 as previously described for a larger population of FA-D2 patients [19]. For patient 2093, complementation group analysis was previously performed (Universität Würzburg, Institut für Humangenetik, Germany) and showed that she also belongs to FA-D2 complementation group.

Telomere length analysis in FANCD2 lymphocytes by quantitative fluorescence *in situ* hybridization

Representative examples of metaphase spreads hybridized with telomeric PNA probes using Q-FISH and CO-FISH protocols are presented in Figure 2. The measurement of telomere length (Figure 3a) revealed that FA-D2 patients exhibited reduced lymphocyte telomere

length (23.50 ± 8.80), relative to age-matched controls (40.70 ± 7.36) ($P = 0.024$). The distribution of telomere length (Figure 3b) indicated that, in FANCD2 cells, 5% of telomeres displayed lengths of 0–10 relative length telomere unit (RTLUs), and more than 50% of all telomeres were only 10–20 RTLUs long. In control lymphocytes, the majority of telomeres were 30–50 RTLUs long (62.5%), short telomeres were not present and 15% of telomeres displayed lengths of 50–80 RTLUs. Control lymphocytes displayed typical Poisson distributions for individual chromosome telomere length, whereas the peak of Poisson distribution was shifted leftward in FANCD2 cells. The average percentage of cells displaying fragile telomeres (18.45%) and long-extended telomeres (17.83%) in FANCD2 lymphocytes are presented in Figure 3c.

Effects of diepoxybutane on the incidence of sister chromatid exchange and telomere sister chromatid exchange in FANCD2 lymphocytes

The incidence of spontaneous SCE in FANCD2 lymphocytes (3.87 ± 0.28) was significantly reduced when compared to control (4.89 ± 1.16) ($P < 0.05$) (Figure 3d). In response to DEB, a nearly two-fold increase of SCEs was observed in FANCD2 lymphocytes (6.68 ± 1.85), relative to the baseline state before treatment ($P = 0.04$). Appearance of double SCE (dSCE) in response to DEB frequently were observed (Figure 3e). In contrast, the same concentration of DEB decreased SCEs in control cells (4.35 ± 1.27) ($P = 0.034$).

CO-FISH indicated that the incidence of spontaneously occurring T-SCEs in FANCD2 primary lymphocytes (2.43 ± 1.96) was significantly higher than that of control cells ($P = 0.026$), and further increased upon exposure to DEB (3.69 ± 1.68). In control cells, the incidence of spontaneously occurring T-SCEs was minimal (0.32 ± 0.06) and almost unchanged in response to DEB (Figure 3f).

Effects of ionizing radiation on apoptosis of FANCD2 leucocytes and fibroblasts

As shown in Figure 3g and Figure 3h both FANCD2 leucocytes and fibroblasts appeared to die spontaneously at higher rate than control. Upon irradiation the percentage of leucocytes underwent apoptosis was 2.59-fold higher than that in control ($P = 0.0001$), while in fibroblasts, the mild 2-h delay of entering apoptosis was observed. Both FANCD2 and control fibroblasts extensively enter apoptosis 24 h after irradiation.

Effects of diepoxybutane and ionizing radiation on percentage of telomere dysfunction-induced foci in FANCD2 fibroblasts

Representative images of FANCD2 nuclei hybridized with telomeric PNA probes using TIF protocol are presented in

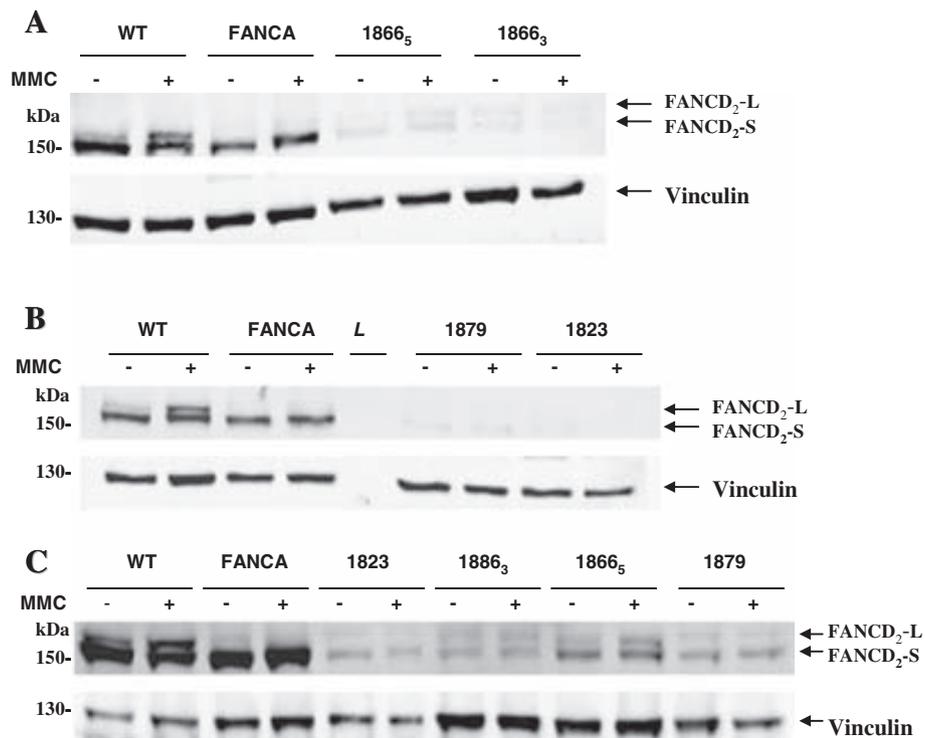


Figure 1 FANCD2 immunoblotting of fibroblast extracts from FA-D2 patients and control cell lines. Exposure of the 1823, 1866 (2 cell lines from the same patient) and 1879 patient cell lines to 50nM MMC for 24 h and subsequent analysis by Western blot (loading control Vinculin, **L**: lane for the Ladder). **A** Assignment to group FA-D2 of 1866₃ and 1866₅ patient cell lines on the basis of the absence FANCD2 on Western blot. **B** Assignment to group FA-D2 of 1823 and 1879 patient cell lines on the basis of the absence FANCD2 band on Western blot. **C** Over-exposure of immunoblots reveals that 1823, 1866₃, 1866₅ and 1879 patient cell lines show faint but visible FANCD2 bands in response to MMC.

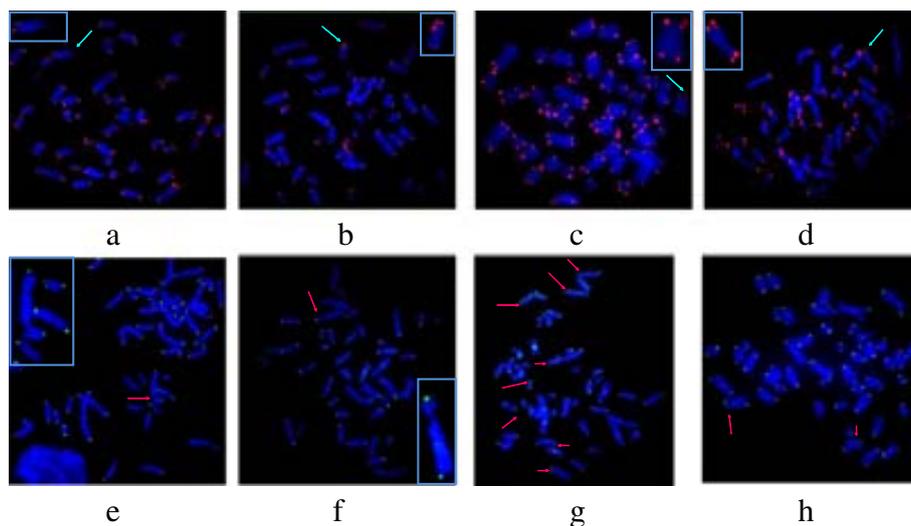


Figure 2 Representative images of metaphase spreads hybridized with telomeric PNA probes using Q-FISH (panels a-d) and CO-FISH (panels e-h) protocols. (b-d) Aberrant telomeric structures (blue arrows indicate long strings of fragmented telomeric signals: indicative of fragile telomeres) (e-h) The majority of chromosomes within a metaphase spread showed characteristic CO-FISH hybridization patterns in which telomere signals at opposite ends of the chromosome were in the trans position with respect to the sister chromatids. (a,e and f) Chromatid breakages in metaphase events of FANCD2 cells (arrows indicate no telomeric signals on the breakage points). (g-h) Telomere sister chromatid exchanges (red arrows).

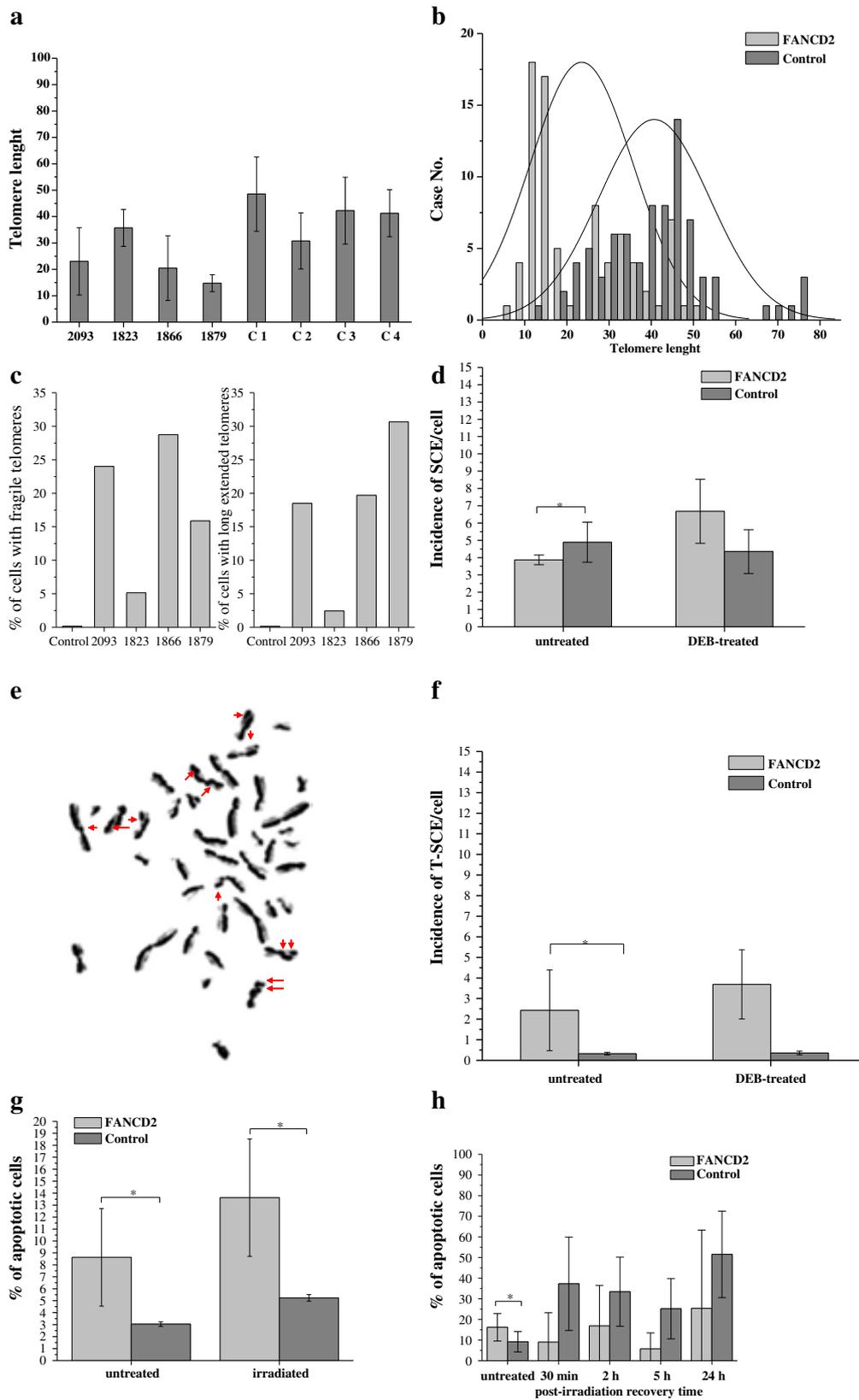


Figure 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 3 Results of analyses in FANCD2 and control lymphocytes. **a** Average telomere length (arbitrary units of RTLU \pm SD) measured by Q-FISH in FANCD2 (1823, 1866, 1879 and 2093) and control (C1-C4) cells. Cells originated from FANCD2 patients display shorter telomeres than the age-matched controls ($p=0.024$). **b** The distribution of telomere length indicated that control lymphocytes displayed typical Poisson distributions for individual chromosome telomere length, whereas the peak of Poisson distribution was shifted leftward in FANCD2 lymphocytes. **c** The percentage of fragile and long extended telomeres: in FANCD2 lymphocytes the percentage of cells displaying fragile telomeres is 18.45% on the average, whereas percentage of cells displaying long-extended telomeres is 17.83%. **d** SCE analysis. The incidence of spontaneous SCE in FANCD2 lymphocytes was significantly reduced when compared to control ($p < 0.05$). In response to DEB, almost two-fold increase of SCEs was observed in FANCD2 lymphocytes relative to the baseline state before treatment ($p=0.04$). Metaphase spread showing DEB treated FANCD2 lymphocytes with 13 SCE and two chromosomes with dSCE. **e** CO-FISH analysis. The incidence of spontaneously occurring T-SCEs in FANCD2 lymphocytes was significantly higher than that in control cells ($p=0.026$), and further increased in response to DEB. **f** Apoptosis assay showed a significant difference between FANCD2 and control leucocytes in percentage of spontaneously dying cells as well as in percentage of apoptotic cells induced by ionizing radiation. The data are presented as mean \pm SD. **g** Apoptosis of FANCD2 and control fibroblasts: FANCD2 cells spontaneously die with higher rate than controls and exhibit a mild delay in entering apoptosis. The data are presented as mean \pm SD.

Figure 4. The results of γ -H2AX and TIF analyses in FANCD2 and control fibroblasts are presented in Figure 5. While γ -H2AX foci were present in both control (5%) and FANCD2 fibroblasts (13.27%) enhanced co-localisation of the γ -H2AX with telomeres was observed only in FANCD2 fibroblasts. As shown in Figure 5a, in average 51.7% of γ -H2AX foci positive cells were TIF-positive (displaying more than five TIFs per nucleus). It is worth noting that the level of spontaneously occurring TIFs inversely correlated with telomere length ($P=0.03$), which emphasizes that shortened telomeres are the underlying cause of their dysfunction.

After DEB treatment, the percentage of TIF-positive FANCD2 cells was significantly reduced ($P=0.026$)

compared to self-state before treatment, whereas in control fibroblasts the percentage of TIF-positive cells slightly increased (Figure 5a).

Upon irradiation, the total number of γ -H2AX foci in FANCD2 fibroblasts was significantly higher at all recovery times, relative to control samples (Figure 5b). Distribution of radiation-induced foci among cells with a recovery time of 30 min, revealed a 2-fold increase in the number of cells containing more than 30 foci per cell; significantly higher compared to that in control fibroblasts ($P < 0.05$) (Figure 5b). Unexpected, at the same recovery time (30 min) when the incidence of γ -H2AX foci was maximal significant decrease of TIFs was observed (Figure 5c). Afterwards, the percentage of TIF

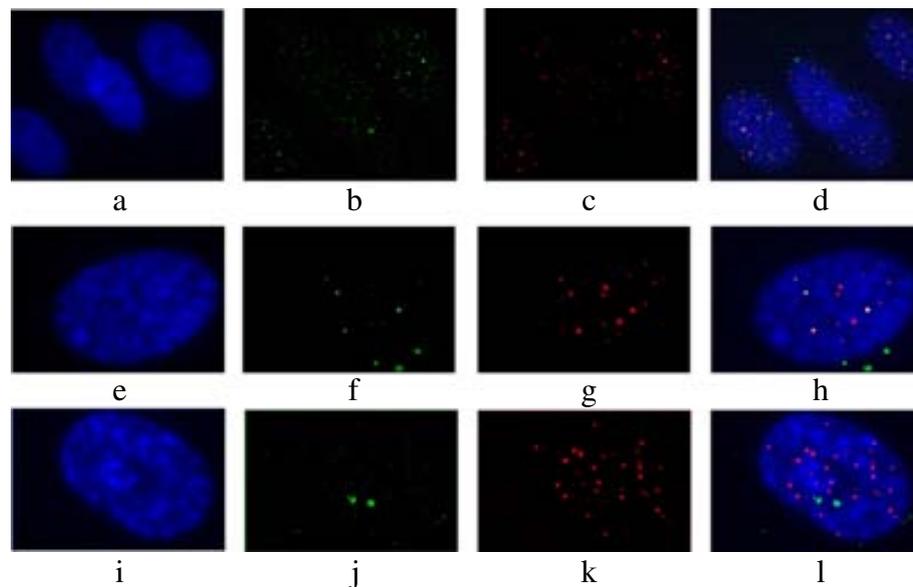


Figure 4 Representative images of cell nuclei with or without telomere dysfunction-induced foci (panels a-l). (a-h) Representative examples of FANCD2 nuclei with TIFs. (a, e) DAPI (b, f) γ -H2AX, (c, g) Telomeres and (d, h) Merged. When green and red signals overlap (merge) a yellow pattern is seen, indicating co-localisation of γ -H2AX with telomeres (i-l) Control cell nuclei with distinct γ -H2AX and telomere signals (no TIFs), (i) DAPI, (j) γ -H2AX, (k) Telomeres and (l) Merged. Zeiss-Axiomager A1 microscope equipped with a CCD camera, Axiocam image acquisition software (Imaging Associate) and software package from MetaSystem were used for analysis.

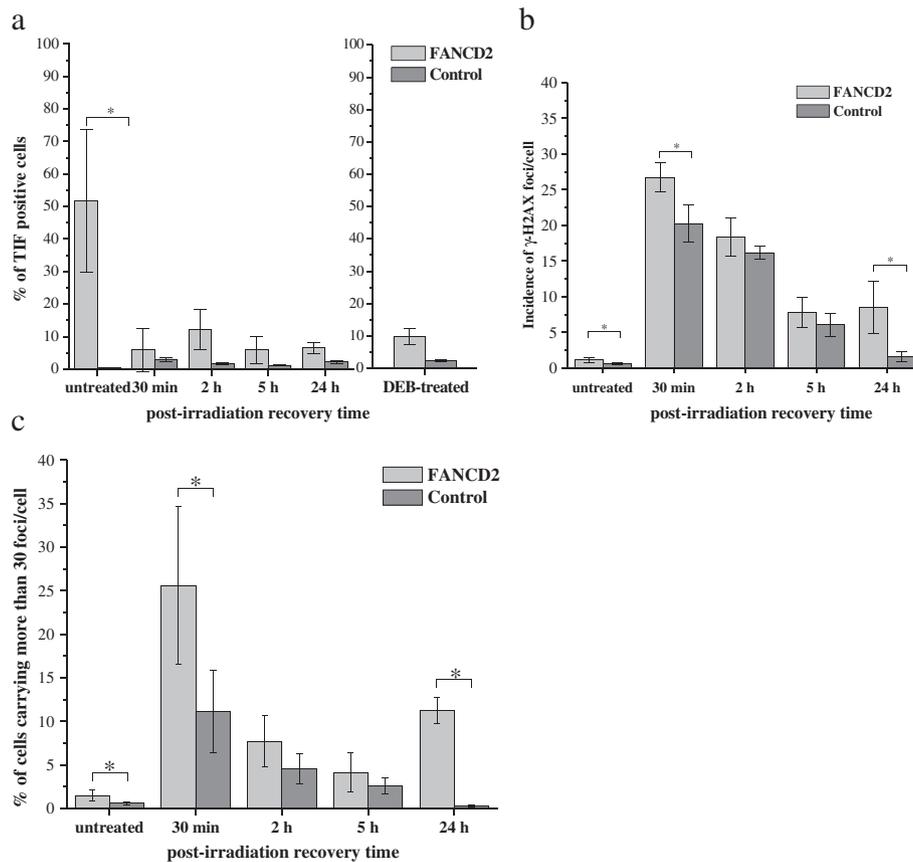


Figure 5 Results of analyses in FANCD2 and control fibroblasts. **a** Average incidence of radiation-induced γ -H2AX foci per cell (mean \pm SD) in FANCD2 (n=4) and control fibroblasts (n=6). The total number of γ -H2AX foci in FANCD2 fibroblasts was significantly higher at all recovery times, relative to control samples. **b** Percentage of FANCD2 cells displaying more than 30 γ -H2AX foci per cell within recovery time of 30 min, revealed a 2-fold increase compared to that in control fibroblasts ($p < 0.05$). **c** TIF analysis. In FANCD2 fibroblasts, in average 51.7% of nuclei were TIF-positive (displaying more than 5 TIFs per nucleus). The level of TIFs inversely correlates with telomere length ($P = 0.03$). Percentage of TIF positive cells significantly decreased after irradiation. At recovery time of 30 min considerable percentage of TIF positive cells disappeared at the same time when the incidence of γ -H2AX foci was maximal. Afterwards, TIFs appeared again, but in less extent and remained almost the same at all later recovery times. 24 h after DEB treatment, the percentage of TIF-positive FANCD2 cells also was reduced ($p = 0.026$) when compared to a self-state before treatment.

positive cells slightly increased and remained almost the same over the next 2, 5 and 24 h. Percentages of dying FANCD2 fibroblasts were almost the same prior and 2 h after irradiation (Figure 5d) indicating that cell loss is not the reason for TIFs disappearance. The observations that FANCD2 cells exhibit a mild 2-h delay in entry into apoptosis after irradiation and a 2-fold higher rate of spontaneous apoptosis relative to control signify difficulties in activation of physiological mechanisms of cell death that happened exactly at the time when treated cells did not display TIFs.

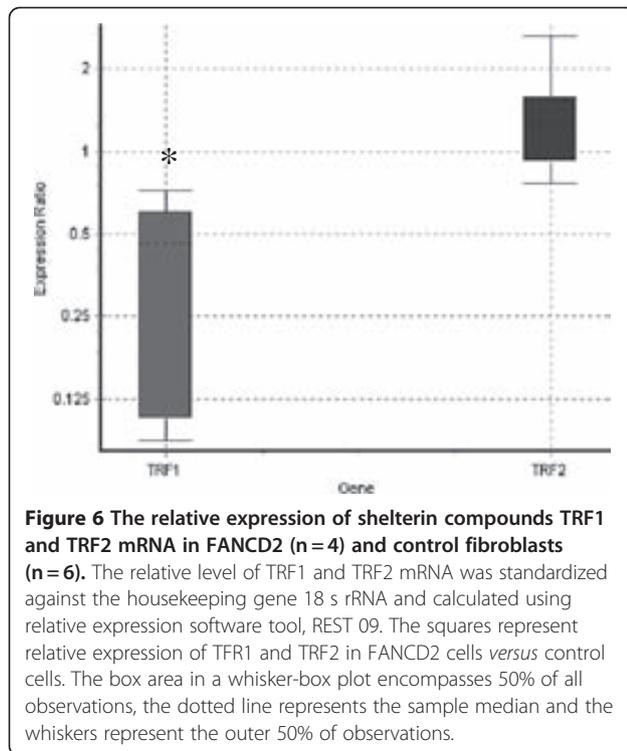
Relative expression of TRF1 and TRF2 mRNAs

Relative to control cells, the relative expression of TRF1 mRNA in FANCD2 fibroblasts was significantly down-regulated by a mean factor of 0.31 (S.E. range 0.093 – 0.610, 95%CI 0.088-0.697, $P = 0.000$) (Figure 6). TRF2

gene expression was similar in both FANCD2 and control cells (mean factor 1.178, S.E. range 0.814 - 1.71, 95% CI 0.771 - 1.801, $P = 0.7$). The TRF1:TRF2 ratio was close to 1 ($P = 0.7$) in control cells. We did not detect significant differences in TRF1 or TRF2 gene expression between FANCD2 and control cells following irradiation or treatment with DEB.

Discussion

This study provides evidence that primary cells originating from FA-D2 patients display shorter telomeres than their age-matched control counterparts, high frequency of dysfunctional telomeres, and broad spectrum of aberrant telomeric structures ranging from fragile to long-string extended telomeres. Furthermore, telomeres in FANCD2 primary cells display extra heterogeneous telomere lengths of individual chromosomes and elevated



incidence of T-SCEs. The recent work of Ball et al. [13], Callen et al. [14] and Leteurtre et al. [20] have demonstrated the presence of shorter telomeres in FA patients (mostly belonging to the complementation group FA-A) than their age-matched controls, which is consistent with our findings in FA-D2 patients. Herman et al. [21] proposed that average telomere length is not the only determinant of telomere function, emphasizing that critically short individual telomeres can trigger cellular responses to a loss of telomere function. The heterogeneity of telomere length that was present in our FA-D2 patients was expressed as SD of telomere length; our correlative analysis supports their hypothesis that critically short telomeres trigger a DDR response that reduces telomere capping function. Metaphase events presented in Figure 2(b-d), illustrate a hybridization pattern with aberrant telomeric structures ranging from fragmented telomeric signals to an extended strand of telomeric DNA; these patterns are indicative of telomere dysfunction. The findings of this study support those reported in several prior studies [22-26] with embryonic stem cells lacking TRF1. In this study, all FA-D2 patients exhibited decreased TRF1 expression, which correlates to telomere defects. Because TRF1 has been described as a negative regulator of telomere length [27], reduced TRF1 expression is thought to induce telomere elongation; however, this did not occur. In contrast to tumor cells [28,29], down-regulation of TRF1 in FANCD2 cells is probably linked to the functional role of TRF1 in

regulating cell cycle progression. In response to DNA damage, ATM beside histone H2AX, phosphorylates TRF1 to inhibit its mitotic function and prevent abortive mitosis. Given that FANCD2 cells exhibit a 2-fold increase in the number of cells displaying more than 30 γ H2AX-foci per cell after irradiation, down-regulation of TRF1 may be a consequence of its degradation due to the failure of cells to progress into the cell cycle normally, as is the case with control cells. Down-regulation of TRF1 may also provide cells to increase their proliferative potential.

By employing the CO-FISH technique, our study demonstrates a two-fold enhancement of T-SCEs in FANCD2 cells, relative to control cells. This may result from an attempt to replenish lost telomeric sequences by homologous recombination between sister telomeres. While there is currently no direct evidence that T-SCEs modify telomere length, the recombinogenic behavior of telomeres in FANCD2-deficient cells could contribute to heterogeneity in telomere length, which in turn activates DDR. Recent work by Lyakhovich et al. [30] with immortalized FANCD2 fibroblasts has shown that extrachromosomal circular telomeric structures in FANCD2-deficient cells are not linked to telomeric recombination between sister chromatids. In our study, FISH analysis of primary FANCD2 cells did not reveal extrachromosomal telomeric signals; in contrast, fragile telomeres and split or extended telomeric signals were frequently observed. Recent work of Polanska et al. [31], have shown that chromatin associated protein (HMGB1) also maintain telomere integrity. The most interesting finding in their study is that HMGB1^{-/-} cells exhibit heterogeneous telomere lengths of individual chromosomes and highly extended telomeres, as we found in lymphocytes of our FANCD2 patients.

Considering the role of TRF2 in telomere maintenance, many studies with mouse models have revealed that T-SCE are repressed by TRF2 [32]. Expression of TRF2 in either FA cells or control cells was nearly identical, indicating that an increase of T-SCE could be attributed to some other proteins; examples of which include those that regulate histone heterochromatin density in telomeric and sub-telomeric regions and influence chromatin remodeling, as suggested by Schoeftner and Blasco [33], and Polanska et al. [31].

The novel finding of our study is that a remarkably high percentage of FANCD2 cells had dysfunctional telomeres that were mostly caused by telomere shortening collectively with extensive telomere length heterogeneity of individual chromosomes (i.e., 1866 cells displayed 74% of TIF positive cells). Although elevated incidence of γ H2AX foci in FANCD2 cells vs. control was observed at all recovery times after irradiation, a significant decrease of TIFs was determined at the same post-irradiation times. Particularly unexpected was a considerable disappearance of TIF

positive cells 30 min after irradiation, when the incidence of γ H2AX foci was maximal (Figure 5a). Afterwards, TIFs appeared again, but in less extent and remained almost the same at all later recovery times. When we look at the apoptosis profile of FANCD2, it is evident that percentage of dying cells was almost the same up to 2 h after irradiation (compared to a baseline state), indicating that cell loss is not the reason for TIFs disappearance. The work of Kaul et al. [34] have shown that normal human cells can tolerate small number of TIFs, so called "intermediate-state" telomeres. We hypothesize that repair-deficient FANCD2 cells could possibly tolerate bigger number of intermediate-state telomeres. However, upon irradiation FANCD2 cells display fast and marked reduction of TIFs, which is likely due to a recruitment of γ H2AX away from telomeres to newly formed DSBs. Irradiated FANCD2 fibroblasts exhibit mild delay of 2 h in ingoing apoptosis relative to control, signifying difficulties in activation of physiological mechanisms of cell death. Accelerated telomere shortening in radiosensitive cell lines has been reported in several prior publications [35,36]. Collectively, the data presented by our study suggests that uncapping of telomeres results from an increase in telomere recombination, in addition to accelerated telomere shortening; this is consistent with general enhancements in the activity of HR. For example, 1823 cells possess telomeres of nearly normal length and display no increase in HR activity; therefore, we conclude that only cells with sufficiently long telomeres bypass HR to replenish telomeric repeats. In FANCA cells, telomere dysfunction-induced foci were found in less than 10% of cells. FANCA also exhibit shorter telomeres than controls, but in contrast to FANCD2 exhibit fast progression, no delay in cell cycle and display very few TIFs in base-line state, and in response to irradiation behave in a similar manner as controls (unpublished data).

In response to cross-linking agents, FANCD2 lymphocytes exhibited a 2-fold increase in the frequency of SCE when compared to control cells. In control lymphocytes, progression of SCE in response to DEB was suppressed. To the best of our knowledge, this is the first report that describes a role of the cross-linking agent DEB in suppressing the occurrence of SCE in normal cells and significantly enhancing it in FA cells. Particularly frequent double SCE were observed, as illustrated in Figure 3f. Increased SCE incidence upon DEB treatment suggests that replication fork collapse may occur because of the inability of cells to repair replication-blocking lesions and initiation of homologous recombination. According to findings in our study incidence of SCE induced by DEB can be used as an adjunct diagnostic test for FA cellular phenotype. High-rates of homologous recombination in human FA cells first were observed by Thyagarajan and Campbell [37], who discovered that recombination levels in Fanconi anemia cells were nearly 100-fold higher than in

control cells. The authors proposed that inappropriate increase in the amount of homologous recombination might contribute to genomic instability and cancer susceptibility that characterized FA. Rouet et al. [38] found that HR processes operate on DSBs, which can further rationalize our finding that enhanced HR activity was present in treated FA-D2 cells [38]. Work of Yamamoto et al. [39] have shown that sensitivity of FANCD2 cells to cross-linking agents and ionizing radiation is mainly due to premature termination of repair during DNA synthesis. Nakanishi and colleagues [40] provide evidence that cells derived from FANCA, FANCG and FANCD2 patients are defective, to a mild degree in HR. Smogorzewska et al. [41] verify that siRNA mediated depletion of FANCI and FANCD2 resulted in reduced HR activities. Indeed, the results of our study revealed reduced rate of SCE in FANCD2 cells and higher rate of spontaneously dying cells *versus* control, which is in accordance to previously mentioned findings.

The mechanism by which telomere dysfunction is initiated remains unresolved. Broccoli et al. [42] postulated that dysfunctional telomeres may fall below a threshold of telomere-associated proteins, such as TRF1 and TRF2, thereby impairing the formation of the telomere loop structure; however, subsequent studies, including our study, determined that this effect is not connected to these important shelterin components. Morish and Greider [43] reported that mammalian cells utilize several different non-telomerase mechanisms for telomere maintenance, which include recombination initiated by short telomeres; the results of our study support this hypothesis. The work of Fan and colleagues [44] have shown that depletion of FANCD2 is associated with decrease in recombination between telomeres. In our study the opposite results were obtained, which can be explained in part by the fact that truncated FANCD2 protein in primary FA-D2 cells is still competent to function in HR. Telomere findings in our study confirm that FANCD2 cells maintain telomeres through homologous recombination displaying a more heterogeneous length and increased chromosomal instability including TIFs. Interestingly no fusions were observed in either lymphocytes or fibroblasts indicating that telomeres are not critically shorten to be fused. This observation is in line with work of Cesare and colleagues who postulated that not all uncapped telomeres are equal, pointing out that some cells as cancerous cells possess TIF positive telomeres that are not involved in fusions [45]. The similar distinctiveness of telomeres in primary cells originated from FA-D2 patients are observed in our study.

Taken together, our study revealed that high percentage of TIFs that characterized FANCD2 primary cells is most likely induced by critically shortened telomeres. In addition, fragile and long-string extended telomeres along with disappearance of TIFs in early response to irradiation are distinctive features of FANCD2 primary

cells. Genomic instability resulting from telomere dysfunction is a plausible explanation for the increased cancer susceptibility and clinical hypersensitivity of all FA patients, not only of the FA-A complementation group.

Methods

Patients

The patients included in this study were four female children with Fanconi anemia belonging to complementation group FA-D2. The patients were 8 ± 5 years of age. Cellular FA phenotype was diagnosed with classic chromosomal breakage DEB tests of peripheral blood lymphocytes, as described by Auerbach et al. [46]. Patients who displayed DEB-positive lymphocyte phenotypes underwent skin biopsies to assess FA fibroblast phenotype and to determine genetic subtype. Healthy age-matched volunteers served as control groups (12 subjects as controls for SCE analysis, and 4 subjects as controls for telomere length analysis). All methods were approved by the Ethical Committee of the Mother and Child Health Care Institute of Serbia, and the subjects' parents signed informed consent forms.

Cell culture

Lymphocytes

Peripheral blood was collected from all subjects and deposited into heparinized vacutainer tubes. Lymphocytes were cultured in PBmax karyotyping medium (Invitrogen-Gibco, Paisley, UK). Adequate numbers of cell cultures per subject were established, enabling SCE analysis, T-SCE analysis and telomere length analysis *via* quantitative FISH (Q-FISH) in metaphase cells.

Fibroblasts

Cells were grown in DMEM (Invitrogen-Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen-Gibco, Paisley, UK) under standard tissue culture conditions: 37°C in 10% CO₂. Cells were harvested in duplicate and propagated to 80-90% confluence, at which point cells were subcultured. A 1.0 mL cell suspension was prepared at a density of 50,000 cells for each sample, and the cells were seeded onto polylysine-coated glass slides (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) and incubated overnight in atmosphere-controlled chamber containing 10% CO₂. As a control, primary cells from skin biopsies of six healthy subjects undergoing plastic surgery were also used.

Irradiation

Irradiation was performed with a ⁶⁰Co γ-ray source (a 2.0 Gy dose at 0.45 Gy/min). Fibroblasts were irradiated on polyprep slides and then returned to the tissue culture incubator and examined at various recovery times (30 min, 2 h, 5 h and 24 h).

Diepoxybutane treatment

Cells were treated with DEB at final concentration of 0.1 μg/mL or 0.01 μg/mL for lymphocytes and fibroblasts, respectively. Fibroblasts were exposed to DEB for 24 h, whereas lymphocytes were exposed for 72 h.

Western blot analysis for the subtyping of FA patients

Exposure of the patients and controls cell lines to 50nM mitomycin C (MMC) for 24 h and subsequently analysis by FANCD2 western blot was performed as previously described by Casado et al. [47] and Castella et al. [48]. Anti-FANCA antibodies (gift of the Fanconi Anemia Research Fund, dilution 1:500) and anti-FANCD2 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) (dilution 1:2500) were used. Assignment of group FA-D2 was done on the basis of the absence FANCD2 on Western blots using Western Breeze Immunodetection Kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). The over-exposure of films by the chemiluminescence technique to identify residual FANCD2 protein levels was performed as described by Kalb et al. [19].

Quantitative fluorescence *in situ* hybridization

For Q-FISH, cells were harvested under standard conditions. During the final 3 h of incubation, 0.1 μg/mL of colchicine (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) was added to cell cultures. Subsequently, a hypotonic solution (5.6 g/l of KCl) was added, followed by three consecutive fixations with 3:1 methanol/acetic acid; thereafter, slides were prepared. Q-FISH was performed as described by Slijepcevic [49]. Briefly, after appropriate wash steps, the slides were hybridized with the Cy-3 labeled telomeric PNA probe (CCCTAA) 3' and left in a dark humidified chamber for 2 h. The slides were then washed in 70% formamide and stained with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing mounting medium (Vector Laboratories, UK). Chromosomal analysis was performed with a Zeiss-Axioplan2 microscope equipped with a CCD camera, Axiocam image acquisition software (Imaging Associate) and software package from MetaSystem. Measurements were reported as arbitrary relative telomere length units (RTLUs), which are defined as the ratio of signal intensity between telomeres and a centromere chromosome 2 reference signal.

Sister chromatid exchange analysis

Cells intended for SCE analysis were cultured in duplicate and allowed to undergo two rounds of replication in the presence of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) to achieve differentiation of sister chromatids. BrdU was added one hour after culture initiation and cells were harvested at 72 h, the final three hours of which were conducted in the presence of colchicine (final concentration 0.1 μg/mL). One of

these cultures was used to analyze spontaneously occurring SCE, while a second was treated with DEB one hour after culture initiation, and continued for as long as 72 h. After conventional hypotonic treatment, cells were fixed three times in 3:1 methanol: acetic acid. Afterward, the pellet was spread onto glass microscope slides. Differential staining of sister chromatids was performed *via* standard fluorescence-plus-Giemsa (FPG) technique [50]. A total of 30 complete second-division metaphase cells were analyzed per sample with a Zeiss-Axioplan2 microscope.

Chromosome orientation fluorescence *in situ* hybridization

Parallel cultures were used to conduct telomere T-SCE analysis. The chromosome orientation fluorescence *in situ* hybridization (CO-FISH) protocol of Bailey et al. [51] was performed with some modification for lymphocytes: 48 h after the start of culture, 30 μ M BrdU and 10 μ M bromodeoxycytidine (BrdC) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) were added and cells were allowed to progress through S phase and into the first mitosis the following day. Colchicine was added to a final concentration of 0.1 μ g/mL during the last 3 h of culture. Preparation of cultures was performed according to the standard protocol (hypotonic treatment and three consecutive fixations in 3:1 methanol: acetic acid). Cell pellets were spread onto glass microscope slides using cytogenetic techniques. Newly synthesized DNA strands were degraded by treating fixed cells on glass microscope slides with 0.5 μ g/mL Hoechst 33258 for 15 min (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), 313 nm light for 30 min and 3 U/ μ L Exo III (Promega, Madison, WI) at room temperature for 10 min. Slides were washed in PBS and subsequently dehydrated in a series of ethanol washes. Tel Cy3-dUTP (20 μ L), a telomere PNA probe (Panagene, Korea) was placed onto each slide, covered with glass coverslips and hybridized on a hot plate for 5 min at 80°C. After hybridization, slides were maintained in the dark in a wet compartment for 2 h. Afterwards, the slides were washed three times in 70% formamide/2xSSC for 15 min, and then washed three times in PBS for 5 min. Samples were then dehydrated in ice-cold ethanol, mounted in DAPI (Vectashield), covered with coverslips and sealed. At least 20 metaphase events from each patient were quantified by CO-FISH. Each metaphase event was analyzed with Axiocam image acquisition software (Imaging Associate) and a software package from MetaSystem. The data were subsequently analyzed by quantifying descriptive statistics (mean values, SD and SE).

TIF assay

For the TIF assay, cells were co-stained with γ H2AX and telomere *in situ* hybridization using a telomere-specific peptide nucleic acid probe. Polylysine-coated slides on which cells were grown were rinsed in PBS and fixed in

4% formaldehyde for 15 min. Cells were permeabilized in 0.2% (v/v) Triton-X in distilled water at 4.0°C for 10 min and blocked with 0.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min. Anti-phospho-histone H2AX (Ser139) (Millipore, USA) was diluted 1:500 with 0.5% BSA; 100 μ L of the resulting solution was added to each slide and incubated for 1 h in a humidified container. After three washes in sterile tris-buffered saline containing tween-20 (TBS-T, pH7.4; 0.15 M NaCl, 0.268 mM KCl, 0.025 M tris-base, 500 μ L/1 l tween-20) for 3 min, slides were incubated with 100 μ L of anti-goat secondary antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) and washed as described above. The slides were then placed in 4% formaldehyde for 20 min to facilitate cross-fixing and antibody preservation. The following step involved hybridization to a telomeric PNA probe, which was performed as described above with the exception that TBS-T was used for washing instead of PBS. A large number of cells (100) were analyzed for each sample. TIFs were measured before irradiation (baseline state) and at different times after exposure to ionizing radiation (30 min, 2 h, 5 h and 24 h) and 24 h after DEB treatment.

Apoptosis assay

Blood cells: For apoptosis assay, aliquots of 0.5 ml peripheral blood from each subject were cultured in duplicate. One of these cultures was used for analysis of spontaneous apoptosis, while the second culture was set up by using the irradiated whole blood. Blood cells were incubated in medium RPMI-1640 supplemented with 15% of calf serum without phytohemagglutinin (PHA) in CO₂ incubator for 24 h. After incubation, cells were gently washed with physiological saline (0.9% NaCl) at 37°C, fixed in methanol: acetic acid (3:1) and subsequently fixed in 96% ethanol.

Fibroblasts: At each time point after irradiation and/or DEB treatment cells were detached from the flasks surface with 0.025 M trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen Ltd., Paisley, UK), washed with pre-warmed PBS (Biotlas, Tartu, Estonia) at 37°C and fixed in 96% ethanol. Apoptosis was assessed by flow cytometric (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) identification of cells displaying apoptosis associated DNA condensation. DNA content was assessed by measuring the UV fluorescence of propidium iodide-stained DNA. Apoptotic population analysis was performed using CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Isolation of RNA and quantitative real-time reverse transcriptase-PCR

Total RNA was isolated from each cell culture flask (both untreated fibroblasts and those treated with DEB or radiation) using the TRI reagent (Ambion, Inc.) in accordance with the manufacturer's instructions. The quantity purified mRNA was assessed with a NanoDrop® ND-1000

spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware). Structural RNA integrity was confirmed by formaldehyde gel electrophoresis. One microgram of RNA was treated with DNase I (Fermentas, Lithuania) and reverse transcription was performed using a first strand cDNA synthesis kit with oligo-dT18 primers (Fermentas, Lithuania) according to the manufacturer's instructions. Mock reactions lacking reverse transcriptase (RT) were performed during the cDNA synthesis step to exclude genomic contamination. Real-time PCR was performed in duplicate in an ABI Real-time 7500 system (ABI, Foster City, CA). Detection of TRF-1 and TRF-2 gene expression was accomplished with 0.2 $\mu\text{mol/L}$ of each primer and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ of probe in TaqMan[®] gene expression master mix in a total volume of 25 μL . The sequences of the primers and probes are as follows: TRF1, forward primer 5'-CCACATGATGGAGAAAATTAAGAGTTAT-3', reverse primer 5'-TGCCGCTGCCTTCA TTAGA-3'; probe 5'-FAM-TTATGTGCTAAGTGAAAAATCATCAACCT-TAMRA-3' [52]. The results from the RT-PCR assays were validated by amplifying the serial dilutions of a sample by 10-fold, and the slopes of amplification curves were calculated. Detection of internal reference 18 s rRNA was performed with pre-developed TaqMan[®] Gene Expression Assays ID Hs99999901_s1 (ABI, Foster City, CA), although the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Hs99999905_m1) and cyclophilin A (CYCA, Hs99999904_m1) were run on all the samples as two additional endogenous controls. Differences in mRNA expression, according to genotypes of the investigated polymorphisms, were tested with REST 09 software (Corbett Life Science, <http://rest.gene-quantification.info>) [53].

Statistics

The data were analyzed using statistical software package 7.0. Statistical analyses were performed *via* Student's *t* test. Correlations between investigated parameters were tested with linear regression analysis. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. Differences in mRNA expression between groups were tested by pairwise randomization and boot strapping with the relative expression software tool, REST 09 (Corbett Life Science) [53].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

GJ and PS designed the study. IJ, AL, SP, MO, JP, MZ and AS carried out experiments. DV and MG-S provided clinical material and helped with the analysis. JS, PS and GJ supervised experimental work in their laboratories. GJ and PS wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgement

This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Project No.173046).

Author details

¹Vinca Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia. ²Hospital of Gynecology and obstetrics "Narodni front", Belgrade, Serbia. ³School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia. ⁴Mother and Child Health Care Institute of Serbia "Dr Vukan Cupic", Belgrade, Serbia. ⁵Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia. ⁶Brunel University, West London, United Kingdom. ⁷Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, and Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Bellaterra, Barcelona, Spain.

Received: 23 July 2012 Accepted: 9 September 2012

Published: 14 September 2012

References

- Greider CW, Blackburn EH: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 1985, **43**:405–413.
- de Lange T: Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005, **19**:2100–2110.
- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T: Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000, **20**:1659–1668.
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T: TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998, **92**:401–413.
- Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, de Lange T: Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 2009, **138**:90–103.
- Celli GB, de Lange T: DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* 2005, **7**:712–718.
- Celli GB, Denchi EL, de Lange T: Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol* 2006, **8**:885–890.
- Palm W, Hockemeyer D, Kibe T, de Lange T: Functional dissection of human and mouse POT1 proteins. *Mol Cell Biol* 2009, **29**:471–482.
- Bakkenist CJ, Kastan MB: Initiating cellular stress responses. *Cell* 2004, **118**:9–17.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP: A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003, **426**:194–198.
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T: DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003, **13**:1549–1556.
- Blasco MA: Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005, **6**:611–622.
- Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC: Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* 1998, **91**:3582–3592.
- Callen E, Samper E, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olive T, Badell I, Blasco MA, Surrallés J: Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in fanconi anemia. *Hum Mol Genet* 2002, **11**:439–444.
- Taniguchi T, D'Andrea AD: Molecular pathogenesis of fanconi anemia: recent progress. *Blood* 2006, **107**:4223–4233.
- Dokal I, Vulliamy T: Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 2010, **95**:1236–1240.
- Li X, Leteurtre F, Rocha V, Guardiola P, Berger R, Daniel MT, Noguera MH, Maarek O, Roux GL, de la Salmoniere P, et al: Abnormal telomere metabolism in fanconi's anaemia correlates with genomic instability and the probability of developing severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2003, **120**:836–845.
- Leskovic A, Vujic D, Guc-Scekic M, Petrovic S, Joksic I, Slijepcevic P, Joksic G: Fanconi anemia is characterized by delayed repair kinetics of DNA double-strand breaks. *Tohoku J Exp Med* 2010, **221**:69–76.
- Kalb R, Neveling K, Hoehn H, Schneider H, Linka Y, Batish SD, Hunt C, Berwick M, Callen E, Surrallés J, et al: Hypomorphic mutations in the gene encoding a key fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 2007, **80**:895–910.
- Leteurtre F, Li X, Guardiola P, Le Roux G, Sergere JC, Richard P, Carosella ED, Gluckman E: Accelerated telomere shortening and telomerase activation in fanconi's anaemia. *Br J Haematol* 1999, **105**:883–893.
- Hemann MT, Strong MA, Hao L-Y, Greider CW: The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 2001, **107**:67–77.

22. Blanco R, Munoz P, Flores JM, Klatt P, Blasco MA: **Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis.** *Genes Dev* 2007, **21**:206–220.
23. Okamoto K, Iwano T, Tachibana M, Shinkai Y: **Distinct roles of TRF1 in the regulation of telomere structure and lengthening.** *J Biol Chem* 2008, **283**:23981–23988.
24. Philippe C, Coullin P, Bernheim A: **Double telomeric signals on single chromatids revealed by fish and prims.** *Ann Genet* 1999, **42**:202–209.
25. Undarmaa B, Kodama S, Suzuki K, Niwa O, Watanabe M: **X-ray-induced telomeric instability in Atm-deficient mouse cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **315**:51–58.
26. van Overbeek M, de Lange T: **Apollo, an artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase.** *Curr Biol* 2006, **16**:1295–1302.
27. van Steensel B, de Lange T: **Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1.** *Nature* 1997, **385**:740–743.
28. Aragona M, Maisano R, Panetta S, Giudice A, Morelli M, La Torre I, La Torre F: **Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis.** *Int J Oncol* 2000, **17**:981–989.
29. Kishi S, Wulf G, Nakamura M, Lu KP: **Telomeric protein Pin2/TRF1 induces mitotic entry and apoptosis in cells with short telomeres and is down-regulated in human breast tumors.** *Oncogene* 2001, **20**:1497–1508.
30. Lyakhovich A, Ramirez MJ, Castellanos A, Castella M, Simons AM, Parvin JD, Surrallés J: **Fanconi anemia protein FANCD2 inhibits TRF1 polyADP-ribosylation through tankyrase1-dependent manner.** *Genome Integr* 2011, **2**:4.
31. Polanska E, Dobsakova Z, Dvorackova M, Fajkus J, Stros M: **HMGB1 gene knockout in mouse embryonic fibroblasts results in reduced telomerase activity and telomere dysfunction.** *Chromosoma* 2012, **121**:419–431.
32. Riethman H: **Human telomere structure and biology.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, **9**:1–19.
33. Schoeftner S, Blasco MA: **Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:228–236.
34. Kaul Z, Cesare AJ, Huschtscha LI, Neumann AA, Reddel RR: **Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells.** *EMBO Rep* 2012, **13**:52–59.
35. Cabuy E, Newton C, Joksic G, Woodbine L, Koller B, Jeggo PA, Slijepcevic P: **Accelerated telomere shortening and telomere abnormalities in radiosensitive cell lines.** *Radiat Res* 2005, **164**:53–62.
36. Slijepcevic P: **Is there a link between telomere maintenance and radio sensitivity?** *Radiat Res* 2004, **161**:82–86.
37. Thyagarajan B, Campbell C: **Elevated homologous recombination activity in fanconi anemia fibroblasts.** *J Biol Chem* 1997, **272**:23328–23333.
38. Rouet P, Smith F, Jasin M: **Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:6064–6068.
39. Yamamoto K, Hirano S, Ishiai M, Morishima K, Kitao H, Namikoshi K, Kimura M, Matsushita N, Arakawa H, Buerstedde JM, et al: **Fanconi anemia protein FANCD2 promotes immunoglobulin gene conversion and DNA repair through a mechanism related to homologous recombination.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:34–43.
40. Nakanishi K, Yang YG, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, Wang ZQ, Jasin M: **Human fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:1110–1115.
41. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Ballif BA, Gygi SP, Hofmann K, D'Andrea AD, Elledge SJ: **Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair.** *Cell* 2007, **129**:289–301.
42. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T: **Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2.** *Nat Genet* 1997, **17**:231–235.
43. Morrish TA, Greider CW: **Short telomeres initiate telomere recombination in primary and tumor cells.** *PLoS Genet* 2009, **5**:e1000357.
44. Fan Q, Zhang F, Barrett B, Ren K, Andreassen PR: **A role for monoubiquitinated FANCD2 at telomeres in ALT cells.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:1740–1754.
45. Cesare AJ, Kaul Z, Cohen SB, Napier CE, Pickett HA, Neumann AA, Reddel RR: **Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions.** *Nat Struct Mol Biol* 2009, **16**:1244–1251.
46. Auerbach AD: **Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis.** In *Current Protocols in Human Genetics*. Edited by Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR. Hoboken, NJ: ohn Wiley & Sons, Inc; 2003:8.7.1–8.7.15.
47. Casado AJ, Callen E, Jacome A, Rio P, Castella M, Lobitz S, Ferro T, Munoz A, Sevilla J, Cantalejo A, et al: **A comprehensive strategy for the subtyping of patients with fanconi anaemia: conclusions from the spanish fanconi anemia research network.** *J Med Genet* 2007, **44**:241–249.
48. Castella M, Pujol R, Callen E, Trujillo JP, Casado JA, Gille H, Lach FP, Auerbach AD, Schindler D, Benitez J, et al: **Origin, functional role, and clinical impact of fanconi anemia FANCA mutations.** *Blood* 2011, **117**:3759–3769.
49. Slijepcevic P: **Telomere length measurement by Q-FISH.** *Methods Cell Sci* 2001, **23**:17–22.
50. Perry P, Wolff S: **New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids.** *Nature* 1974, **251**:156–158.
51. Bailey SM, Goodwin JH, Meyne J, Cornforth MN: **CO-FISH reveals inversions associated with isochromosome formation.** *Mutagenesis* 1996, **11**:139–144.
52. Lin X, Gu J, Lu C, Spitz MR, Wu X: **Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:5720–5725.
53. Pfäffl MW, Horgan GW, Dempfle L: **Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:e36.

doi:10.1186/2041-9414-3-6

Cite this article as: Joksic et al.: Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integrity* 2012 3:6.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

