

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Swuanny Valeska Villagran Herrarte

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Mayo de 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Presentado por**

Swuanny Valeska Villagran Herrarte

Para optar al título de:

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Mayo de 2014

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Dra. Claudia Carranza y al Dr. Sergio Melgar por su asesoría durante la realización de la tesis.

A la Licda. Margarita Paz y al Dr. Rubén Velásquez, mi agradecimiento especial por revisar esta tesis.

A la Dra. Marta Julia López, Dra. Evelyn Anzueto, Dr. Gabriel Silva, Dra. Lucia Silva y Dr. Rodolfo Gutiérrez por su apoyo en la parte clínica del estudio.

A la Licda. Stephanie Bianchi y Lic. Allan Urbizo por su apoyo en la estandarización de la prueba de fragilidad cromosómica.

Al Instituto para la Investigación y Educación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas –INVEGEM- por permitirme llevar a cabo la investigación en sus instalaciones y por el financiamiento brindado para la ejecución del estudio.

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Manuel C3bar Pinto, Ph. D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides Santiago de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo Jos3 Vargases Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

**INDICE**

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
A. ANEMIA DE FANCONI	5
B. CARACTERISTICAS CLÍNICAS	7
C. MECANISMO MOLECULAR DE LA ANEMIA DE FANCONI	11
D. DIAGNÓSTICO	15
E. TRATAMIENTO	20
F. SEGUIMIENTO	21
IV. JUSTIFICACIÓN	23
V. OBJETIVOS	24
A. General	24
B. Específicos	24
VI. HIPÓTESIS	25
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	26
A. Universo	26
1. Población	26
2. Muestra	26
B. Materiales	26
C. Métodos	27
1. Diseño estadístico	27
2. Metodología	28
VIII. RESULTADOS	31
IX. DISCUSIÓN	38
X. CONCLUSIONES	42
XI. RECOMENDACIONES	43
XII. REFERENCIAS	44
XIII. ANEXOS	48
Anexo 1: Consentimiento Informado	48

Anexo 2: Boleta de recolección de datos del paciente	53
Anexo 3: Estandarización de la prueba de fragilidad cromosómica mediante el test de Mitomicina C (MMC)	54
Anexo 4: Descripción detallada de los casos de Anemia de Fanconi confirmados por el test de MMC	59
Anexo 5: Recopilación de estudios realizados en pacientes con AF	74

## I. RESUMEN

La anemia de Fanconi (AF) es una rara enfermedad de carácter autosómico recesivo presente a nivel mundial. Los pacientes con AF presentan características clínicas diversas como anomalías esqueléticas, renales, cardíacas, cutáneas, fallo medular progresivo y alta susceptibilidad a desarrollar cáncer. El diagnóstico clínico de AF se dificulta debido a la heterogeneidad clínica y a la presencia de mosaicismo. La prueba de fragilidad cromosómica, mediante el test de Mitomicina C (MMC) o el test de Diepoxibutano (DEB), es el estándar de oro para el diagnóstico de AF y se realiza en países de primer mundo desde los años ochenta. En Guatemala se tiene poco conocimiento sobre esta entidad y el diagnóstico de la AF no se confirma con la prueba de fragilidad cromosómica. En la presente investigación se realizó una descripción de los casos de AF encontrados en el país entre enero de 2012 y julio de 2013, los cuales fueron confirmados por la prueba de fragilidad cromosómica mediante el test de MMC.

En el presente estudio se incluyeron 13 pacientes diagnosticados clínicamente con AF, quienes fueron referidos por hematólogos pediatras de los principales centros hospitalarios del país. Después de realizar el test de MMC se confirmó la AF en 9 de los 13 pacientes incluidos, por lo que el estudio se centró en la descripción de los 9 casos confirmados. El nivel de fractura de la prueba de fragilidad cromosómica en los casos confirmados mostró un rango de 3.38 a 11.30 fracturas/célula (media=6.7; DS=2.6), un resultado positivo en el test de MMC corresponde a un nivel de fractura de  $\geq 1$  fractura/célula.

La edad promedio de los casos confirmados se encuentra en 9.1 años (DS = 2.47). Se encontraron 7 casos confirmados de AF del sexo masculino y 2 del femenino. Las anomalías de la piel y el fallo medular se presentaron en todos los casos confirmados, la microsomía en 7 casos (78%), las anomalías esqueléticas, las anomalías cardíacas y la microftalmia en 6 casos (67%), la microcefalia en 4 casos (44%), las anomalías renales en 2 casos (22%) y las

endocrinopatías en 1 caso (11%). Se observó la presencia de mosaicismo somático hematopoyético en 6 casos (67%) confirmados con AF. Por lo tanto, los casos confirmados de AF fueron 9 con predominio del sexo masculino. Las anomalías de la piel y el fallo medular fueron las alteraciones más frecuentes y no se confirmó la presencia de malignidades en los casos descritos.

La relevancia de este trabajo radica en que se presentan los primeros datos sobre la anemia de Fanconi en Guatemala y podrán servir como base para futuras investigaciones sobre la enfermedad en el país.



## I. INTRODUCCIÓN

La anemia de Fanconi (AF) es una rara enfermedad genética de carácter recesivo relacionada a mutaciones en diferentes genes. Los pacientes con anemia de Fanconi poseen dificultad para la reparación de enlaces cruzados entre las hebras de ADN, llevando a la inhibición de la replicación y transcripción celular y por consiguiente, a la apoptosis. Asimismo la ausencia de reparación completa de los enlaces cruzados puede provocar aberraciones cromosómicas que inducen a una alta susceptibilidad al desarrollo de cáncer.

Se estima que la prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es de 1 – 5 por millón, con una frecuencia de portador heterocigoto entre 0.3 – 1%, debido a la variación étnica (Joenje y Patel, 2001). La frecuencia en Europa y Estados Unidos es aproximadamente de 3 por millón y la frecuencia de heterocigotos de 1 en 300. En Guatemala se desconoce la prevalencia de la anemia de Fanconi, ya que no existen estudios que permitan conocer el número de afectados o de heterocigotos.

La presentación clínica de la anemia de Fanconi es heterogénea y las características clínicas se dividen en cuatro categorías: anomalías congénitas, endocrinopatías y fallo en el crecimiento, manifestaciones hematológicas y tumores sólidos. Las anomalías congénitas se observan en 60 - 75% de los casos de AF. La edad de diagnóstico de la AF se relaciona a la severidad de la enfermedad, cuanto mayor número de órganos y sistemas comprometidos, los problemas de salud son más severos y la edad de diagnóstico más temprana.

La baja frecuencia de anemia de Fanconi y la heterogeneidad de la presentación clínica, hacen difícil el diagnóstico de la enfermedad y al sumar que en Guatemala no existen pruebas confirmatorias disponibles, el diagnóstico se hace más complicado. La confirmación de la enfermedad es crucial para dar seguimiento clínico y terapéutico al paciente y consejería genética adecuada para el paciente y su familia. Actualmente, los hematólogos guatemaltecos son quienes realizan el

diagnóstico de la anemia de Fanconi con base en hallazgos clínicos sin poder confirmar la enfermedad con pruebas específicas.

La confirmación de anemia de Fanconi se realiza a través de la prueba de fragilidad cromosómica mediante el test de Mitomicina C (MMC) o test de Diepoxibutano (DEB). Los test de MMC y de DEB permiten diferenciar entre pacientes con Anemia de Fanconi y otros síndromes con similitudes clínicas tales como neurofibromatosis tipo I, síndrome TAR (trombocitopenia con ausencia de radio), síndrome VACTERL (acrónimo en inglés: V-verteral, A-anal, C-cardiac, T-thoracic, E-esophagus, R-renal, L-limbs), síndrome de Holt-Oram y anemia de Diamond-Blackfan. La presentación clínica de la anemia de Fanconi puede ser semejante a los otros síndromes, pero el abordaje terapéutico y seguimiento clínico es totalmente distinto y tiene fuertes repercusiones en la salud del paciente si no es realizado de forma adecuada.

La presente investigación describe nueve casos de anemia de Fanconi confirmados por el test de MMC. Se describen las anormalidades congénitas, los hallazgos clínicos y paraclínicos de casos de anemia de Fanconi encontrados en Guatemala durante enero de 2012 a junio de 2013, referidos por hematólogos de los principales centros hospitalarios de referencia del país.

El Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas – INVEGEM- ha estandarizado el test de MMC y allí fueron realizados los estudios confirmatorios de fragilidad cromosómica, lo cual permitió diagnosticar con certeza la enfermedad.

## II. ANTECEDENTES

### A. ANEMIA DE FANCONI

La Anemia de Fanconi (AF) es una rara enfermedad autosómica recesiva en la mayoría de los casos y en un pequeño porcentaje se encuentra ligado al cromosoma X. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1927 por el pediatra suizo Guido Fanconi (ver fotografía 1), en tres hermanos con anemia aplásica progresiva, corta estatura, hipogonadismo y manchas melanóticas, hipo e hiperpigmentación de la piel dando la apariencia de manchas de color café con leche (Tischkowitz y Hodgson, 2003).

En 1964, Gmyrek y Syllm-Rappoport revisaron las características fenotípicas y el curso clínico de 129 pacientes con AF, permitiendo identificar el espectro de malformaciones congénitas conocidos hoy en día. El curso de la enfermedad se debe, en gran medida, a la revisión hecha por Gmyrek y Syllm-Rappoport. En el mismo año, Schroeder y colaboradores, documentaron el incremento de inestabilidad cromosómica espontánea en linfocitos de dos hermanos afectados y menos de un año después, esto fue confirmado por Guido Fanconi y un grupo de investigadores de Zurich (Digweed y Hoelhn, 2007).



Fuente: Frohnmayer, L., y Frohnmayer, D. (2000). Fanconi Anemia: Una manual para las familias y sus médicos. Oregón, Estados Unidos: *Fanconi Anemia Research Fund, Inc.* 17p.

**Fotografía 1:** Dr. Guido Fanconi con Andrea Lee Kuritzky Children's Hospital, Los Angeles, 1959.

Aproximadamente 10 años después del descubrimiento de la inestabilidad cromosómica espontánea, Sasaki y Tonomura demostraron que dicha estabilidad se encuentra asociada con el aumento de aberraciones cromosómicas después del tratamiento con agentes inductores de enlaces cruzados interhebra en el ADN, conocidos como clastógenos. Además, demostraron que la determinación de la sensibilidad de las células a clastogénos, como Diepoxibutano (DEB), Mitomicina C (MMC), cisplatino y mostaza nitrogenada, funciona como estándar de oro para confirmar la AF, hoy en día esta prueba se conoce con el nombre de Fragilidad Cromosómica (Digweed y Hoelhn, 2007).

Años más tarde, Traute Schroeder y colaboradores publicaron en 1976 el artículo titulado "Formal genetics of Fanconi's anemia", comprobando la herencia recesiva de la enfermedad mediante una extensa colección de árboles genealógicos de pacientes con anemia de Fanconi (Digweed y Hoelhn, 2007).

Arleen Aurbach inició en 1982 Fanconi Anemia International Registry (IFAR) en The Rockefeller University, Estados Unidos. Este registro funciona con un repositorio centralizado para la información clínica y genética de los pacientes con AF, así como de muestras biológicas. Entre 1982 y 2008 se han registrado en IFAR 1,075 pacientes con AF del norte de América. Además, entre 1927 y 2001 se han publicado 1,300 casos de AF en la literatura, particularmente en la última década (Digweed y Hoelhn, 2007) (Auerbach, 2009).

Se estima que la prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es de 1 – 5 por millón, con una frecuencia de portador heterocigoto entre 0.3 – 1%, debido a la variación étnica (Joenje y Patel, 2001). La frecuencia en Europa y Estados Unidos es aproximadamente de 3 por millón y la frecuencia de heterocigotos de 1 en 300. Se ha observado que la frecuencia de heterocigotos en el grupo étnico de judíos Ashkenazi aumenta a 1 en 89, y en el caso de africanos en 1 en 83 (Tischkowitz y Hodgson, 2003). Afecta más a hombre que mujeres en una tasa de 1.24 (Taniguchi y D'Andrea, 2006). Lamentablemente, Guatemala no cuenta con datos estadísticos

de AF que permitan conocer la prevalencia y la frecuencia de portador heterocigoto en la población.

Los pacientes con AF presentan características clínicas diversas: anormalidades esqueléticas, renales, cardíacas, cutáneas, fallo medular progresivo y alta susceptibilidad a desarrollar cáncer (Shimamura et al., 2002). Alrededor del 60 – 75 % de los pacientes con AF presentan el fenotipo típico. La edad promedio de diagnóstico es 7 años de edad, principalmente por la pancitopenia que desarrollan (Tulpule et al., 2010). El riesgo de desarrollar malignidades como leucemia mieloide aguda (LMA) se incrementa 15,000 veces en comparación con una población saludable, así como desarrollar tumores sólidos, principalmente cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (Tulpule et al., 2010).

La expectativa de vida de los pacientes con AF se reduce a 20 años en promedio (rango 0-50 años), como consecuencia del fallo medular progresivo y la susceptibilidad a desarrollar malignidades, siendo las principales causas de muerte la anemia aplásica (AA) y la leucemia mieloide aguda (LMA) (Joenje y Patel, 2001; Tulpule et al., 2010).

## **B. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

La AF es una enfermedad con presentación clínica heterogénea y la clasificación de las características clínicas se dividen en cuatro categorías: anormalidades congénitas, endocrinopatías y fallo en el crecimiento, manifestaciones hematológicas y tumores sólidos; las cuales se describirán a continuación con más detalle (Sagaseta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003).

### **1. Anormalidades Congénitas**

Las anormalidades congénitas presentes en pacientes con AF son diversas y se observan en el 60 - 75% de los niños afectados. La edad de diagnóstico de la AF

se relaciona a la severidad de la enfermedad, cuanto mayor número de órganos y sistemas comprometidos, los problemas de salud son más severos y la edad de diagnóstico más temprana (Sagaseta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003).

Las anomalías esqueléticas se presentan con mayor frecuencia y se refieren principalmente a hipoplasia o ausencia de radio y pulgares, pulgares bífidos o supernumerarios. La dislocación de caderas, escoliosis, anomalías de la columna vertebral, anomalías costales, sindactilias o alteraciones en la implantación en los dedos de los pies son menos frecuentes (Tischkowitz y Hodgson, 2003).

En la fotografía 2 se muestra gemelas homocigotas de 15 años de edad con anomalías esqueléticas. La gemela A (izquierda) presenta pulgar bífido en la mano derecha (reparado quirúrgicamente), hipoplasia del pulgar izquierdo y ausencia de la clavícula izquierda. La gemela B (derecha) ausencia unilateral de radio, ausencia bilateral de pulgares y ausencia de clavícula derecha (Auerbach, 2009).

La piel se encuentra comprometida con la presencia de manchas café con leche o lunares de gran tamaño. Asimismo, puede existir una hiperpigmentación generalizada dando la apariencia de “piel bronceada” y áreas de hipopigmentación (Sagaseta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003; Tischkowitz y Hodgson, 2003). Otras anomalías congénitas y la frecuencia de las mismas se presentan en la tabla 1.



Fuente: Auerbach, A. D. (2009). Fanconi Anemia and its Diagnosis. *Mutat Res*, 668 (1-2), 668-683.

**Fotografía 2:** Anormalidades esqueléticas en gemelas homocigotas

**Tabla 1:** Frecuencia de las anomalías en pacientes con AF

<b>Anormalidades</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Esqueléticas	71
Pigmentación de la piel	64
Corta estatura	63
Microftalmia	38
Tracto Urinario y renal (agenesia, malformación o riñón en herradura)	34
Genital masculino (hipogonadismo, criptorquidia, hipospadias)	20
Gastrointestinal (atresia anorectal y duodenal)	14
Cardíacas (cavidades, válvulas y ductos)	13
Auditivas	11
Sistema Nervioso Central (hidrocefalus, retraso mental)	8
Genital femenino (útero bicorne, aplasia de útero o vagina, disminución de la fertilidad, retraso en la menarquía, ciclos menstruales irregulares)	3
Ausentes	30

Fuente: Tischkowitz, M. y Hodgson, S.V. (2003). Fanconi Anemia. *J Med Genet*, 40 (s.n.), 1-10.

## **2. Endocrinopatías y fallo en el crecimiento**

Las endocrinopatías se presentan con déficit de hormona de crecimiento, hipotiroidismo, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinismo y diabetes mellitus, en el 80% de los pacientes. La talla baja se relaciona con un hipotálamo hipoactivo, insuficiencia en hormona del crecimiento, resistencia a la acción de la hormona del crecimiento e hipotiroidismo; sin embargo el mecanismo responsable de la talla baja no se conoce con exactitud (Sagaseta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003).

## **3. Manifestaciones hematológicas**

Las manifestaciones hematológicas son las más frecuentes en pacientes cuyo fenotipo no evidencia la enfermedad, principalmente el fallo medular progresivo (anemia aplásica –AA-), síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mieloide aguda (LMA) (Sagaseta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003).

Los pacientes con AF presentan recuentos hematológicos normales al nacer, posteriormente a temprana edad cursan con trombocitopenia y neutropenia, que evoluciona a pancitopenia en la primera década de vida. Los cuadros clínicos que llevan al diagnóstico de la enfermedad en los pacientes son sangrados e infecciones recurrentes (Tischkowitz y Hodgson, 2003).

Una vez se inicia la alteración hematológica, los pacientes pueden alcanzar la pancitopenia en una mediana de 3 años. La pancitopenia se presenta típicamente entre los 5 a 10 años de edad y el riesgo de pancitopenia a los 20 años de edad es del 98%. Las principales causas de morbilidad y mortalidad son alteraciones de tipo hematológicas como AA, SMD y LMA (Sagaseta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003)(Tischkowitz y Hodgson, 2003).



#### **4. Tumores sólidos**

El riesgo de desarrollar malignidades, específicamente tumores sólidos, se aumenta a partir de los 20 años de edad. Los pacientes desarrollan tumores de células escamosas en cuello y cabeza, cáncer de mama, cérvix y vulva. También se han descrito tumores hepáticos generalmente en pacientes que reciben tratamiento con andrógenos (Sagasetta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003) (Tischkowitz y Hodgson, 2003).

#### **C. MECANISMO MOLECULAR DE LA ANEMIA DE FANCONI**

La AF es una enfermedad genética de la cual se han identificado 15 genes mutados, 14 son autosómicos y 1 se encuentra ligado al cromosoma X. La Base de Datos de Mutaciones de Anemia de Fanconi ("Fanconi Anemia Mutation Database") fue establecida en 1998 y cuenta con las mutaciones importantes relacionadas a la predisposición a cáncer. Los genes relacionados se ubican en diferentes cromosomas, en la tabla 2 se muestran los diferentes genes, localización cromosómica y frecuencia en los pacientes con AF (Alter y Kupfer, 2011).

Las proteínas del complejo Fanconi son un grupo de proteínas citoplasmáticas y nucleares, que forman parte importante en la reparación del daño causado al ADN por agentes inductores de enlaces cruzados interhebra (Clastógenos) (Bagby, 2006). Dentro de los agentes clastogénicos se encuentran el Diepoxibutano (DEB), Mitomicina C (MMC), rayos X, mostaza nitrogenada, 8-metoxipsoraleno con tratamiento de luz ultravioleta cercana, cis- diamminedicloroplatinum II (cis-ptII) (Niedernhofer, Lalai y Hoeijmarkers, 2005) (Deviren, Yalman y Hacıhanefioglu, 2003).

**Tabla 2:** Subtipos de Anemia de Fanconi

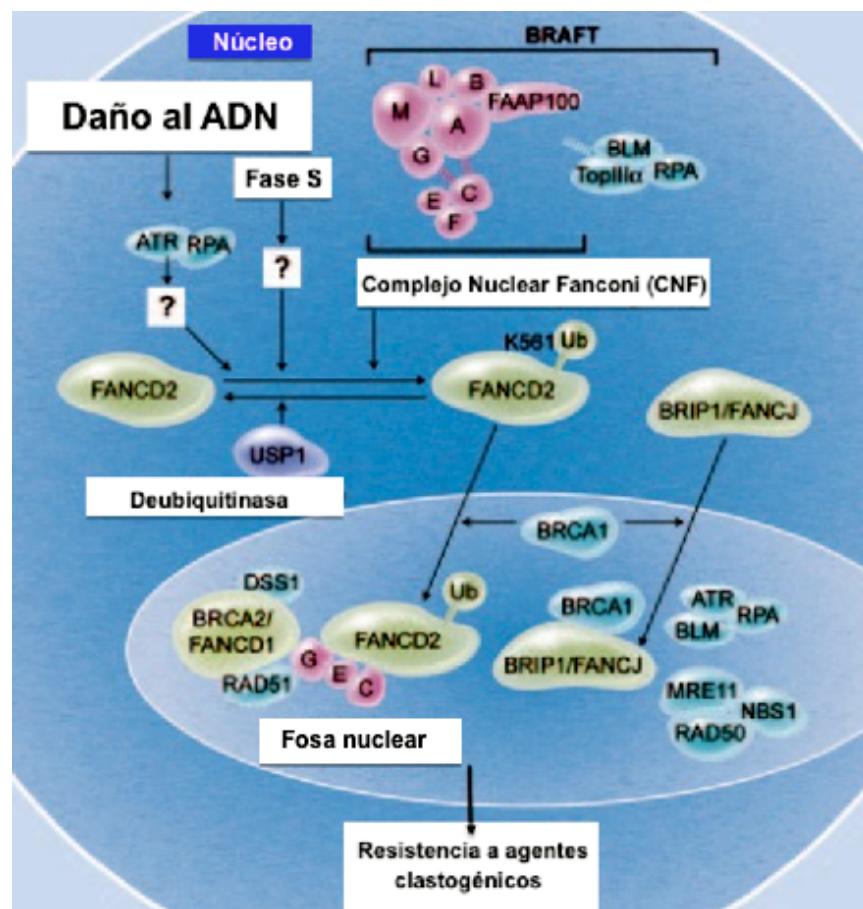
<b>Subtipo</b>	<b>Gen responsable</b>	<b>Localización</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>FA-A</b>	<i>FANCA</i>	16q24.3	60%-70%
<b>FA-B</b>	<i>FANCB/FAAP95</i>	Xp22.31	~2%
<b>FA-C</b>	<i>FANCC</i>	9q22.3	~14%
<b>FA-D1</b>	<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12-13	~3%
<b>FA-D2</b>	<i>FANCD2</i>	3p25.3	~3%
<b>FA-E</b>	<i>FANCE</i>	6p21-22	~3%
<b>FA-F</b>	<i>FANCF</i>	11p15	~2%
<b>FA-G</b>	<i>FANCG/XRCC9</i>	9p13	~10%
<b>FA-I</b>	<i>FANCI</i>	15q25-q26	~1%
<b>FA-J</b>	<i>FANCI/BRIP1/BACH1</i>	17q22-q24	~2%
<b>FA-L</b>	<i>FANCL/PHF9/POG/FAAP43</i>	2p16.1	~0.2%
<b>FA-M</b>	<i>FANCM/Hef/FAAP250</i>	14q21.3	~0.2%
<b>FA-N</b>	<i>FANCN/PALB2</i>	16p12.1	~0.7%
<b>FA-O</b>	<i>FANCO/RAD51C</i>	17q25.1	~0.2%
<b>FA-P</b>	<i>FANCP/SLX4</i>	16p13.3	~0.2%

Fuente: Alter, B. y Kupfer, G. (2011). Fanconi Anemia. *US National Library of Medicine National Institutes of Health (NCBI)*. Recuperado el 7 de Diciembre de 2011, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401>

Los enlaces cruzados interhebra (ECI) son enlaces covalentes que se forman entre las dos hebras de ADN, evitan la separación de las hebras y bloquean procesos necesarios de la célula como la replicación y la transcripción. Las células de pacientes con AF son hipersensibles a los clastógenos, debido a la incapacidad de reparar los ECI como consecuencia de mutaciones en las proteínas FA, produciendo ambientes celulares citotóxicos (Niedernhofer, Lalai y Hoeijmakers, 2005).

La vía Fanconi se muestra en la figura 1. La vía se activa a través de la inducción del daño en el ADN y la formación del ECI, inmediatamente se forma el Complejo Nuclear Fanconi (CNF), formado por las proteínas *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCL* y *FANCM*. La función principal del CNF

es la monoubiquitinación de la proteína *FANCD2*, lo cual permite la formación de la fosa nuclear alrededor del ECI y el anclaje de la maquinaria necesaria para la reparación del mismo (BRCA1, ATR, RPA, BLM, MRE11, NBS1, RAD50 y DSS1). La proteína *FANCD1* es necesaria para la formación de la fosa nuclear y la unión a otras proteínas no FA, que permite la estabilización de la horquilla de replicación para la reparación de los ECI (Taniguchi y D'Andrea, 2006). Se ha identificado un dominio de *FANCD1* que actúa como helicasa y se relaciona con la recombinación homóloga, proceso necesario para la reparación completa del ECI (Niedernhofer, Lalai y Hoeijmakers, 2005).



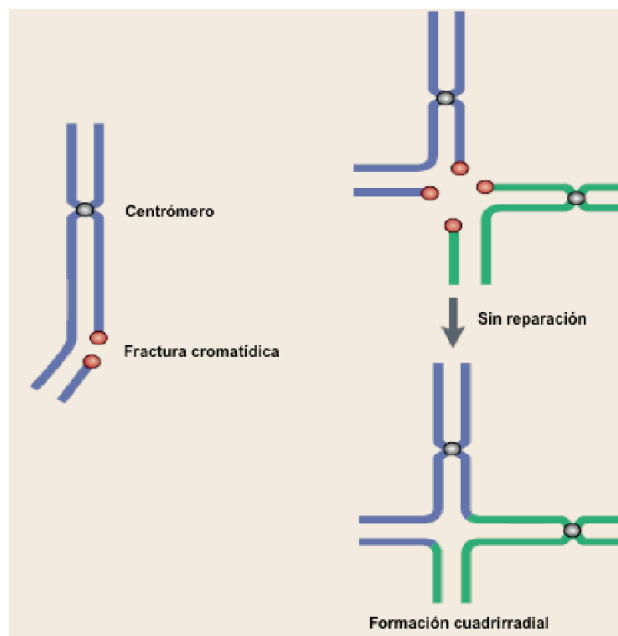
Fuente: Taniguchi, T. y D'Andrea, A. D. (2006). Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: Recent progress. *Blood*, 107(11), 4223-4232

**Figura 1:** Modelo propuesto para la vía Fanconi

La reparación completa del ECI involucra una serie de procesos además de la vía Fanconi, sin embargo mutaciones en las proteínas FA provocan rupturas en la doble hebra de ADN (RDHA) generando inestabilidad cromosómica en las células expuestas a clastógenos (Niedernhofer, Lalai y Hoeijmarkers, 2005). Las rupturas provocadas en los cromosomas son principalmente las responsables de la susceptibilidad al cáncer en estos pacientes (Joenje y Patel, 2001).

Otro tipo de aberración cromosómica producida en los pacientes es la formación de estructuras radiales (dirradiales, trirradiales y tetradiales), como consecuencia de un intercambio entre cromátides. En células normales la recombinación homóloga permite la reparación de las rupturas en las hebras, utilizando como patrón una de las cromátides hermanas para la síntesis de la información genética perdida. Sin embargo, esto no ocurre en pacientes con anemia de Fanconi, debido a que la RDHA no es reparada por recombinación homóloga y por lo tanto, la ruptura persiste.

Las rupturas en la doble cadena de ADN son reparadas mediante recombinación ilegítima, es decir mediante secuencias ubicadas en cromosomas no homólogos, lo que da lugar a las formaciones radiales (Niedernhofer, Lalai y Hoeijmarkers, 2005). En la figura 2 se esquematiza la formación de una estructura tetradial, los puntos representan las rupturas en dos cromátides no homólogas, generando la formación cromosómica como consecuencia del intercambio cromatídico (Joenje y Patel, 2001).



Fuente: Joenje, H. y Patel, K. (2001). The Emerging genetic and molecular bases of Fanconi anaemia. *Nature Reviews Genetics*, 2 (6) 446-457.

**Figura 2:** Formación de estructuras radiales en ausencia de reparación de ECI mediante recombinación homóloga:

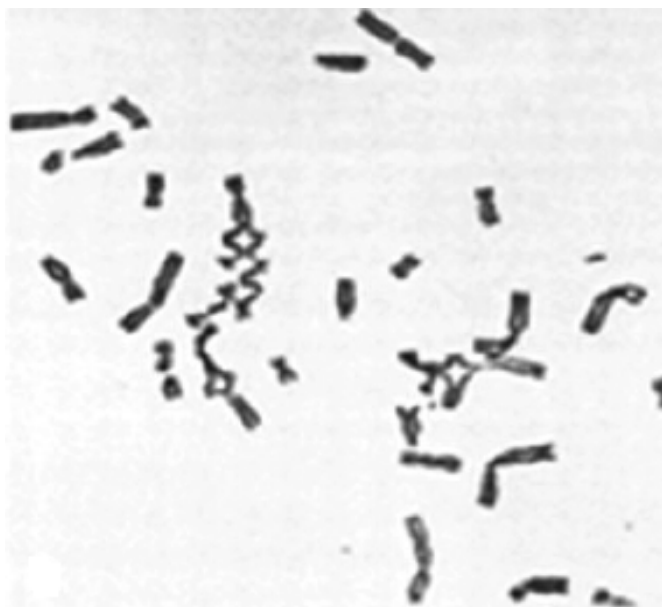
#### D. DIAGNÓSTICO

La Anemia de Fanconi debe sospecharse en aquellos pacientes con las características clínicas mencionadas en la tabla 1, el fallo medular, mielodisplasia y LMA. La técnica estándar de oro empleada para el diagnóstico de la enfermedad se denomina fragilidad cromosómica y se basa en la alta sensibilidad de las células a formar enlaces cruzados entre las dos hebras de ADN ante la exposición a clastógenos, lo cual constituye un sello característico de la patología (Wang, 2007).

En Guatemala el diagnóstico únicamente se realiza con base a las características, hallazgos y evolución clínica. El diagnóstico correcto y precoz de los pacientes con AF permite el monitoreo adecuado, toma de decisiones importantes en el tratamiento del paciente y pronto asesoramiento genético de los miembros de la familia (Tischkowitz y Hodgson, 2003).

La fragilidad cromosómica es una técnica citogenética que se basa en el cultivo celular (linfocitos o fibroblastos) en presencia de un agente inductor de ECI conocido como clastógeno, los más utilizados son el Diepoxibutano (DEB) y la Mitomicina C (MMC) (Joenje y Patel, 2001). El resultado de la exposición de las células al DEB o MMC es el apareamiento de rupturas cromosómicas y estructuras radiales en el 30 – 100% de las células de los pacientes Fanconi (Niedernhofer, Lalai y Hoeijmarkers, 2005). La sensibilidad de las células de pacientes con AF aumenta de 10 – 100 veces más, ante la exposición a MMC, generando anomalías cromosómicas principalmente del tipo de formaciones radiales (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997).

En la fotografía 3 se muestra una metafase obtenida del cultivo de linfocitos de un paciente con AF y la exposición a DEB en una concentración de 0.1ug/mL, donde se observan estructuras radiales, rupturas, fracturas y formaciones complejas (Auerbach, 2009).



Fuente: Auerbach, A. D. (2009). Fanconi Anemia and its Diagnosis. *Mutat Res*, 668 (1-2), 668-683.

**Fotografía 3:** Metafase de paciente con AF

Posteriormente al cultivo celular se lleva a cabo el análisis citogenético de las metafases, el cual consiste en la observación al microscopio de cada una de las anomalías estructurales cromosómicas presentes en las células tratadas con MMC/DEB (ver Fotografía 3). Las anomalías cromosómicas reciben un puntaje según el tipo, ver tabla 3 (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997). Una vez contadas las aberraciones estructurales presentes, se calcula el número de aberraciones cromosómicas por célula (fracturas/célula), obteniendo un valor que se compara con el nivel de fractura,  $\geq 1.0$  fracturas/célula es considerado positivo y es negativo cuando el nivel de fractura es  $\leq 0.5$ . Resultados entre 0.5 y 1.0 son reportados como negativos, sin embargo se debe indicar que los resultados se encuentran cercanos a los puntos de corte y por ende, es necesario repetir la prueba con una nueva muestra del paciente (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997). El análisis de fragilidad cromosómica de los pacientes con anemia de Fanconi, mediante el uso de MMC y DEB, ha demostrado resultados con alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Auerbach, 2009).

**Tabla 3:** Puntaje de las anomalías cromosómicas estructurales

<b>Anomalías estructurales</b>	<b>Puntaje</b>
Rupturas cromosómicas/cromatídicas	1
Fracturas	1
Deleciones	1
Translocaciones	2
Anillos	2
Lagunas (gaps)	2
Formaciones Radiales	
Dirradiales	2
Trirradiales	2
Tetrarradiales	2

Fuente: Barch M., Knusen, T. y Spurbeck, J. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. USA: Lippincott-Raven Publishers.

Se ha encontrado que entre el 10 – 20% de los pacientes con Anemia de Fanconi pueden presentar mosaicismo somático hematopoyético y dar negativo a la prueba de fragilidad cromosómica en sangre periférica. Sin embargo, los fibroblastos de la piel muestran un nivel de ruptura mayor inducida por la Mitomicina C, por lo que se recomienda realizar el cultivo de fibroblastos cuando el resultado del cultivo de sangre periférica es negativo al test de MMC y no existe correlación entre el resultado del test y la impresión clínica del paciente (Lavaut, Jaime, Nuñez, Pavón, Hernández, y Machín, 2008; Elier, Frohnmayer, D., Frohnmayer, L., Larsen y Ownen, 2008).

El diagnóstico diferencial se debe realizar de otros síndromes con similitudes clínicas como neurofibromatosis tipo I, síndrome TAR (trombocitopenia con ausencia de radio), síndrome VACTERL (acrónimo en inglés: V-verteral, A-anal, C-cardiac, T-thoracic, E-esophagus, R-renal, L-limbs), síndrome de Holt-Oram y anemia de Diamond-Blackfan y otros síndromes de fragilidad cromosómica. En los síndromes mencionados anteriormente, la prueba de fragilidad cromosómica es negativa, por esta razón la confirmación de la AF debe realizarse con la prueba de fragilidad cromosómica (Sagasetta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003).

Los síndromes de inestabilidad cromosómica como Ataxia-Telangiectasia, Síndrome de Bloom, Xeroderma Pigmentosa, presentan alto índice de rupturas cromosómicas espontáneas, sin embargo la inestabilidad cromosómica observada en pacientes con AF es única y distinta a los síndromes antes mencionados. Por ejemplo, en el síndrome de Bloom el intercambio cromatídico está relacionado a secuencias homólogas de cromosomas homólogos, mientras que en las células Fanconi el intercambio cromatídico es al azar. En cuanto al síndrome de Ataxia-telangiectasia las translocaciones observadas no son al azar y las inversiones involucran preferentemente los genes de receptores de linfocitos B y T (Joenje y Patel, 2001).

Es recomendable realizar la prueba de fragilidad cromosómica a pacientes con malignidades como LMA previo al inicio de quimioterapia, debido a que muchos



de los pacientes Fanconi cursan con malignidades como primer síntoma. También se puede considerar realizar la prueba en pacientes que presenten inesperada toxicidad como resultado de tratamiento con quimioterapia o radioterapia (Shimamura et al, 2002).

La determinación del grupo de complementación o análisis de complementación de los pacientes con anemia de Fanconi, adquiere cada vez mayor importancia, debido a la relación que se ha reportado entre el genotipo y fenotipo del paciente (Taniguchi y D'Andrea, 2006). El análisis de complementación se basa en la capacidad de un plásmido de corregir el fenotipo sensible a MMC de una línea celular (linfoblastos), el plásmido expresa una copia normal del gen FA defectuoso, (Joenje y Patel, 2001).

La importancia de la determinación del grupo de complementación se basa tanto en el pronóstico del paciente, el tipo de anomalía que puede presentar y el tejido afectado. Los pacientes con mutaciones puntuales o anomalías funcionales en el gen *FANCA*, tipo de complementación A, pueden desarrollar LMA, mientras que mutaciones en *FANCC* pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer pancreático. Por lo tanto, pacientes *FANCC* tienen un pronóstico significativamente pobre en comparación con pacientes con grupo de complementación *FANCA* (Taniguchi y D'Andrea, 2006). El subtipo *FANCD2* está relacionado con incremento en la predisposición a meduloblastoma, tumor de Wilms y LMA en la niñez y difiere clínicamente de otros grupos de complementación (Taniguchi y D'Andrea, 2006).

Recientes estudios han demostrado que las mutaciones monoalélicas de los genes *PALB2*, *RAD51C* y *SLX4*, predisponen al cáncer, sin embargo la presencia de mutaciones bialélicas en dichos genes causan tres subtipos de anemia de Fanconi *FANCN*, *FANCO* y *FANCP*, respectivamente (Thompson, 2005) (Kim, Lach, Desetty, Hanenberg, Auerbach y Smogorzewska, 2011) (Rahman et al., 2007) (Reid et al., 2007) (Xia et al., 2007).

## E. TRATAMIENTO

El tratamiento del paciente es esencialmente de soporte y la única opción curativa para los aspectos hematológicos es el trasplante de médula ósea (Joenje y Patel, 2001). Debido a la complejidad de la enfermedad es necesario el manejo multidisciplinario por especialistas médicos, por lo tanto es necesaria la comunicación con el médico principal, quien normalmente es el hematólogo/oncólogo, para evitar interacciones medicamentosas (Eiler, Frohnmayer, Frohnmayer, Larsen y Ownen, 2008).

Las estrategias terapéuticas para el fallo medular incluyen terapia con andrógenos, factores hematopoyéticos de crecimiento, régimen transfusional y trasplante de médula ósea. La primera opción de tratamiento son los andrógenos, sin embargo si el paciente no tiene una respuesta hematológica aceptable es necesario iniciar tratamiento con factores hematopoyéticos de crecimiento. Una vez que los andrógenos y los factores hematopoyéticos de crecimiento son ineficaces, se prosigue a iniciar un régimen transfusional. El fallo medular en la mayoría de los casos puede ser tratado eficazmente con andrógenos y factores hematopoyéticos de crecimiento, sin embargo otros casos requieren de trasplante de médula ósea (Taniguchi y D'Andrea, 2006; Sagasetta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003). El resultado de tratar un paciente Fanconi con radioterapia o inmunosupresores previo al trasplante de médula ósea, puede ser devastador debido a la fragilidad cromosómica (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997).

En la última década, se ha logrado avances en el trasplante de médula ósea, sin embargo en algunos casos no es posible llevar a cabo este procedimiento en el paciente, debido a problemas de salud previo, durante y posterior al trasplante. Por lo tanto, se ha investigado en tres áreas terapéuticas: terapia génica, terapia de células madre y terapia de genes de células madre, las cuales son herramientas poderosas en la búsqueda de una mejor terapia para el tratamiento de la enfermedad (Eiler, Frohnmayer, Frohnmayer, Larsen y Ownen, 2008).

Los pacientes con anemia de Fanconi tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer, por esta razón, hasta que se disponga de medidas terapéuticas que disminuyan las secuelas, las medidas preventivas y de vigilancia como evitar el cigarro y realizar chequeos periódicos con el médico para la evaluación cuidadosa de la cavidad bucal y examen ginecológico, deben ser una prioridad (Eiler, Frohnmayer, Frohnmayer, Larsen y Ownen, 2008).

En los pacientes con cáncer de cabeza y cuello el tratamiento consensuado de elección como modalidad curativa primaria es la cirugía, ya que aparentemente no existe aumento en las complicaciones o secuelas a largo plazo. De ser necesario el uso de radioterapia o quimioterapia, se deben seleccionar cuidadosamente a los pacientes candidatos e individualizar el régimen de elección para tratar de minimizar las secuelas (Eiler, Frohnmayer, Frohnmayer, Larsen y Ownen, 2008).

## **F. SEGUIMIENTO**

En los pacientes que sobreviven a los problemas hematológicos, es de gran importancia la prevención, vigilancia y tratamiento de tumores sólidos (Taniguchi y D'Andrea, 2006). Estudios realizados han demostrado el apareamiento de malignidades con un riesgo predictivo de 42% después de 20 años del trasplante de médula ósea (Tischkowitz y Hodgson, 2003).

Los pacientes deben ser vigilados en cuanto al apareamiento de tumores orofaríngeos, esofágicos y hepáticos. Las mujeres afectadas deben tener un seguimiento ginecológico anual para detección de tumores cervicales y vulvares. En cuanto a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia, estos deben utilizarse al mínimo, tomando como primera opción las intervenciones quirúrgicas (Tischkowitz y Hodgson, 2003).

La asesoría genética e intervenciones psicosociales adecuadas deben reforzarse en el paciente y su familia, además de una atención coordinada del equipo

multidisciplinario, para el manejo exitoso del paciente (Eiler, Frohnmayer, Frohnmayer, Larsen y Ownen, 2008).

### III. JUSTIFICACIÓN

La anemia de Fanconi es una rara enfermedad genética presente a nivel mundial. En Guatemala se tiene poco conocimiento sobre esta entidad y no existen estudios que permitan conocer el número de afectados. La presente investigación permite realizar una descripción de los casos confirmados de anemia de Fanconi encontrados en Guatemala entre el año 2012 y 2013. Si bien, la investigación no podrá brindar información epidemiológica, permite describir los casos encontrados y confirmar la presencia de la enfermedad en el paciente y en el país.

En los pacientes con anemia de Fanconi, el diagnóstico diferencial debe realizarse con otras patologías o síndromes con características clínicas comunes, debido a que un abordaje terapéutico inadecuado puede provocar graves secuelas e incluso la muerte en los pacientes con anemia de Fanconi. En Guatemala, el diagnóstico de anemia de Fanconi se hace con base en la información clínica y no es confirmado con de pruebas específicas. En la presente investigación, se utiliza el test de MMC para confirmar el diagnóstico en los pacientes con anemia de Fanconi, permitiendo que los casos descritos en la investigación, sean casos confirmados de la enfermedad.

Este trabajo es pionero en la investigación de la anemia de Fanconi en Guatemala, al reportar los primeros casos confirmados con una prueba estándar de oro, la cual es realizada desde los años 80's en países de primer mundo. Además, los resultados serán la base para futuras investigaciones sobre esta enfermedad. El paciente con diagnóstico confirmado podrá optar por un adecuado abordaje clínico y terapéutico y recibir consejería genética familiar apropiada.

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **A. General:**

Describir los casos confirmados de anemia de Fanconi encontrados en Guatemala entre enero de 2012 y junio de 2013.

##### **B. Específicos:**

1. Establecer el diagnóstico definitivo de anemia de Fanconi por medio del test de Mitomicina C en pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad.
2. Establecer la descripción de anomalías congénitas, hallazgos clínicos y paraclínicos de los casos confirmados de anemia de Fanconi.

## **V. HIPÓTESIS**

Por ser un estudio de tipo descriptivo de reporte de casos no incluye hipótesis.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

**A. Universo:** Pacientes con diagnóstico clínico de anemia de Fanconi.

### **1. Población:**

Pacientes guatemaltecos con diagnóstico clínico de anemia de Fanconi.

### **2. Muestra:**

Muestra por conveniencia: pacientes guatemaltecos con diagnóstico clínico de Anemia de Fanconi encontrados entre enero de 2012 hasta junio de 2013, referidos por hematólogos de los principales centros hospitalarios de referencia de Guatemala.

#### **a. Criterios de Inclusión**

Pacientes guatemaltecos con diagnóstico clínico de anemia de Fanconi que cumplan con al menos 1 de los siguientes criterios:

- i. Fenotipo de Anemia de Fanconi
- ii. Anemia Aplásica
- iii. Tener un hermano con diagnóstico confirmado de anemia de Fanconi por el Test de Mitomicina C (Auerbach, 2009; Sagaseta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003).

## **B. Materiales**

### **1. Materiales y equipo para documentación de la información recolectada:**

- a. Hojas
- b. Lapiceros
- c. Cuaderno de notas



- d. Archiveros (cartapacios)
- e. Cámara fotográfica
- f. Computadora portátil
- g. Impresora
- h. Fotocopiadora

## **2. Medios e instrumentos de recolección de datos:**

- a. Consentimientos informados de los pacientes o tutores legales firmados (Ver anexo 1 y 2).
- b. Boleta de recolección de datos (Ver anexo 3).
- c. Expedientes clínicos de los casos de anemia de Fanconi
- d. Entrevistas con los médicos tratantes para completar la información del caso.

## **C. Métodos**

### **1. Diseño estadístico**

El estudio es de tipo descriptivo de reporte de casos. Se describen las siguientes características de los casos de Anemia de Fanconi confirmados por el test de Mitomicina C:

- a. Características generales de los casos: edad, sexo, lugar de procedencia.
- b. Hallazgos clínicos importantes: Fenotipo de AF (anormalidades congénitas presentes).
- c. Hallazgos paraclínicos importantes: presencia de anemia aplásica y presencia de alteraciones hematológicas como citopenias o pancitopenias, resultado de la prueba de fragilidad cromosómica, entre otros hallazgos de importancia.

Los datos mencionados anteriormente se obtuvieron mediante el formulario de recolección de datos (anexo 3), revisión exhaustiva de los expedientes y entrevistas con los médicos tratantes con previa autorización por consentimiento informado. Los datos se reportan en forma de tablas y gráficas que permitan comparar las diferentes características descritas de los casos.

## **2. Metodología**

### **a. Promoción de la investigación con hematólogos:**

Se contactó a los hematólogos de los principales centros hospitalarios de referencia del país para informarlos sobre el estudio y la importancia de su apoyo a la investigación. Los hematólogos son los médicos que generalmente realizan el diagnóstico clínico de los paciente con anemia de Fanconi y por consiguiente, son los médicos de interés para la referencia de los casos.

### **b. Referencia de pacientes y análisis de fragilidad cromosómica:**

Una vez referidos los pacientes con diagnóstico clínico de anemia de Fanconi y se procedió a realizar el análisis de fragilidad cromosómica. Las muestras recolectadas para la prueba de fragilidad cromosómica fueron muestras de sangre periférica del paciente y estaban acompañadas de la boleta de recolección de datos y el consentimiento firmado por el paciente, padres o tutores legales (Ver anexo 1 - 3). El análisis de fragilidad cromosómica se realizó por medio del test de MMC, técnica que se detalla en el anexo 4. Se recolectaron 13 muestras de pacientes, únicamente 9 pacientes dieron positivo para el test de MMC.

**c. Definición de los casos:**

Los casos confirmados de AF fueron definidos como pacientes con diagnóstico clínico de anemia de Fanconi y resultado positivo para el test de MMC en sangre periférica. En los pacientes negativos para el test de MMC únicamente se describe la edad, el sexo, la presencia del fenotipo de AF y la presencia de anemia aplásica.

**d. Revisión de historias clínicas de los casos y entrevistas con los médicos tratantes:**

Se realizó una revisión exhaustiva de los expedientes de los casos confirmados de anemia de Fanconi con previa autorización del paciente, de los padres o tutores legales mediante la firma del consentimiento informado (Ver anexo 1 y 2). Además se documentó mediante fotografías las anomalías congénitas, si el paciente o tutor legal brindó su autorización. Las entrevistas con los médicos tratantes permitieron obtener información importante que no se encontraba presente en el expediente del paciente.

**e. Descripción de los casos:**

Las características de los casos confirmados que se describen son las siguientes:

- 1) Información demográfica
  - a) Edad
  - b) Sexo
  - c) Lugar de procedencia
- 2) Información clínica
  - a) Manifestaciones clínicas

- b) Examen clínico con mención de los hallazgos positivos o negativos pertinentes
  - c) Hallazgos de laboratorio pertinentes con los valores de referencia
  - d) Severidad de síntomas y signos
  - e) Comorbilidades
  - f) Evolución de la enfermedad
  - g) Tratamiento instaurado
- 3) Otra información relevante
- a) Fotografías
  - b) Histopatología
  - c) Electrocardiogramas
  - d) Radiografías
  - e) Ultrasonidos
  - f) Otras pruebas importantes realizadas

## VII. RESULTADOS

En el presente estudio fueron incluidos 13 pacientes diagnosticados clínicamente con AF por hematólogos de los principales centros de referencia del país. En la tabla 1 se muestran las características de los casos incluidos. La edad oscila entre 7 meses y 14 años. El sexo masculino presentó mayor frecuencia con 11 casos y 2 del sexo femenino. Al realizar el test de MMC para determinar la presencia de fragilidad cromosómica y confirmar la AF, 9 de los casos (9/13) con anomalías congénitas (fenotipo de AF) fueron positivos y corresponden a los casos confirmados 01 al 09 (Ver tabla 1). Esto permitió clasificar los casos como pacientes confirmados con anemia de Fanconi (FA) y pacientes no confirmados (NFA). El fenotipo de AF se presentó en 12 de los 13 casos referidos y la anemia aplásica en 10, como lo muestra la tabla 1.

**Tabla 1:** Características y clasificación de los casos referidos

Casos (n= 13)	Edad (años)	Sexo <sup>1</sup> (M/F)	Fragilidad <sup>2</sup> Cromosómica	Clasificación <sup>3</sup> (FA/NFA)	Fenotipo de AF <sup>4</sup>	Anemia Aplásica
01	7	M	+	FA	+	+
02	11	M	+	FA	+	-
03	7	M	+	FA	+	+
04	9	M	+	FA	+	+
05	10	F	+	FA	+	+
06	6	M	+	FA	+	+
07	10	M	+	FA	+	-
08	14	M	+	FA	+	+
09	8	F	+	FA	+	+
10	13	M	-	NFA	-	+
11	12	M	-	NFA	+	+
12	14	M	-	NFA	+	+
13	<1*	M	-	NFA	+	-
No. de Casos	-	11 M 2 F	9	9 FA 4 NFA	12	10

Fuente: datos obtenidos de expedientes de los pacientes y de la prueba de fragilidad cromosómica en linfocitos de sangre periférica. <1\* paciente con 7 meses de edad; + :Presente; - : Ausente; Sexo<sup>1</sup> M = masculino, F= femenino; <sup>2</sup>La prueba de fragilidad cromosómica se realizó por medio del test de Mitomicina C (MMC) y se considera positivo cuando el nivel de ruptura es > 1 fracturas/célula, ver anexo No. 3; Clasificación<sup>3</sup>: FA = paciente confirmado con AF; NFA = paciente no confirmado con AF; Fenotipo de AF<sup>4</sup>: suma de anomalías congénitas presentes en pacientes con anemia de Fanconi.

El fenotipo de AF estuvo presente en los 9 casos confirmados de AF y en 3 casos NFA. La anemia aplásica se encontró en 7 casos FA y en 3 NFA (Ver tabla 2). En los casos 10 al 13, clasificados como NFA, se descarta el diagnóstico de AF porque la prueba de fragilidad cromosómica fue negativa.

Dentro de las características demográficas de los 9 casos confirmados, la edad oscila entre 6 y 14 años (mediana = 9 años, media = 9.1 años y DS =  $\pm 2.47$ ). Se observó mayor predominio del sexo masculino con 7 casos y 2 casos del sexo femenino. En cuanto al lugar de procedencia, todos los pacientes son originarios de diferentes regiones de Guatemala, siendo la región Metropolitana la que mayor número de casos presenta (5 casos), seguido por 1 caso de la región Noroccidental (Quiché), 1 caso de la región Suroccidental (Totonicapán), 1 caso de la región Nororiental (Zacapa) y 1 caso de la región Central (Escuintla).

La presentación clínica de los 9 casos con AF es heterogénea. En la tabla 3 se muestran las características de los casos y la descripción detallada se presenta en el anexo 4. En las anomalías de los pulgares, el caso 01 presentó agenesia bilateral de pulgares y los casos 02, 04, 07 y 08 presentaron anomalías de tipo hipoplasia, inadecuada implantación, asimetría y luxación. Las anomalías de la piel se presentaron en todos los casos. La hiperpigmentación localizada o generalizada se presentó en todos los casos, mientras que la presencia de manchas café con leche se limitó a los casos 03, 04, 08 y 09.

**Tabla 2:** Frecuencia de Fenotipo de AF y Anemia Aplásica

	<b>Fenotipo de AF</b>	<b>Anemia Aplásica</b>
<b>FA</b>	9	7
<b>NFA</b>	3	3
<b>Total</b>	12	10

Fuente: datos obtenidos de expedientes de los pacientes referidos.

**Tabla 3:** Descripción de los casos confirmados de AF

Casos	01	02	03	04	05	06	07	08	09	Total de afectados	% de afectados
<b>Edad (años)</b>	7	11	7	9	10	6	10	14	8	NA*	NA*
<b>Sexo<sup>1</sup> (M/F)</b>	M	M	M	M	F	M	M	M	F	7 M 2 F	78 22
<b>Anormalidades de pulgares</b>	+	+	-	+	-	-	+	+	-	5	56
<b>Anormalidades en Piel</b>										9	100
Hiperpigmentación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	100
Manchas café con leche	-	-	+	+	-	-	-	+	+	4	44
<b>Cabeza</b>										6	67
Microcefalia	+	+	-	-	-	-	-	+	+	4	44
Microftalmia	+	+	+	+	-	-	-	+	+	6	67
<b>Microsomía</b>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	7	78
<b>Anormalidades Renales</b>	-	-	+	-	SD <sup>2</sup>	SD <sup>2</sup>	SD <sup>2</sup>	+	-	2	22
<b>Anomalías cardíacas</b>										6	67
Soplo cardíaco	+	-	-	+	+	-	-	-	+	4	44
ICC <sup>3</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	2	22
Taquicardia	+	-	-	-	+	-	-	-	+	3	33
Levocardia	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1	11
<b>Endocrinopatías</b>	-	-	-	-	-	SD <sup>2</sup>	+	-	-	1	11
<b>Fallo medular</b>										9	100
Hipoplasia medular	-	+	-	-	-	-	+	-	-	2	22
Anemia aplásica	+	-	+	+	+	+	-	+	+	7	78
<b>Manifestaciones hematológicas<sup>4</sup></b>										9	100
Leucopenia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	100
Eritropenia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	100
Trombocitopenia	+	-	+	+	+	-	+	+	+	7	78
HB baja <sup>5</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	100
HT bajo <sup>6</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	100

Fuente: datos obtenidos de expedientes de los pacientes y de la prueba de fragilidad cromosómica en linfocitos de sangre periférica. + : Presente; - : Ausente; NA\*: No aplica; Sexo<sup>1</sup>: M = masculino, F= femenino; SD<sup>2</sup>: se desconoce por no contar los datos o no haber realizado pruebas para determinar la anomalía; ICC<sup>3</sup>: Insuficiencia cardíaca congestiva; Manifestaciones hematológicas<sup>4</sup>: corresponde a las manifestaciones presentes a lo largo del seguimiento clínico; HB<sup>5</sup>: hemoglobina; HT<sup>6</sup>: hematocrito.

La microcefalia se presentó en 4 casos y la microftalmia en 6 de los casos confirmados, ver tabla 3. En la mayoría de los casos se encontró presente la microsomía, exceptuando los casos 03 y 04 quienes se encontraban dentro de la talla normal para su edad. Las anormalidades renales se confirmaron únicamente en 2 de los casos y se relacionan a la implantación anormal de los riñones y no a la presencia de anormalidades funcionales o estructurales de los riñones o vías urinarias.

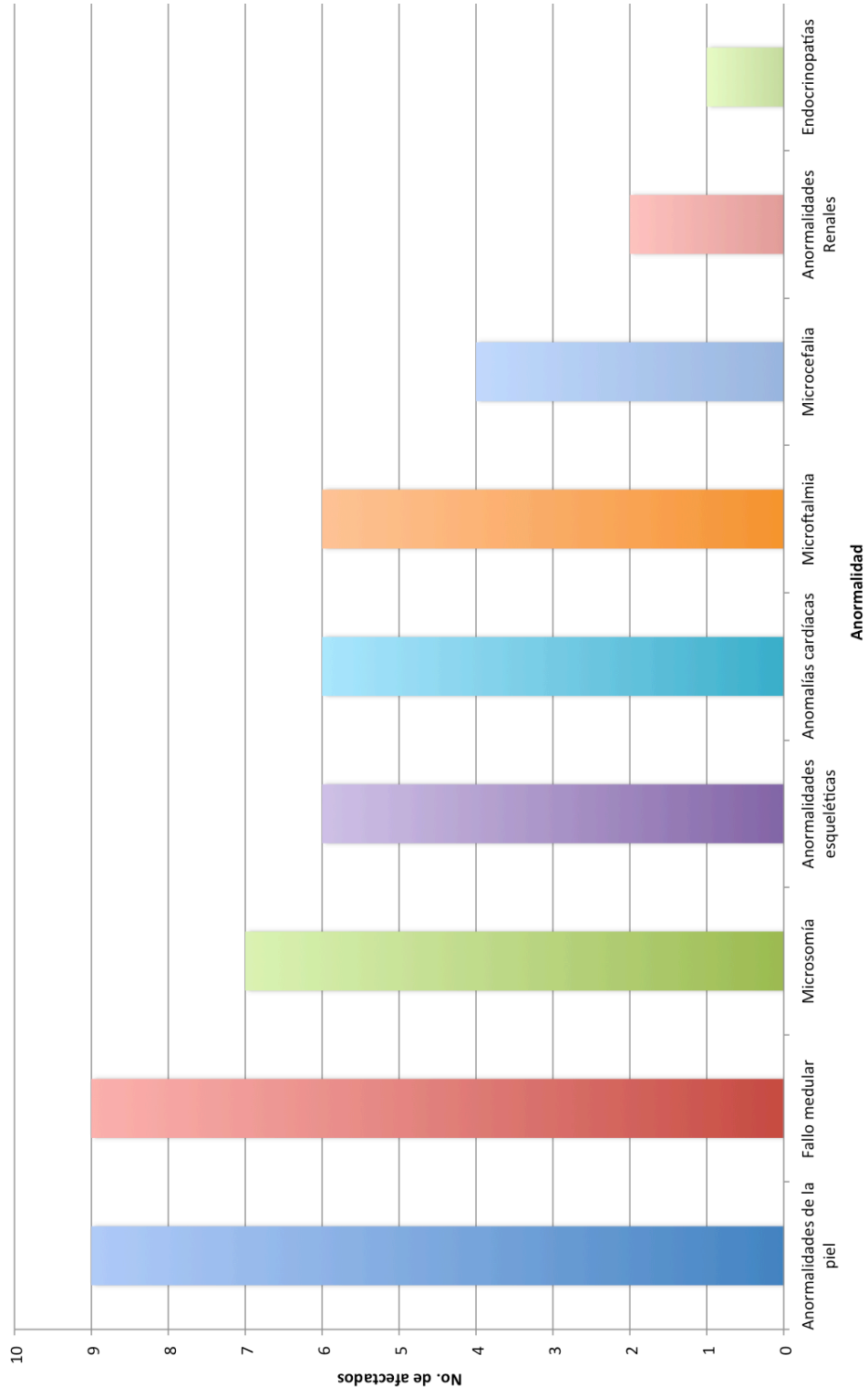
Se confirmó la presencia de soplo cardíaco de grado II/VI en los casos 01, 04 y 05, en el caso 09 el soplo presente es de tipo III/VI. La taquicardia se encontró presente en los caso 01, 05 y 09. El caso 07 presentó levocardia sin evidencia de otra anomalía cardíaca funcional. La presencia de endocrinopatías se confirmó únicamente en el caso el 07 con Hipotiroidismo.

El fallo medular presente en los casos 02 y 07 es hipoplasia medular, los demás casos presentaron anemia aplásica. La presencia de citopenias a lo largo del seguimiento clínico se encuentra presente en todos los casos y en la mayoría están afectadas todas las líneas celulares hematológicas (pancitopenia), ver descripción en la tabla 3.

En resumen, las anormalidades de la piel y el fallo medular se presentaron en todos los casos confirmados, seguido por la microsomía (78%), anormalidades esqueléticas, cardíacas y microftalmia (67%), microcefalia (44%), anormalidades renales (22%) y endocrinopatías (11%), datos que se presentan en la tabla 3 y la gráfica 1. Ninguno de los casos presentó algún tipo de malignidad hasta el momento. Los pacientes 01 y 03 fallecieron en el primer semestre de 2013 como consecuencia de complicaciones de las anormalidades hematológicas frecuentes en la AF, neumonía y hemorragia cerebral respectivamente.



**Gráfica 1:** Frecuencia de anomalías presentes en los casos FA



Fuente: datos obtenidos de expedientes de los pacientes.

La descripción de los resultados de la prueba de fragilidad cromosómica se presenta en la tabla 4. El nivel de fractura inducido por la MMC (30 ng/mL) en los casos confirmados presenta las siguientes medidas de tendencia central: mediana = 6.18 fracturas/célula, media = 6.7 fracturas/célula y DS =  $\pm$  2.6. Todos los casos mostraron importante aumento en el nivel de fractura inducido por la MMC en comparación con las fracturas espontáneas presentes en los cultivos sin MMC y los controles normales (CN1-CN6). El nivel de fractura inducido por la MMC se encuentra de 30.7 a 102.7 veces más en los casos que en los controles, con una media de  $60.6 \pm 24.0$ .

La relación entre el nivel de fractura inducido por la MMC y el nivel de fracturas espontáneas presenta un rango entre 6.38 – 50.33. En el caso 03 el nivel de fractura aumentó 50.33 veces en presencia de MMC, seguido por los casos 06 (47.54), 01 (18.50), 08 (10.09), 09 (17.88), 02 (8.80), 05 (7.87), 07 (6.43) y 04 (6.38), los últimos casos mostraron menor sensibilidad al efecto de la MMC. Los controles presentaron un nivel de fractura por debajo del valor establecido como negativo en presencia de MMC (0.5 fracturas/célula) y no presentaron fracturas o formaciones radiales espontáneas.

En la tabla 4 se describe el porcentaje de las fracturas y las formaciones radiales presentes en las metafases contadas y las metafases aberrantes. El porcentaje de fracturas cromosómicas y el porcentaje de células con fracturas cromosómicas aumentó notablemente en comparación con los resultados de los controles. El porcentaje de formaciones radiales y el porcentaje de células con formaciones radiales se observó para los casos en un rango de 0.0 – 50.0% y 0.0 – 45.0% respectivamente, mientras que los controles no presentaron formaciones radiales en sus metafases. En 3 de los casos el porcentaje de células con fracturas fue del 100%, mientras que en los otros 6 casos (6/9) presentaron un porcentaje entre 83.5 y 97%, sugiriendo la presencia de 2 poblaciones celulares, una sensible a la MMC más predominante y una resistente a la MMC en menor cantidad.

Tabla 4: Nivel de fractura del Test de MMC

Caso	NF <sup>1</sup> con MMC	NF Espontáneas <sup>2</sup>	Relación NF cMMC/NF sMMC <sup>3</sup>	% Fracturas Cromosómicas <sup>4</sup>	% Células con fracturas <sup>5</sup>	% Formaciones Radiales <sup>6</sup>	% Células con Formaciones radiales <sup>7</sup>
01	11.30	0.67	18.50	620.0	95.0	50.0	30.0
02	8.16	0.93	8.80	760.0	100.0	5.0	5.0
03	7.55	0.15	50.33	735.0	100.0	20.0	10.0
04	3.38	0.53	6.38	317.5	87.5	10.0	10.0
05	3.70	0.47	7.87	343.3	83.3	6.7	6.7
06	6.18	0.13	47.54	587.9	97.0	12.1	9.1
07	4.89	0.76	6.43	489.3	89.3	0.0 <sup>9</sup>	0.0 <sup>9</sup>
08	5.55	0.55	10.09	485.0	95.0	40.0	30.0
09	9.30	0.52	17.88	800.0	100.0	50.0	45.0
<b>FA</b>							
<b>Mediana</b>	6.18	0.53	10.09	587.9	95.0	12.1	10.0
<b>Media ± DS</b>	6.7 ± 2.6	0.52 ± 0.26	19.3 ± 17.4	570.9 ± 176.0	94.1 ± 6.1	21.5 ± 19.8	16.2 ± 15.1
<b>Rango</b>	3.38 – 11.3	0.13 – 0.93	6.38 – 50.33	317.5 – 800.0	83.3 – 100.0	0.0 – 50.0	0.0 ± 45.0
<b>CV<sup>8</sup></b>	39.6	49.7	90.1	30.8	6.5	92.1	93.0
<b>CN01</b>	0.10	0.00 <sup>9</sup>	NA	10.0	5.0	0.00 <sup>9</sup>	0.00 <sup>9</sup>
<b>CN02</b>	0.20	0.00 <sup>9</sup>	NA	20.0	15.0	0.00 <sup>9</sup>	0.00 <sup>9</sup>
<b>CN03</b>	0.25	0.00 <sup>9</sup>	NA	25.0	20.0	0.00 <sup>9</sup>	0.00 <sup>9</sup>
<b>CN04</b>	0.05	0.00 <sup>9</sup>	NA	5.0	5.0	0.00 <sup>9</sup>	0.00 <sup>9</sup>
<b>CN05</b>	0.00 <sup>9</sup>	0.00 <sup>9</sup>	NA	0.0 <sup>9</sup>	0.0 <sup>9</sup>	0.00 <sup>9</sup>	0.00 <sup>9</sup>
<b>CN06</b>	0.05	0.00 <sup>9</sup>	NA	5.0	5.0	0.00 <sup>9</sup>	0.00 <sup>9</sup>
<b>CN</b>							
<b>Mediana</b>	0.10	NA	NA	7.50	5.0	NA	NA
<b>Media ± DS</b>	0.11 ± 0.10	NA	NA	10.8 ± 9.7	8.3 ± 7.5	NA	NA
<b>Rango</b>	0.0 – 0.25	NA	NA	0.0 – 25.0	0.0 ± 20.0	NA	NA
<b>CV<sup>8</sup></b>	89.6	NA	NA	89.6	90.3	NA	NA

Fuente: datos experimentales obtenidos de la prueba de fragilidad cromosómica.  
NF<sup>1</sup> = Nivel de fractura, No. de fracturas/célula. Se considera positivo el resultado de la prueba de fragilidad cromosómica mediante el test MMC cuando el nivel de fractura es  $\geq 1$  fracturas/célula, ver anexo No. 4; NF Espontáneas<sup>2</sup> = corresponde al NF presente en las células observadas en ausencia de MMC; <sup>3</sup>Relación entre el nivel de fractura con MMC/nivel de fractura sin MMC; % Fracturas Cromosómicas<sup>4</sup>; proporción de fracturas cromosómicas expresadas en No. de fracturas/No. de células observadas x 100; % Células con fracturas<sup>5</sup>; No. de células con fracturas/No. de metafases observadas x 100; % Formaciones Radiales<sup>6</sup>; proporción de formaciones radiales expresadas en No. de formaciones radiales/No. de células observadas x 100; % Células con Formaciones radiales<sup>7</sup>; No. de células con formaciones radiales/No. de metafases observadas x 100 CV<sup>8</sup> = coeficiente de variación; <sup>9</sup>No se observó ninguna anomalía cromosómica.

## VIII. DISCUSIÓN

La AF es una enfermedad genética con heterogeneidad clínica, por lo cual su diagnóstico se dificulta (Cervenka, Arthur y Yasis, 1981). Al realizar el test de MMC en los 13 pacientes incluidos en el estudio se confirma la AF en 9 casos. La edad de los 9 casos confirmados se encuentra en un rango de 6 – 14 años (mediana = 9 años, media = 9.1 años y  $DS = \pm 2.47$ ). La mediana y la media de la edad en los casos confirmados es muy cercana y por lo tanto, el comportamiento de la edad de los casos confirmados es bastante homogéneo. Al comparar la edad promedio de los pacientes confirmados con AF en el presente estudio (9.1 años) y la reportada por Wajnrajch y colaboradores (2001) se observa cercanía entre los valores presentes en las dos poblaciones (media = 8.6 años).

Se observó mayor predominio del sexo masculino en los casos confirmados, con una razón del sexo masculino sobre el femenino de 3.5, la cual es muy similar a la relación de 3.0 reportada por Sagaseta y colaboradores (2003). Los casos confirmados en su mayoría son originarios de la región metropolitana del país, probablemente porque los pacientes tienen mejor acceso a la atención con médicos especialistas, lo cual permite un adecuado diagnóstico de los mismos. No se observó ningún patrón importante en cuanto al lugar de origen.

Las anomalías congénitas presentes en los casos confirmados se presenta en la tabla 3 y se comparan con otros estudios en la tabla del anexo 5. Aunque los 9 casos confirmados no constituyen una muestra estadísticamente significativa de la población guatemalteca, es posible comparar la frecuencia porcentual de diferentes grupos estudiados de pacientes con AF y la frecuencia encontrada en el presente estudio. El estudio de Esmer y Colaboradores (2004) reporta las anomalías presentes en 12 casos de AF y corresponde al estudio con el número de casos más cercano al número descrito en el presente estudio, sin embargo los porcentajes reportados no revelan cercanía entre sí.

Se observa que las anomalías en la piel se presentaron en los 9 casos confirmados (100%), incluyendo la hiperpigmentación generalizada o localizada y la presencia de manchas café con leche. El estudio de Talmoudi y colaboradores presenta el porcentaje más alto de anomalías en la piel (93.7%) y por consiguiente, el más cercano a la frecuencia porcentual observada en el presente estudio. Se observa que la microsomía y las anomalías esqueléticas se presentan en 7 casos (78%) y 6 casos (67%) respectivamente. Al comparar los porcentajes de la microsomía y las anomalías esqueléticas se observa que son muy parecidos a las frecuencias porcentuales reportadas por Glanz y Fraser de 77% y 66% respectivamente (Talmoudi et al, 2013).

Las anomalías cardíacas y la microftalmia se presentaron en 6 casos (67%), sin embargo al comparar con los otros estudios no se observó correlación entre las frecuencias porcentuales reportadas. Las anomalías cardíacas se encuentran relacionadas sobre todo a nivel de los tabiques interventriculares, tabiques interauriculares y válvulas. Se observó que 4 pacientes presentaron soplo cardíaco de grado II/VI y III/VI, 2 presentaron insuficiencia cardíaca congestiva y 3 taquicardia. El caso 07 presentó levocardia sin presencia de otro hallazgo clínico. La levocardia no se menciona como parte de las anomalías cardíacas frecuentes en AF (Sagasetta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003; Auerbach, 2009).

El número de casos con microcefalia es de 4 (44%) siendo la frecuencia porcentual muy parecida a la reportada por Auerbach y colaboradores (44.1%). Las anomalías renales se presentaron en 2 casos confirmados y correspondiente al 22%, el porcentaje conserva similitud con los estudios de Faivre y colaboradores (22%), Alter y Young (21%) y Taniguchi y D'Andrea (21%) (Talmoudi et al, 2013; Faivre et al, 2000).

Se estima que las endocrinopatías se encuentran presentes hasta en el 81% de los casos pediátricos estudiados, en el presente estudio el caso 07 es el único que presenta una endocrinopatía (hipotiroidismo). El hipotiroidismo y la microsomía

podrían estar asociados en el caso 07, ya que la microsomía se presenta con frecuencia en los pacientes con AF y se encuentra asociada a hipotiroidismo, a insuficiencia de la hormona del crecimiento y a resistencia de la acción de la hormona del crecimiento, sin embargo la etiología no se conoce con certeza (Wajnrajch et al, 2001; Sagasetta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003).

La pancitopenia con una edad promedio de inicio de 7 años, es un sello característico de la AF. La pancitopenia se presentó en los 9 casos confirmados, ya que se observa deterioro de todas las líneas celulares como consecuencia del fallo medular progresivo, originado por el incremento de la apoptosis en las células hematopoyéticas (Tabla 2). El fallo medular es el responsable de la astenia, anorexia, infecciones recurrentes y hemorragias frecuentes, así como la primera causa de muerte. Los casos 01 y 03 fallecieron como consecuencia del fallo medular, el primero falleció por neumonía y el segundo por hemorragia cerebral (Niedernhofer, Lalai y Hoeijmakers, 2005; Tischkowitz y Hodgson, 2003; Sagasetta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003). En los casos confirmados de AF no se presentó ninguna malignidad, sin embargo el seguimiento minucioso de los pacientes es importante para la detección temprana del cáncer y la selección de la terapia menos perjudicial para el paciente (Elier, Frohnmayer, D., Frohnmayer, L., Larsen y Ownen, 2008).

Esmer y colaboradores (2004) establece que el nivel de fractura cromosómica inducida por la MMC en los linfocitos de sangre periférica de los pacientes con AF, debe encontrarse al menos entre 3 a 10 veces más que el nivel de fractura del control normal. El nivel de fractura inducido por la MMC en los 9 casos confirmados es de 30.7 a 102.7 veces más con relación a los controles y por lo tanto, sobrepasa el valor establecido por Esmer y colaboradores (2004) para el diagnóstico de la AF.

El porcentaje de fracturas cromosómicas en los casos confirmados fue de 317.5 a 800.0% con una media de  $570.9 \pm 176.0\%$ , lo que representa un promedio de 5.7 fracturas por célula. Cervencka, Arthur y Yasis (1891) reportan un porcentaje

medio de fracturas cromosómicas de  $574.4 \pm 369.5\%$  para 50 ng/mL MMC, siendo este porcentaje muy cercano al encontrado en el presente estudio.

El porcentaje de formaciones radiales y el porcentaje de células con formaciones radiales se encuentran por debajo del 50% en los casos de AF, debido que la concentración de MMC utilizada en el estudio no tiene la capacidad de inducir un alto número de formaciones radiales. Se observa que las formaciones radiales aumentan cerca de 50 veces más en concentraciones cercanas a 80 ng/mL de MMC (Cervencka, Arthur y Yasis, 1981).

En 3 de los casos confirmados, el porcentaje de células con fracturas fue del 100%. Mientras que los otros 6 casos (67%) presentaron un porcentaje entre 83.5 y 97%, sugiriendo la presencia de 2 poblaciones de linfocitos, una sensible a la MMC más predominante y una resistente en menor cantidad. El análisis detallado del porcentaje de células con fracturas permite detectar la presencia de mosaicismo somático hematopoyético. En estos 6 casos el diagnóstico de la AF no fue afectado por el mosaicismo porque la población de linfocitos sensibles a la MMC es mucho mayor en relación a la población resistente (Cervencka, Arthur y Yasis, 1981).

El mecanismo exacto del mosaicismo somático hematopoyético que tiene lugar en el 10 – 25% de los pacientes con AF puede variar, sin embargo uno de los mecanismos descritos es la recombinación mitótica en las células progenitoras de la médula ósea, resultando en la presencia de ambas mutaciones en el mismo alelo mientras que el otro alelo es totalmente funcional. Otro mecanismo sugerido es la reversión genética espontánea y la corrección funcional de la mutación como un resultado secundario a la alteración de la secuencia en *cis*. Ambos mecanismos confieren cierta ventaja a las células progenitoras hematopoyéticas, las cuales posteriormente pueden repoblar la médula ósea y mejorar la hematopoyesis. Sin embargo, esto también puede dificultar el diagnóstico en aquellos pacientes donde la proporción de células resistentes a la MMC es mucho mayor que la población sensible (Tischkowitz y Hodgson, 2003; Oostra, Nieuwint, Joenje y Winter, 2012).

## **IX. CONCLUSIONES**

1. Se confirmó la anemia de Fanconi en 9 (9/13) pacientes con diagnóstico clínico.
2. El nivel de fractura de los casos confirmados se encontró en un rango de 3.38 a 11.30 fracturas/célula.
3. El rango de edad de los pacientes con anemia de Fanconi es de 6 a 14 años (media = 9.1; DS =  $\pm$  2.47 años).
4. La relación del sexo masculino sobre el femenino es de 3.5 a 1.
5. Las anormalidades de la piel y el fallo medular se presentaron en el 100% de los casos confirmados.
6. No se confirmó la presencia de malignidades en los casos confirmados.
7. El mosaicismo somático hematopoyético se presentó en 6 (67%) casos confirmados y la población celular sensible a la MMC es la más predominante.



## **X. RECOMENDACIONES**

1. Realizar la prueba de fragilidad cromosómica en fibroblastos de la piel en los pacientes negativos para el test de MMC y con posible mosaicismo somático hematopoyético, para confirmar el diagnóstico de anemia de Fanconi.
2. Realizar estudios de secuenciación para determinar el gen afectado y la mutación específica causante de la anemia de Fanconi. Así como la detección del estado de heterocigocidad en los familiares de los pacientes afectados.
3. Realizar el árbol genealógico de los pacientes confirmados con anemia de Fanconi para identificar posibles casos de la enfermedad en la familia y posteriormente confirmar la patología mediante pruebas de fragilidad cromosómica.
4. Realizar estudios con nuevos casos encontrados de anemia de Fanconi.
5. Dar seguimiento clínico a los casos confirmados de anemia de Fanconi.

## XI. REFERENCIAS

- Alter, B. y Kupfer, G. (2011). Fanconi Anemia. *US National Library of Medicine National Institutes of Health (NCBI)*. Recuperado el 7 de Diciembre de 2011, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401>
- Auerbach, A. D. (2009). Fanconi Anemia and its Diagnosis. *Mutat Res* , 668 (1-2), 668-683.
- Bagby, G. C. (2006). The less-traveled Fanconi road. *Blood*, 107 (11), 4196.
- Barch, M., Knusen, T. y Spurbeck, J. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. USA: Lippincott-Raven Publishers.
- Cervencka, J., Arthur, D. y Yasis, C. (1981). Mitomycin C test for diagnostic differentiation of Idiopathic Aplastic Anemia and Fanconi Anemia. *Pediatrics*, 67(119), 119-127.
- Deviren, A., Yalman, N. y Hacıhanefioglu, S. (2003). Differential diagnosis of Fanconi anemia by nitrogen mustard and diepoxybutane. *Ann Hematol*, s.v. (83), 223.
- Elier, M. E., Frohnmayer, D., Frohnmayer, L., Larsen, K. y Ownen, J. (2008). *Anemia de Fanconi: Lineamientos para el diagnóstico y manejo* (3ra edición). Oregon, EEUU: Fanconi Anemia Research Fund.
- Esmer, C., Sánchez, S., Ramos, S., Molina, B., Frias, S. y Carnevale A. (2004). DEB test for Fanconi Anemia detection in patients with atypical phenotypes. *AJMG*, s.v. (124A), 35 – 39.
- Faivre, L., Guardiola, F., Lewis, C., Dokal, I., Ebell, W., Zatterale, A., Altay, C., Poole, J., Stones, D., Kwee, M., Weel-Sipman, M., Havenga, C., Morgan, N., Winter, J., Digweed, M., Savoia, A., Pronk, J., Ravel, T., Jansen, S., Joenje, H., Gluckman, E. y Mathew, C. (2000). Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. *Blood*, 96(13), 4064 - 4070
- Frohnmayer, L., y Frohnmayer, D. (2000). Fanconi Anemia: Una manual para las familias y sus médicos. Oregon, Estados Unidos: *Fanconi Anemia Research Fund, Inc.* 17p.

- Giri, N., Batista, D. L., Alter, B. P. Y Stratakis, A. S. (2007). Endocrine Abnormalities in Patients with Fanconi Anemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 92 (7), 2624-2631.
- Joenje, H., y Patel, K. (2001). The Emerging genetic and molecular bases of Fanconi anaemia. *Nature Reviews Genetics*, 2 (6), 446-457.
- Kim, Y., Lach, F.P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A.D. y Smogorzewska, A. (2011). Mutations of *SLX4* gene in Fanconi anemia. *Nature Genetics*, 43 (2), 142.
- Lavaut, K., Jaime, F., Nuñez, A., Pavón, V., Hernández, P., y Machín, S., (2008). Uso de la prueba de rupturas cromosómicas en el estudio de la anemia de Fanconi. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, sn (sv), 1-7.
- Niedernhofer, L. J., Lalai, A. S. y Hoeijmakers, J. H. (2005). Fanconi Anemia (Cross) Liked to DNA repair. *Cell Review* , 123 (7), 1191-1198.
- Oostra, A. B., Nieuwint, A. W., Joenje, H., Winter, J. P. (2012). Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal breakage analysis. *Anemia*, sn (2012), 1- 9.
- Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., McGuffog, L., Hanks, S., Evans, D. G., Eccles, D., Easton, D. F. y Stratton, M. R. (2007). *PALB2*, wich encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*, 39(2), 165.
- Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, S., Wurm, M., Batish, S. D., Lach, F. P., Yetgin, S., Neitzel, H., Ariffin, H., Tischkowitz, M., Mathew, C. G., Auerbach, A. D. y Rahman, N. (2007). Biallelic mutations in *PALB2* cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nature Genetics*, 39 (2), 162.
- Sagaseta, M., Molina, J., Lezáun, I., Valiente, A. y Durán, G. (2003). Anemia de Fanconi. Consideraciones actuales. *Anales de sis navarra*, 26 (1), 63-76.
- Shimamura, A., Montes, R., Svenson, J. L., Haining, N., Moreau, L. A., Nathan, D. G. y D'Andrea, A. D. (2002). A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi Anemia pathway. *Blood* , 100 (13), 4649-4654.

- Stoepker, C., Hain, K., Schuster, B., Hilhorst-Hofstee, Y., Rooimans, M. A., Steltenpool, J., Oostra, A. B., Eirich, C., Korthof, E. T., Nieuwint, A. W., Jaspers, N. G., Bettecken, T., Joenje, H., Schindler, D., Rouse, J. y Winter, J. P. (2011). SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nature Genetics*, 2 (2), 138-143.
- Talmoudi, F., Kammoun, L., Benhalim, N., Torjemane, L., Ouederni, M., Aissaoui, L., Lakhal, A., Mellouli, F., Othmen, T., Bejaoui, M., Abdelhak, S., Meddeb, M., Dellagi, K., Hdiji, S., Amouri, A., y el grupo de estudio de Turkia de Anemia de Fanconi. (2013). Cytogenetic Assessment of Fanconi Anemia in Children with Aplastic Anemia in Tunisia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 0 (0),1-4
- Taniguchi, T. y D'Andrea, A. D. (2006). Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: Recent progress. *Blood*, 107 (11), 4223-4232.
- Temtamy, S. A., Ismail, S. R., El Beshlawy, A. M., Mohamed, A. M., Kotb, S. M., y Eid, M. M. (2007). Fanconi Anemia: Cytogenetic and clinical studies on a group of Fanconi anemia patients in Egypt. *Haema*, 10 (2-3), 165-162.
- Tischkowitz, M. y Hodgson, S.V. (2003). Fanconi Anemia. *J Med Genet*, 40 (s.n.), 1-10.
- Thompson, L. H. (2005). Unraveling the Fanconi anemia-DNA repair connection. *Nature Genetics*, 37 (9), 921.
- Tulpule, A., Lensch, M.W., Miller, J.D., Austin, K., D'Andrea, A., Schlaeger, T. M., Shimamura, A. y Daley, J. Q. (2010). Knockdown of Fanconi anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. *Blood*, 115(17), 3453-3462.
- Wajnrajch, M., Gertner, M., Huma, Z., Popovic, J., Lin, K., Verlander, P., Batish, S., Giampietro, P., Davis, J., New, M. y Auerbach, A. (2001). Evaluation of Growth and Hormonal Status in Patients Referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*, 107 (4), 744-754
- Wang, W. (2007). Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature reviews genetics*, 8 (10), 735-748.
- Xia, B., Dorsman, J.C., Ameziane, N., Vries, Y., Rooimans, M.A., Sheng, Q., Pals,

G., Errami, A., Gluckman, A., Llera, J., Wang, W., Livingston, D. M., Joenje, H. y Winter, J. P. (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature Genetics*, 39 (2), 159.

## **XII. ANEXOS**

### **Anexo 1: Consentimiento Informado**

#### **Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas –INVEGEM–**

##### **Consentimiento informado para pruebas citogenéticas**

**Título:**

“Descripción de casos de anemia de Fanconi encontrados en Guatemala”

**Investigador:**

**Swanny Valeska Villagran Herrarte**

Laboratorio de Citogenética

Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas

–INVEGEM–

---

El presente documento es un consentimiento informado que le brindará a usted y su familia información importante sobre el presente estudio. Puede que el documento contenga palabras que usted no entienda. Por favor pregunte al investigador encargado o a cualquier personal del estudio para que le explique cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente. Usted puede llevarse a su casa una copia de este consentimiento informado para pensar sobre este estudio o para discutir con su familia o amigos antes de tomar la decisión de participar en él.

#### **INTRODUCCIÓN**

Su hijo o hija ha sido invitado a participar en un estudio de investigación. Antes de que usted decida la participación de su hijo o hija en el estudio, por favor lea este consentimiento informado cuidadosamente. Haga todas las preguntas que usted tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y los beneficios.

#### **PROPÓSITO DEL ESTUDIO**

El propósito del presente estudio describir los casos de anemia de Fanconi confirmados mediante el análisis de fragilidad cromosómica por el test Mitomicina C, en pacientes referidos por hematólogos y que cumplan con los criterios de inclusión establecidos. Además de la confirmación de la enfermedad por pruebas genéticas específicas, el presente estudio permitirá el adecuado monitoreo de mi hijo/hija, toma

de decisiones importantes su tratamiento y pronto asesoramiento genético de los miembros mi familia.

## **PARTICIPANTES**

### *Criterios de Inclusión*

Pacientes guatemaltecos con diagnóstico clínico de anemia de Fanconi que cumplan con al menos 1 de los siguientes criterios:

- iv. Fenotipo de Anemia de Fanconi
- v. Anemia Aplásica
- vi. Tener un hermano con diagnóstico confirmado de anemia de Fanconi por el Test de Mitomicina C (Auerbach, 2009; Sagasetta, Molina, Lezáuan, Valiente y Durán, 2003).

Con el fin de identificar la existencia de fragilidad cromosómica, el presente estudio requiere la participación de su hijo o hija, ya que reúne los criterios de inclusión para colaborar con el estudio. **La participación de su hijo o hija es completamente voluntaria y puede abandonar el estudio en cualquier momento sin ser penalizado.**

## **PROCEDIMIENTOS**

El cumplimiento de uno o más de los criterios de inclusión indican que su médico sospecha que su hijo o hija puede tener anemia de Fanconi, por lo tanto se procede a la extracción de sangre periférica. La extracción se llevará a cabo mediante la técnica estándar de venopunción, a través de la cual se extraerá como mínimo 4 mL de sangre. La muestra de sangre será trasladada al Laboratorio de Citogenética de INVEGEM en donde se realizará el análisis cromosómico de fragilidad.

## **RIESGOS**

Los riesgos de la venopunción son mínimos y generalmente se relacionan a hematomas en el lugar de punción, los cuales no representan un riesgo para la salud de su hijo o hija y desaparecen en pocos días, sin necesidad de tratamiento. Además puede causar dolor, mareos y en raras ocasiones infecciones.

## **BENEFICIOS**

En caso de ser negativo el análisis de fragilidad cromosómica, es probable que su hijo o hija no reciba ningún beneficio personal por participar en este estudio. Sin embargo, si el resultado es positivo, el médico tratante podrá monitorearlo

correctamente y brindarle el tratamiento más seguro y adecuado. Además, posteriormente a un resultado positivo se realizará la prueba de fragilidad cromosómica para los miembros de su familia en la misma línea de consanguinidad, sin ningún costo.

Sin importar el resultado del análisis, se le entregará una copia de los resultados como evidencia del análisis efectuado en el estudio.

## **COSTOS**

La participación en el estudio no tiene ningún costo.

## **PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD**

Si usted elige la participación de su hijo o hija en este estudio, el investigador del estudio conseguirá información personal sobre el o ella. Esto puede que incluya la información que puede identificarle. El investigador puede también conseguir información sobre su salud incluyendo, expedientes médicos actuales y del pasado que pueden incluir resultados de laboratorios, placas o exámenes físicos o tomar fotografías para documentar la presencia de anomalías congénitas.

Los resultados de esta investigación pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en las reuniones médicas, pero su identidad no será divulgada. La información de su salud será mantenida tan confidencial como sea posible bajo la ley. Esta autorización servirá hasta el final del estudio, a menos que usted la cancele antes. Usted puede cancelar esta autorización en cualquier momento enviando un aviso escrito al Investigador Principal:

### **Br. Swuanny Valeska Villagran Herrarte**

Laboratorio de Citogenética

Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas –INVEGEM–

Teléfono: (502) 4214-1428

E-mail: villaswua29@gmail.com

Si usted cancela esta autorización, el Investigador Principal no usará ni divulgará la información personal de su hijo o hija ni la de su salud. Esta información sólo se divulgará en caso que se necesite la información personal de su salud para preservar la integridad científica del estudio.

La autorización para el uso y el acceso de la información protegida de la salud para los propósitos de la investigación es totalmente voluntaria. Sin embargo, de no firmar este documento usted no podrá participar en este estudio. Si en el futuro usted cancela esta autorización, su hijo o hija no podrá continuar participando del estudio.

## **PARTICIPACIÓN Y RETIRO VOLUNTARIOS**



La participación de su hijo o hija en este estudio es voluntaria. Usted puede decidir si su hijo o hija participa o no del estudio en cualquier momento, su decisión no resultará en ninguna penalidad. De ser necesario, su participación en este estudio puede ser detenida en cualquier momento por el investigador o por el patrocinador sin su consentimiento.

## **PREGUNTAS**

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio o sobre la participación de su hijo o hija puede contactar a:

**Br. Swuanny Valeska Villagran Herrarte**

Laboratorio de Citogenética

Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas –INVEGEM–

Teléfono: (502) 4214-1428

E-mail:

villaswua29@gmail.com

No firme este consentimiento a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer preguntas y recibir contestaciones satisfactorias para todas sus preguntas.

Si usted firma, aceptando la participación de su hijo o hija en este estudio, recibirá una copia del consentimiento con su firma, el sello de aprobación de INVEGEM y la fecha.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Señores  
Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas  
INVEGEM

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos) con cédula de vecindad o DPI  
\_\_\_\_\_ he sido infirmado/a sobre la participación de mi hijo/hija en el  
proyecto "Descripción de casos de anemia de Fanconi encontrados en Guatemala" en el que  
se tomará una muestra de sangre periférica para la realización de las pruebas necesarias. El  
resultado de la prueba de fragilidad cromosómica contribuirá para la confirmación del  
diagnóstico, monitoreo y tratamiento adecuado de la enfermedad.

El procedimiento de extracción de sangre periférica constituye un procedimiento  
seguro para la salud y sin complicaciones importantes o que afecten la integridad física de  
mi hijo/hija. Autorizo el uso de la muestra de sangre periférica de mi hijo/hija para la presente  
investigación y otras investigaciones que contribuyan a conocer más sobre el  
comportamiento y tratamiento de la enfermedad.

Y por lo tanto, otorgo mi consentimiento para la extracción de sangre periférica y uso  
del resultado de la prueba de fragilidad cromosómica de mi hijo/hija  
\_\_\_\_\_ para  
la presente investigación. Comprendo que los datos pueden ser publicados en revistas  
científicas o ser presentados en reuniones médicas, pero la identidad de mi hijo/hija no será  
divulgada.

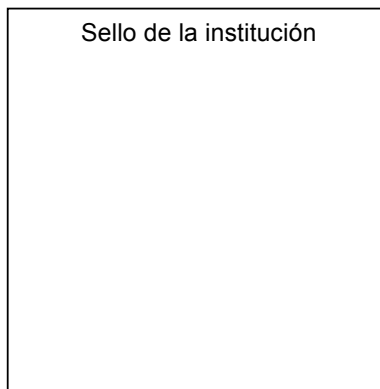
Fecha: \_\_\_\_\_

Firma de los padres y/o responsables: \_\_\_\_\_

Firma del niño si este es mayor de 7 años: \_\_\_\_\_

Firma del médico/persona que realizó la extracción: \_\_\_\_\_

Sello de la institución





### **Anexo 3: Estandarización prueba de fragilidad cromosómica mediante el test de Mitomicina C (MMC)**

#### **A. Principio de la prueba de fragilidad cromosómica:**

La deficiente reparación del ADN en pacientes con anemia de Fanconi, hace que la velocidad de fractura se incremente dramáticamente por el uso de clastógenos como la Mitomicina C, en comparación con personas normales o pacientes con otros síndromes similares. Por lo tanto, la observación del incremento del nivel de fracturas cromosómicas en el test de MMC, permite realizar el diagnóstico diferencial entre anemia de Fanconi y otras patologías (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997).

#### **B. Materiales**

##### **1. Equipo**

- a. Cámara fotográfica
- b. Campana de flujo laminar
- c. Centrifuga
- d. Congeladores
- e. Incubadora de cultivo celular
- f. Microscopio óptico
- g. Pipetas de volúmenes variables
- h. Refrigeradores
- i. Secadora
- j. Vórtex

##### **2. Reactivos**

- a. Ácido Acético Glacial
- b. Cloruro de Potasio
- c. Colcemid (Sigma Chemical)

- d. Colorante Giemsa
- e. Estreptomina (Sigma)
- f. Etanol
- g. Fitohemaglutinina-M (Gibco)
- h. Heparina Sódica (Sigma)
- i. L-Glutamina (Sigma)
- j. Medio RPMI 1640 (Sigma)
- k. Metanol
- l. Mitomicina C
- m. Penicilina (Sigma)
- n. Suero Fetal Bovino (Gibco)
- o. Tripsina
- p. Solución de Hank's

### **3. Instrumentos**

- a. Balanzas
- b. Cronómetro

### **4. Otros**

- a. Algodón
- b. Filtros de 20 nm
- c. Frascos con tapa de rosca de 1 L y 500 mL
- d. Jeringas
- e. Papel Absorbente
- f. Papel aluminio
- g. Pipetas Pasteur
- h. Portaobjetos
- i. Puntas de 10, 100 y 1000 uL
- j. Tubos al vacío con Heparina Sódica
- k. Tubos de 1.5 y 0.5 mL
- l. Tubos graduados de 15 mL

m. Tubos graduados de 50 mL

### **C. Estandarización del método:**

Estandarización por ensayo y error de las condiciones óptimas de análisis:

- 1) Cantidad óptima de muestra
- 2) Cantidad óptima de reactivos
- 3) Concentración óptima de MMC

#### **1. Toma de muestra:**

La muestra de sangre periférica se obtiene posteriormente de la firma del consentimiento informado por el paciente y en caso de ser menor de edad, el consentimiento será firmado por el padre o tutor del menor (Ver Anexo 1 y 2). Se obtiene como mínimo 4 mL de muestra de sangre periférica de los pacientes referidos de los hematólogos, para realización de cultivo celular de los linfocitos. La muestra debe colocarse en tubos al vacío con heparina sódica y deben transportarse el mismo día al laboratorio a temperatura ambiente para su procesamiento.

#### **2. Cultivo celular de linfocitos de sangre periférica:**

- a. Se preparan 4 tubos de medio de cultivo por paciente, 2 corresponden a la muestra de sangre periférica del paciente y 2 corresponden a la muestra del control normal. Agregar 1 mL de la sangre periférica correspondiente a cada uno de los tubos con medio de cultivo previamente preparado. El medio contiene medio RPMI-1640, L-glutamina, estreptomina, penicilina, suero fetal bovino, heparina sódica y fitohemaglutinina. Los tubos deben incubarse a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

- b. Agregar la Mitomicina C (MMC) a las 24 horas de cultivo a uno de los 2 tubos del paciente y del control normal e incubar por 48 horas más, bajo las mismas condiciones.
- c. Cumplidas las 72 horas de cultivo realizar la cosecha (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997).

### **3. Cosecha:**

- a. Exponer las células a Colcemid para romper el huso mitótico.
- b. Posteriormente tratar con solución hipotónica (Kcal) para provocar la lisis celular.
- c. Por último, realizar lavados con FIX (ácido acético: metanol 1:3) para eliminar impurezas y fijar las metafases.

### **4. Goteo (Dropping):**

Dejar caer sobre portaobjetos limpios la solución resultante de la cosecha en forma de gotas, tomando en cuenta factores de humedad, ángulo del portaobjeto y temperatura (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997).

### **5. Tinción de Bandas G**

- a. Colocar el portaobjeto en el Reactivo de Hank's
- d. Colocar en Giemsa al 4% por 5 minutos
- e. Lavar con agua destilada (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997).

### **6. Control de calidad:**

Para llevar a cabo un adecuado control de calidad se cultivarán de manera simultánea cuatro tubos:

- a. Tubo de sangre del paciente sin MMC

- b. Tubo de sangre del paciente con MMC
- c. Tubo de sangre de sujeto control normal sin MMC
- d. Tubo de sangre de sujeto control normal con MMC

Todos los tubos recibirán las mismas condiciones de cultivo, cosechado, dropping y tinción (Stoepker et al., 2011). El control normal es un individuo sano que no presenta ninguno de los criterios de inclusión del estudio y no se encuentran emparentados con los casos ni entre sí.

#### **D. Análisis citogenético:**

El análisis citogenético consiste en observar bajo el microscopio un mínimo de 20 metafases por cultivo, para determinar el número, tipo y distribución de las roturas cromosómicas en cada célula. Para determinar la fragilidad cromosómica en presencia de MMC se evaluará el nivel de fractura de la siguiente manera:

$\geq 1.0$  fracturas o lagunas (gaps)/célula: es considerado positivo

$\leq 0.5$  fracturas o lagunas (gaps)/célula: es considerado negativo

0.5 – 1.0 fracturas o lagunas (gaps)/célula: se reporta como negativo y se incluye una nota aclaratoria indicando que los resultados están cerca del punto de corte y debe ser repetido el análisis (Barch, Knusen y Spurbeck, 1997).



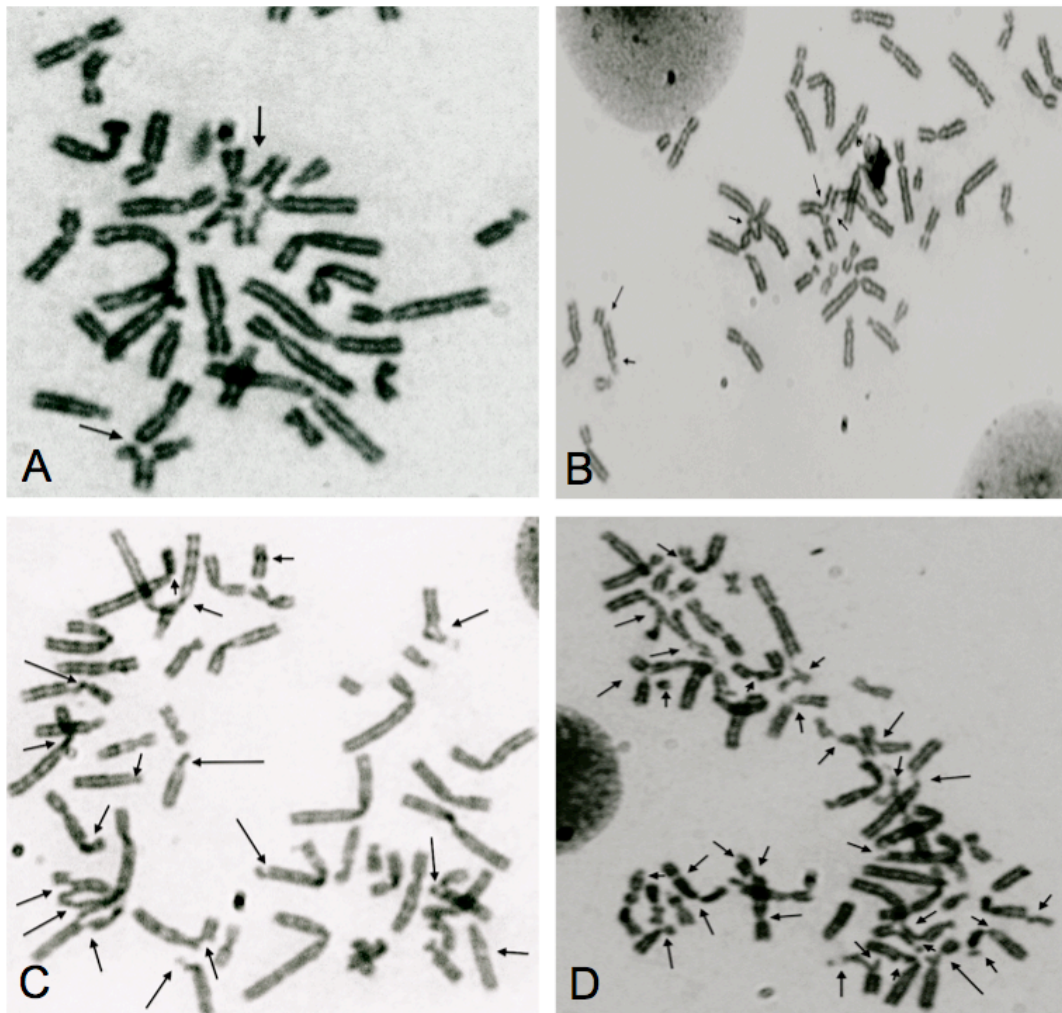
**Anexo 4:** Descripción detallada de los casos de Anemia de Fanconi confirmados por el test de MMC

**1) Caso clínico 01**

Paciente masculino de 7 años, primogénito, originario de Gualán, Zacapa. Consulta al médico por infección intestinal, con antecedentes de hemorragias gingivales, anorexia y letargo. Al examen físico presenta bajo peso para su edad (10.9 kg), microsomía (96 cm), microcefalia, microftalmia, facies dismórficas, hiperpigmentación generalizada, hirsutismo, ausencia bilateral de pulgares, soplo cardíaco grado II/VI y taquicardia. El ultrasonido renal muestra riñones en forma, tamaño y ecogenicidad normal.

La hematología muestra recuento leucocitario 2.62 K/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), recuento eritrocitario 4.79 M/uL (V.R. 4.5 -5.0 x 10<sup>6</sup>/uL), hemoglobina 8.90 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL), hematocrito 24.40 (V.R. 36 - 50%) y plaquetas 10.61 K/uL (V.R. 150 -500 K/uL). Se realizó aspirado de médula ósea y el frote revela presencia de pancitopenia. Impresión clínica anemia de Fanconi por lo que se realiza prueba de fragilidad cromosómica mediante el test de MMC, con resultado positivo para el test.

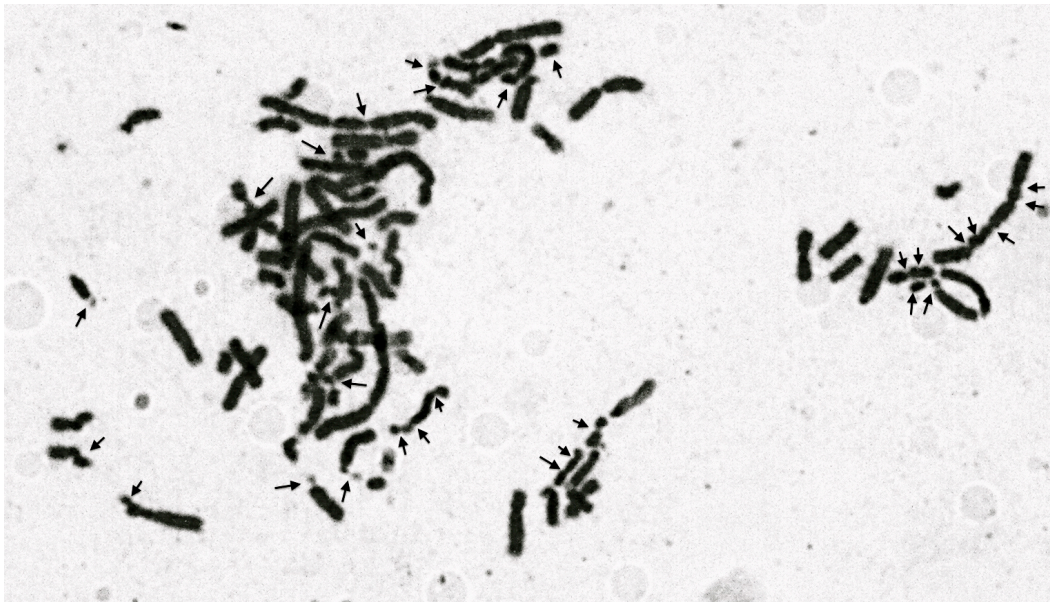
Se realiza seguimiento mediante consultas mensuales con el hematólogo y transfusiones sanguíneas mensuales por los recuentos hematológicos bajos. Tratamiento con prednisona de 20 mg/día. El paciente fallece el día 11 de marzo de 2013 como consecuencia de neumonía.



**Fotografía 1:** Rupturas cromosómicas en el paciente 01 en presencia de MMC. **A.** Se observa una formación compleja y un trirradio roto. **B.** Se muestran una formación compleja, un trirradio roto y rupturas cromosómicas. **C y D.** Se muestran formaciones complejas, fracturas, rupturas y trirradios.

## 2) Caso clínico 02

Paciente masculino de 11 años de edad, originario de Joyabaj, Quiché. No se tienen antecedentes familiares y clínicos por presencia de barrera lingüística y vive en un hogar temporal. Paciente con facies dismórficas, microcefalia, hiperpigmentación generalizada, abundantes pecas en el rostro, microsomía (1.20 m), anomalías en los pulgares. La hematología revela recuentos leucocitarios 2.07 K/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), hemoglobina 8.90 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL) y plaquetas 275 K/uL (V.R. 150 -500 K/uL). El frote de médula ósea revela hipoplasia medular. Se realiza prueba de fragilidad cromosómica con un resultado positivo al test. El paciente no recibe tratamiento y sigue en estudio pero se pierde contacto con él.

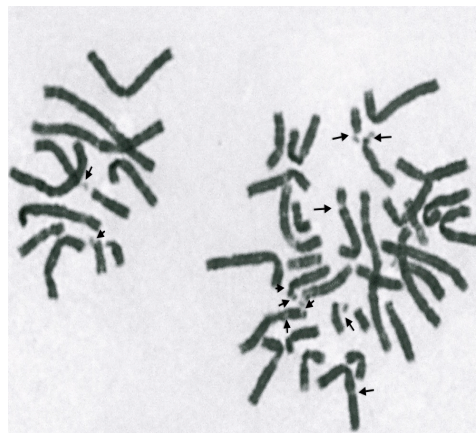


**Fotografía 2:** Fracturas y rupturas cromosómicas en la metafases del paciente 02 en presencia de MMC.

### 3) Caso clínico 03

Paciente masculino de 7 años de edad originario de Escuintla. Con antecedentes de varios eventos hemorrágicos. Al examen físico muestra facies dismórficas, normocefalia, microftalmia, lesiones hipocrómicas en el cuello, antebrazo normal, pulgares con implantación adecuada, verrugas en manos, onicomicosis en uñas de las manos, resequedad en la piel, manchas café con leche en tronco, escasas regiones hiperocrómicas de aproximadamente 2 cm de diámetro, una en la nariz y las demás distribuidas en espalda y miembros inferiores, con signos de insuficiencia cardíaca congestiva, hepatomegalia leve, petequias en miembros superiores e inferiores y equimosis en miembros inferiores.

La hematología revela recuento leucocitario de 3.05 K/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), recuento eritrocitario 3.22 M/uL (V.R. 4.5 -5.0 x 10<sup>6</sup>/uL), hemoglobina 11.10 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL), hematocrito 29.80 (V.R. 36 - 50%) y plaquetas 8.0 K/uL (V.R. 150 - 500 K/uL). El frote de médula ósea muestra anemia aplásica. El ultrasonido renal revela implantación anormal superior de uno de los riñones. Se realiza prueba de fragilidad cromosómica, mostrando resultado positivo para el test. Tratamiento con metilprednisona 30 mg/día y transfusiones. El paciente fallece a finales del primer semestre de 2013, por hemorragia cerebral.

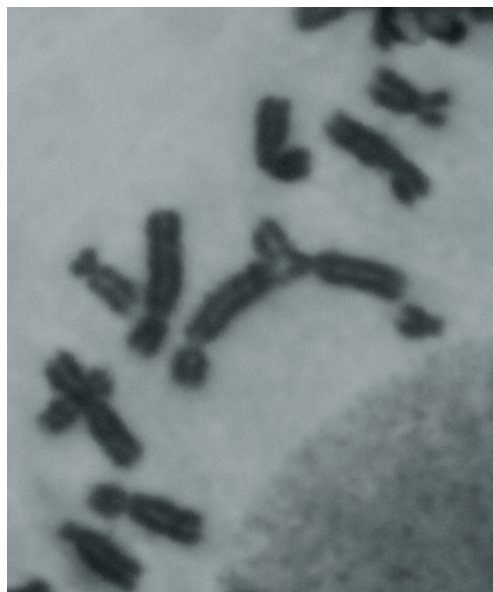


**Fotografía 3:** Fracturas y rupturas cromosómicas en la metafase del paciente 03 en presencia de MMC.

#### 4) Caso clínico 04

Paciente masculino de 9 años de edad, primogénito, originario de la ciudad de Guatemala. Consulta por hemorragia gingival de 4 horas de evolución y fiebre de 3 días y fue referido de hospital privado por impresión clínica de proceso linfoproliferativo. Al examen físico muestra facies dismórficas, microftalmia, hiperpigmentación facial, hirsutismo, normocefálico, mucosas pálidas, caries dental, verrugas vulgares en manos y pies, asimetría de pulgares con luxación, machas café con leche de  $\pm$  3 cm en abdomen y espalda, soplo cardíaco presente, sin organomegalias. El ultrasonido renal muestra riñones en forma, tamaño y ecogenicidad normal.

La hematología muestra recuento leucocitario 4.37 k/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), recuento eritrocitario 2.71 M/uL (V.R. 4.5 -5.0 x 10<sup>6</sup>/uL), hemoglobina de 8.90 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL), hematocrito 26.20 (V.R. 36 - 50%) y plaquetas 56 K/uL (V.R. 150 -500 K/uL). El frote periférico muestra anemia dismórfica con predominio de hipocromía. La impresión clínica del frote de médula ósea es hipocelularidad compatible con anemia aplásica y se descarta proceso linfoproliferativo. Se realiza prueba de fragilidad cromosómica con resultado positivo. Tratamiento 30 mg/día de prednisona y 25 mg/día de proviron y transfusiones.



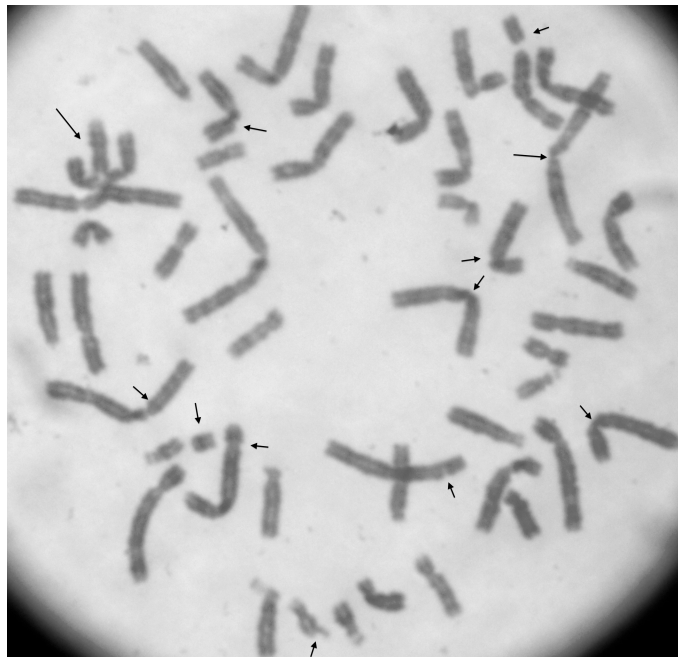
**Fotografía 4:** Se observa un trirradio en la metafase del paciente 04 ante la exposición a MMC.

#### 5) Caso clínico 05 y 06

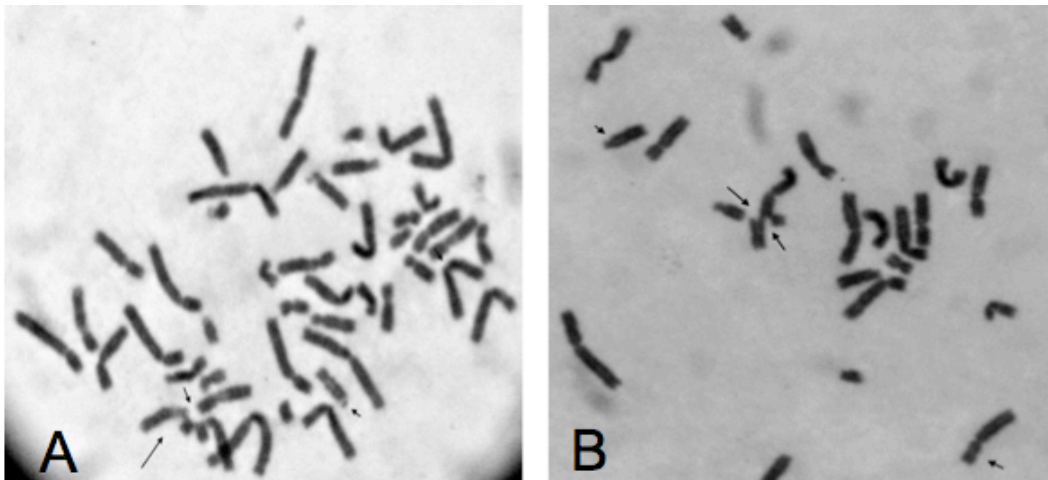
Caso 05, paciente femenina de 10 años de edad, originaria de Amatlán. Madre consulta por astenia, adinamia, fatiga, dificultad para caminar, falta de apetito y palidez generalizada. Al examen físico muestra facies dismórficas, normocefalia, petequias generalizadas, hiperpigmentación generalizada, lesiones hiperqueratósicas en labio inferior y mano izquierda, verrugas en pies, labio y dedos, taquicardia, soplo homosistólico grado II/VI, signos de insuficiencia cardíaca congestiva, no presenta endocrinopatías.

En la hematología se muestran recuentos bajos, leucocitos 1.94 K/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), recuento eritrocitario 1.00 M/uL (V.R. 4.5 -5.0 x 10<sup>6</sup>/uL), hemoglobina 3.50 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL), hematocrito 9.70 (V.R. 36 - 50%) y plaquetas 30.0 K/uL (V.R. 150 -500 K/uL). El frote de médula ósea revela anemia aplásica. Se realiza prueba de fragilidad cromosómica con resultado positivo. Se da tratamiento con 5 mg/día de prednisona y transfusiones.

Posteriormente, se realiza evaluación a hermano menor de la paciente (caso 06), por presentar similitudes fenotípicas. Paciente masculino de 6 años, muestra facies dismórficas compatibles con anemia de Fanconi, hiperpigmentación generalizada. La hematología muestra recuento leucocitario de 4.36 K/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), recuento eritrocitario 3.88 M/uL (V.R. 4.5 -5.0 x 10<sup>6</sup>/uL), hemoglobina de 12.40 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL), hematocrito 33.40 (V.R. 36-50%) y plaquetas de 86.0 K/uL (V.R. 150 -500 K/uL). El frote sanguíneo muestra una impresión clínica de anemia aplásica. Se realiza prueba de fragilidad cromosómica dando positivo para el test. Paciente sin tratamiento y sigue en estudio.



**Fotografía 5:** Se observa una serie de fracturas y rupturas cromosómicas en la metafase del paciente 05 en presencia de MMC, además de una formación compleja entre varios cromosomas.



**Fotografía 6:** **A.** Se observa un tetrarradio roto en la metafase del paciente 06 en presencia de MMC. **B.** Se observa un trirradio roto en la metafase. **C.** Se observa un trirradio en la metafase.

#### 6) Caso clínico 07

Paciente masculino de 10 años de edad originario de San Juan Sacatepéquez. Consulta por hematemesis de 1 día de evolución en 4 ocasiones, epistaxis y con antecedentes de hipotiroidismo desde hace 4 años y anemia. Al examen físico presenta microsomía (talla 1.10 m), nariz afilada, hiperpigmentación generalizada, hipoplasia de pulgares. Presenta retraso del desarrollo, crecimiento y de lenguaje y desnutrición proteico calórica. El paciente presenta levocardia con ecocardiograma normal.

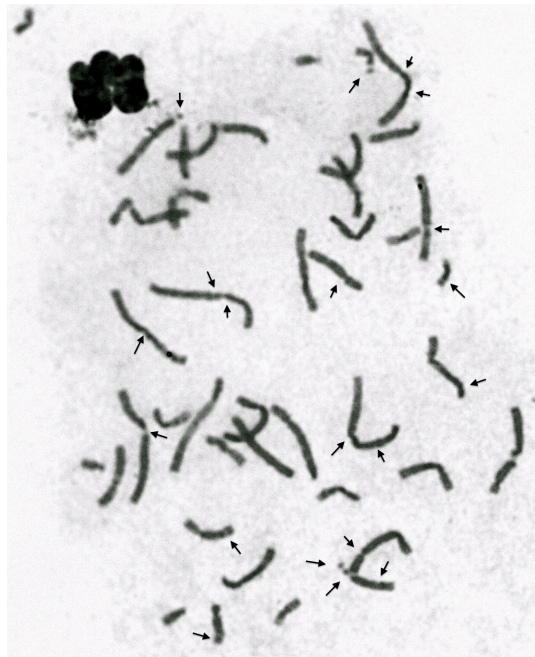
El centellograma tiroideo muestra tiroides irregular, ligeramente aumentada de tamaño a expensas del glóbulo derecho, con captación heterogénea, sin evidencia de modularidad, disminución generalizada de la captación por la glándula, principalmente por el lóbulo izquierdo, impresión clínica: bocio de grado I.

La hematología muestra recuentos celulares bajos, leucocitos 2.82 K/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), recuento eritrocitario 1.74 M/uL (V.R. 4.5 -5.0 x 10<sup>6</sup>/uL),



hemoglobina 6 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL), hematocrito 17.20 (V.R. 36 - 50%) y plaquetas 46 K/uL (V.R. 150 -500 K/uL). El frote periférico muestra deterioro hematológico de las 3 líneas celulares, compatible con pancitopenia. La impresión clínica del frote de médula ósea es hipoplasia medular. Se realiza prueba de fragilidad cromosómica dando positivo para el test.

El valor de las hormonas tiroideas es T<sub>3</sub> total 122.78 ng/dL (V.R. 79 – 149 ng/dL), T<sub>4</sub> libre 0.70 ng/dL (V.R. 0.70 – 1.85 ng/dL) y TSH 5.65 mUI/mL (V.R. 0.490 – 4.670 mUI/mL). La hormona adrenocorticotropica AM (ACTH) 20.20 pg/mL (V.R. 0-46 pg/mL) y cortisol AM 11.20 ug/dL (V.R. 5. – 25 ug/dL). El tratamiento administrado es prednisona 10 mg/día, levotiroxina 25 mg/día y transfusiones cuando fuese necesario.

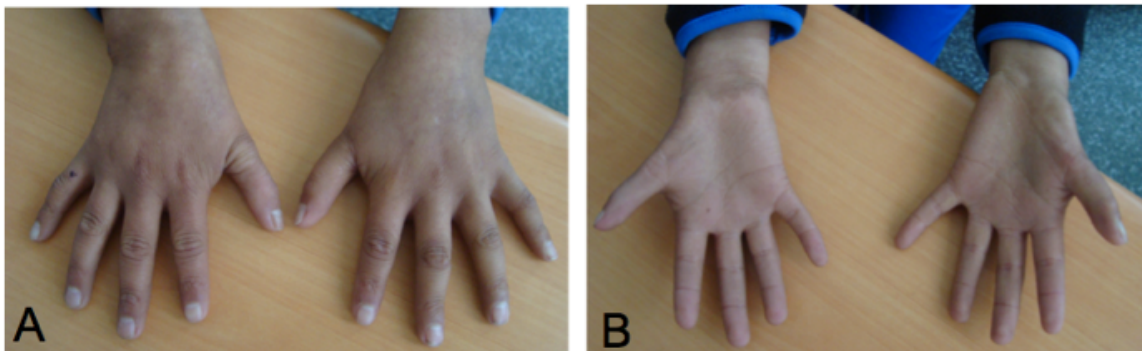


**Fotografía 7:** Se observa una serie de fracturas y rupturas cromosómicas en la metafase del paciente 07 en presencia de MMC.

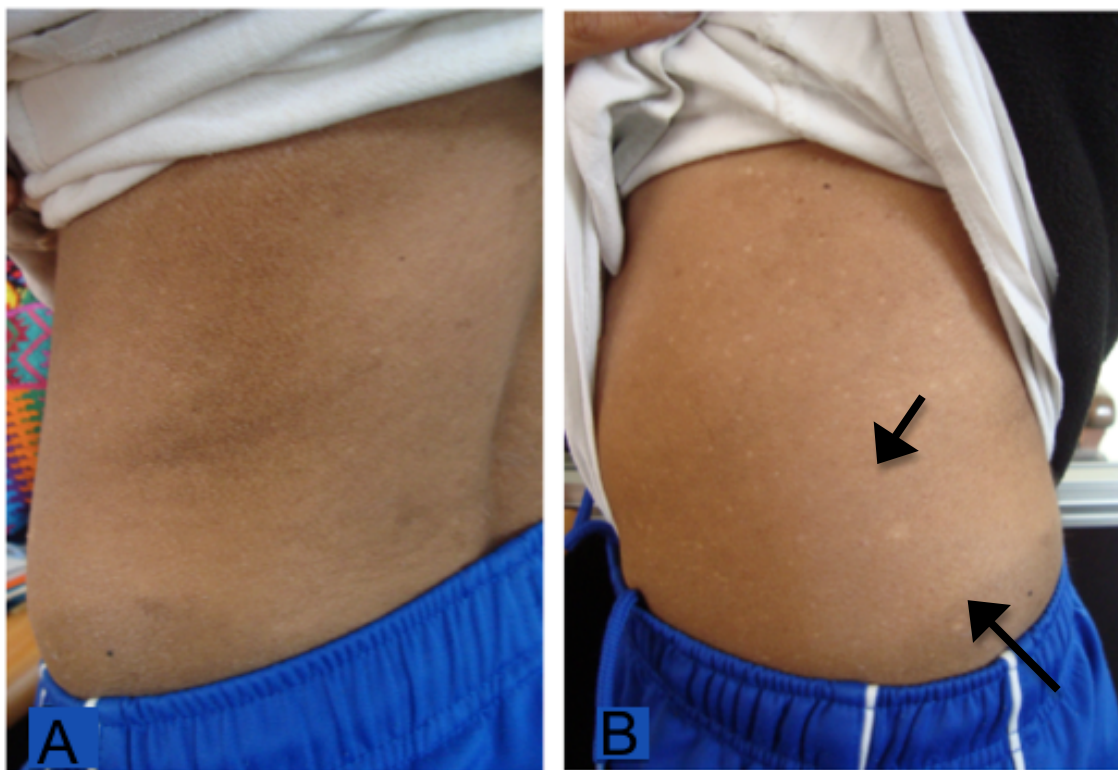
## 7) Caso clínico 08

Paciente masculino de 14 años de edad, originario de Totonicapán. Al examen físico presenta facies dismórficas, microcefalia, microftalmia, implantación baja de las orejas, pulgares hipoplásicos con implantación anormal, manchas café con leche principalmente en espalda y abdomen, zonas de hiperpigmentación en varias regiones del cuerpo, microsomía, riñones en posición anormal.

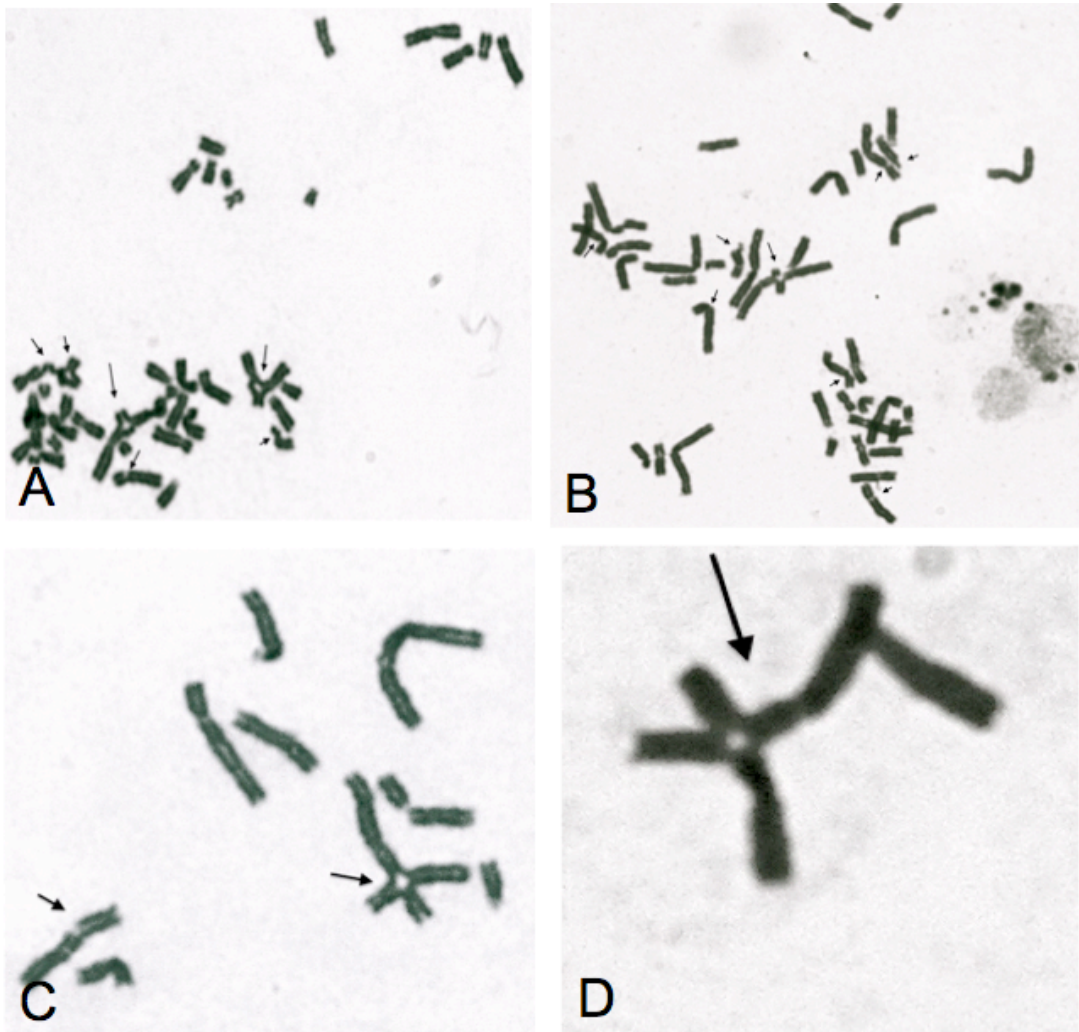
En la hematología el recuento leucocitario es de 2.7 K/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), recuento eritrocitario 2.22 M/uL (V.R. 4.5 -5.0 x 10<sup>6</sup>/uL), hemoglobina de 8.6 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL), hematocrito 27.1 (V.R. 36-50%) y plaquetas 41 K/uL (V.R. 150 -500 K/uL). En el análisis del frote de médula ósea se muestra anemia aplásica. Se realiza prueba de fragilidad cromosómica con resultado positivo. Tratamiento con esteroides y se realizan transfusiones cuando son necesarias.



**Fotografía 8:** **A.** Vista dorsal de las manos del paciente 08, se muestra implantación inadecuada de los pulgares. Asimismo, se observa regiones de hiperpigmentación principalmente a nivel de la muñeca de mano derecha. **B.** Vista palmar muestra nuevamente la inadecuada implantación de los pulgares y anomalías en los pliegues de ambas mano.



**Fotografía 9: A y B.** Presencia de zonas de hiperpigmentación e hipopigmentación en abdomen y espalda.

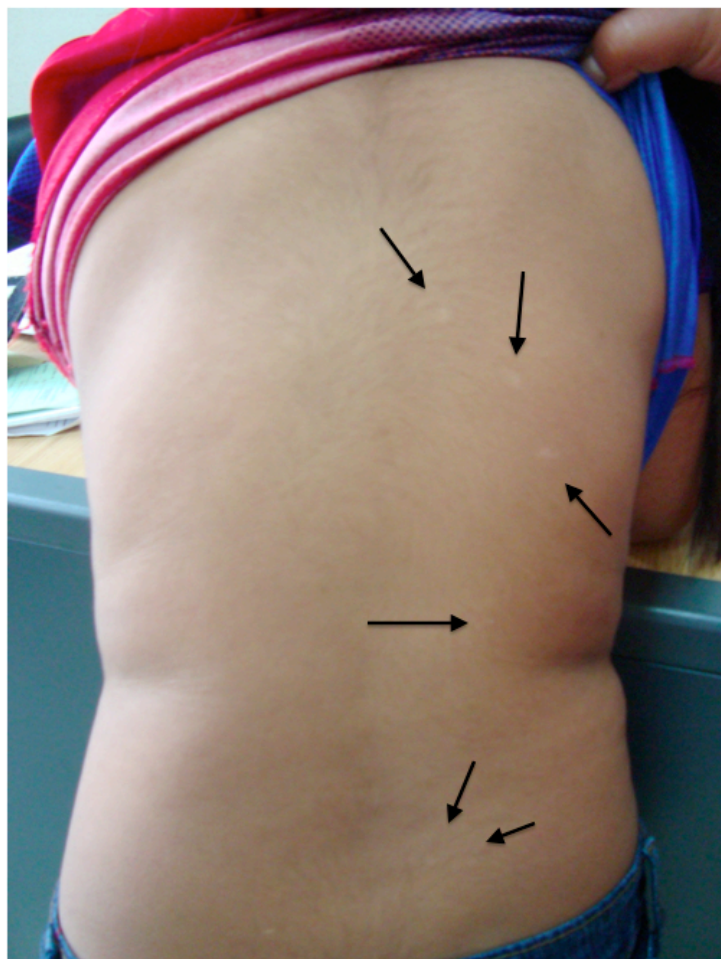


**Fotografía 10:** **A.** Se observa un tetrarradio y dos trirrradio en la metafase del paciente 08 en presencia de MMC, además de varias rupturas. **B.** Se observa un tetrarradio roto y varias rupturas en la metafase. **C.** Se observa un tetrarradio perfectamente formado y una ruptura en la metafase. **D.** Se observa un tetrarradio perfectamente formado.

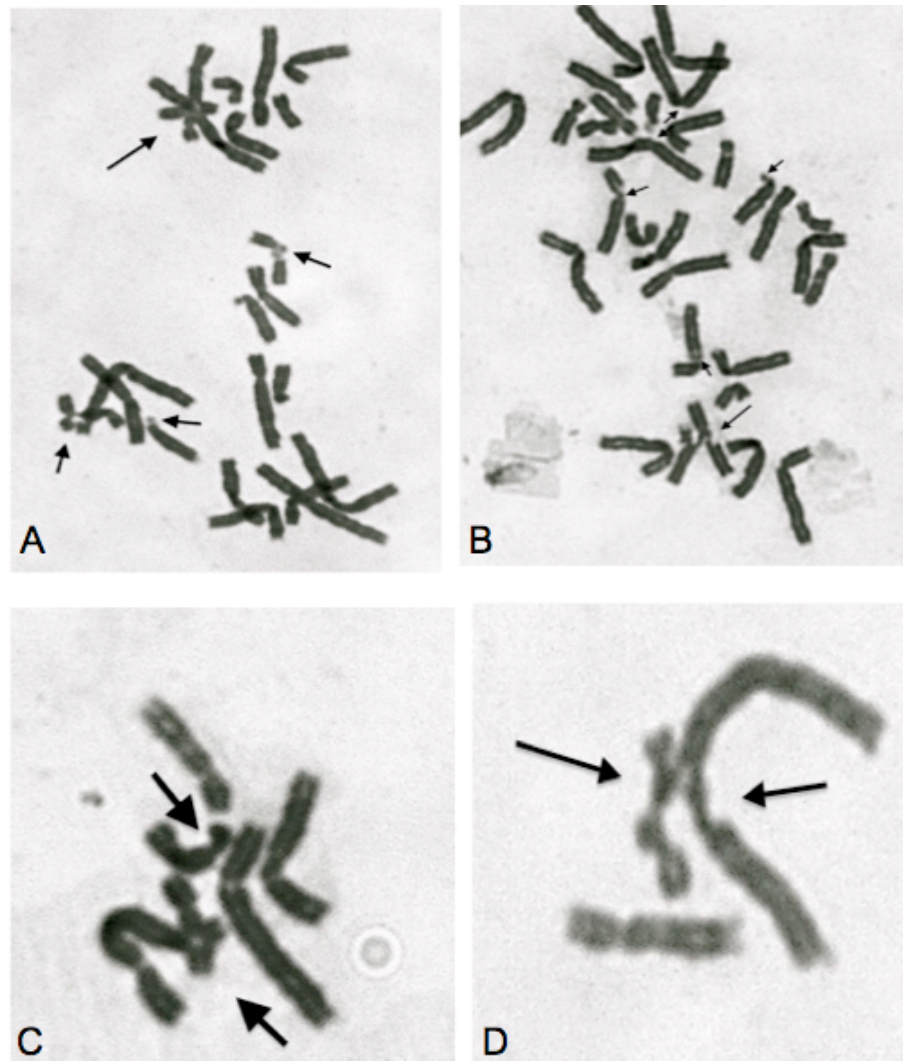
## 8) Caso clínico 09

Paciente femenino de 8 años de edad, originaria de la Aldea Chillani, San Pedro Sacatepéquez. La paciente consulta por epistaxis de escasa cantidad y vómito con abundantes coágulos, con antecedentes de hemorragia gingival, equimosis y petequias. Al examen físico muestra facies dismórficas, microftalmia, microcefalia, hiperpigmentación en rostro y tronco, escasas manchas café con leche en tronco, petequias en tórax anterior, microsomía, soplo cardíaco grado III/VI, taquicardia, abdomen globoso, luxación congénita de cadera y asimetría en miembros inferiores. El ultrasonido renal muestra riñones en forma, tamaño y ecogenicidad normal.

En la hematología los valores se encuentran por debajo del límite inferior, recuento leucocitario 4.22 K/uL (V.R. 5.0 – 10.0 K/uL), recuento eritrocitario 3.20 M/uL (V.R. 4.5 -5.0 x 10<sup>6</sup>/uL), hemoglobina 11.30 g/dL (V.R. 12.0 – 16.0 g/dL), hematocrito 32.9 (V.R. 36-50%)y plaquetas 17.0 K/uL (V.R. 150 -500 K/uL). Presencia de anemia aplásica. Se realiza prueba de fragilidad cromosómica con resultado positivo. La paciente se encuentra en tratamiento con prednisona.



**Fotografía 11:** Se observan zonas de hipopigmentación en la espalda de la paciente 09 y una zona de hiperpigmentación en la parte media de la espalda del lado derecho.



**Fotografía 12:** **A.** Se observa dos estructuras complejas y rupturas en la metafase del paciente 09 en presencia de MMC. **B.** Se observa un tetrarradio roto y varias rupturas en la metafase. **C.** Se observa un tetrarradio perfectamente formado y una ruptura en la metafase. **D.** Se observa una estructura compleja rota.

### Anexo 5: Recopilación de estudios realizados en pacientes con AF

**Tabla 4:** Anormalidades clínicas en pacientes con AF

Referencia	Anormalidades (%)						
	AP <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	AE <sup>3</sup>	AC <sup>4</sup>	MO <sup>5</sup>	MC <sup>6</sup>	AR <sup>7</sup>
Glanz y Fraser <sup>1</sup> (n=94)	73.0	<b>77.0</b>	<b>66.0</b>	<b>29.0</b>	14.0	37.0	32.0
Korgaonkar y colaboradores <sup>1</sup> (n=33)	45.5	81.8	48.5	9.1	3.0	NA	27.3
Giampietro y colaboradores <sup>1</sup> (n=377)	63.5	62.3	49.1	NA	<b>43.5</b>	NA	33.8
Auerbach y colaboradores <sup>1</sup> (n=202)	58.4	60.9	81.2	15.8	38.1	<b>44.1</b>	35.1
Dokal <sup>1</sup>	64.0	63.0	71.0	13.0	38.0	NA	34.0
Rosenberg y colaboradores <sup>1</sup> (n=144)	NA	72.9	12.5	18.8	NA	NA	40.3
Alter y Young <sup>1</sup>	55.0	51.0	51.0	6.0	23.0	NA	<b>21.0</b>
Taniguchi y D'Andrea <sup>1</sup> (n=1206)	55.0	51.0	51.0	6.0	23.0	26.0	<b>21.0</b>
Frikha y colaboradores <sup>1</sup> (n=43)	86.0	65.0	53.0	0.0	NA	NA	44.0
Talmoudi y colaboradores <sup>1</sup> (n=166)	<b>93.8</b>	46.9	50.0	3.1	35.7	NA	28.1
Faivre y colaboradores <sup>2</sup> (n=246)	71.0	58.0	18.0	10.0	NA	56.0	<b>22.0</b>
Esmer y colaboradores <sup>3</sup> (n=12)	83.0	91.0	58.0	NA	NA	NA	16.0
Presente estudio (n= 9)	<b>100</b>	<b>78.0</b>	<b>67.0</b>	<b>67.0</b>	<b>67.0</b>	<b>44.0</b>	<b>22.0</b>

Fuente: <sup>1</sup>(Talmoudi et al, 2013); <sup>2</sup>(Faivre et al, 2000)<sup>3</sup>(Esmer et al., 2004)

En negrilla se colocan las frecuencias porcentuales calculadas de los 9 casos confirmados y las frecuencias porcentuales más cercanas a los valores el presente estudio. AP<sup>1</sup>: Anormalidades de la piel; MS<sup>2</sup>: microsomía; AE<sup>3</sup>: anormalidades esqueléticas; AC<sup>4</sup>: Anormalidades cardiacas; MO<sup>5</sup>: microftalmia; MC<sup>6</sup>: microcefalia; AR<sup>7</sup>: anormalidades renales, EP<sup>8</sup>: endocrinopatías.