



# Anemia de Fanconi, Parte 1. Diagnóstico citogenético

## Fanconi anemia, Part 1. Cytogenetic diagnosis

Bertha Molina,<sup>1</sup> Sandra Ramos,<sup>1</sup> Sara Frias<sup>1,2</sup>

### Resumen

La anemia de Fanconi es una enfermedad rara, con una prevalencia de 1-5 por millón de habitantes; se origina por las variantes patogénicas, generalmente bialélicas, en uno de los 22 genes *FANC* que participan en la vía de reparación del DNA llamada FA/BRCA. El diagnóstico preciso es fundamental para un tratamiento y asesoramientos genéticos adecuados y oportunos. Esto se puede hacer mediante la prueba de aberraciones cromosómicas inducidas con diepoxibutano o mitomicina C, que es el estándar de oro para el diagnóstico de esta enfermedad. Este estudio citogenético se puede realizar en varios tipos de tejidos siempre que haya células en mitosis, como linfocitos de sangre periférica, células de la médula ósea, fibroblastos y amniocitos. Tanto los métodos de laboratorio para el diagnóstico, como el análisis de cromosomas pueden ser complejos y deben ser realizados e interpretados estrictamente por personal altamente especializado. Presentamos una guía que describe el protocolo citogenético utilizado con éxito en un laboratorio mexicano, durante más de 30 años.

**PALABRAS CLAVE:** Anemia de Fanconi; Diagnóstico citogenético; Diepoxibutano; Mitomicina C; Aberraciones cromosómicas; Figuras radiales; Roturas cromosómicas; Inestabilidad cromosómica

### Abstract

Fanconi anemia is a rare disease, with a prevalence of 1-5 per million inhabitants; It is caused by the pathogenic variants, usually biallelic, in one of the 22 *FANC* genes that participate in the FA/BRCA, DNA repair pathway. Accurate diagnosis is crucial for appropriate and timely management and genetic counseling. This can be done through the diepoxybutane or mitomycin C challenge chromosomal aberration test, which is the gold standard for the diagnosis of this disease. This cytogenetic study can be performed in various types of tissues as long as there are cells undergoing mitosis, such as peripheral blood lymphocytes, bone marrow cells, fibroblasts and amniocytes. Both laboratory settings for diagnosis and chromosome analysis can be complex and need to be tightly controlled and interpreted by highly specialized personnel. In this article, we present a step by step guide describing the cytogenetic protocol successfully used in a mexican laboratory, for more than 30 years.

**KEYWORDS:** Fanconi anemia; Cytogenetic diagnosis; Diepoxybutane; Mitomycin C; Chromosomal aberrations; Radial figures; Chromosomal breaks; Chromosomal instability

<sup>1</sup>Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México Investigadora en Ciencias Médicas D

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

### ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-6443-1665>

<https://orcid.org/0000-0003-3123-9869>

<https://orcid.org/0000-0002-3097-6368>

**Recibido:** 02 de octubre de 2021

**Aceptado:** 10 de febrero de 2022

### Correspondencia:

Sara Frias  
sarafrías@iibiomedicas.unam.mx

**Este artículo debe citarse como:** Molina B, Ramos S, Frias S. Anemia de Fanconi, Parte 1. Diagnóstico citogenético. Acta Pediatr Méx 2022; 43 (2): 102-28.

# Mucovibrol®

ambroxol

**Alivia la Tos**  
**Expulsa las Flemas**

**SOLUCIÓN EXPECTORANTE**  
**NO CONTIENE AZÚCAR**





MUCOFLUX® Salbutamol/Ambroxol Solución FORMA FARMACEUTICA Y FORMULACION: Cada 100 mL de solución contiene: Sulfato de Salbutamol equivalente a 0.040 g de Salbutamol, Clorhidrato de Ambroxol 0.150 g Vehículo Ctp. 100 mL Cada 5 mL contiene 2 mg de salbutamol y 7.5 mg de Clorhidrato de Ambroxol INDICACIONES TERAPEUTICAS: Mucolítico y broncodilatador. Bronquitis aguda, bronquitis crónica, bronquitis asmática, asma bronquial y en general, en todos aquellos procesos agudos y crónicos que cursen con retención de secreciones y broncoespasmo. CONTRAINDICACIONES: Pacientes con hipersensibilidad a salbutamol, aminas adrenérgicas o a alguno de los componentes de la fórmula. Pacientes con gastritis y úlcera gástrica; hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, tirotoxicosis, hipertiroidismo y enfermedad de Parkinson. PRECAUCIONES GENERALES: Salbutamol al igual que todas las aminas simpaticomiméticas, debe usarse con precaución en pacientes con enfermedades cardiovasculares, en particular con insuficiencia coronaria, arritmias cardíacas e hipertensión; al igual que en pacientes con trastornos convulsivos, hipertiroidismo y diabetes mellitus; y en sujetos que no responden a los  $\beta_2$  adrenérgicos. Se ha observado elevación significativa de las cifras de presión arterial en pacientes que reciben broncodilatadores  $\beta_2$  adrenérgicos. Salbutamol puede causar hipopotasemia transitoria, por secuestro intracelular, lo que aumenta la posibilidad de que ocurran eventos adversos cardiovasculares. Este efecto puede ser potencializado por la coadministración de xantinas, corticosteroides, diuréticos, digitálicos y por hipoxia. Se recomienda el monitoreo de los niveles séricos de potasio. La administración a dosis elevadas (por vía IV) puede causar hiperglicemia y cetoacidosis en diabéticos. PRECAUCIONES O RESTRICCIONES DE USO DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA: Los estudios realizados en animales no revelan efectos dañinos sobre el embarazo, desarrollo fetal, parto o desarrollo postnatal, atribuibles al efecto de ambroxol. No existe información sobre el uso de ambroxol durante el embarazo en humanos. En los estudios preclínicos salbutamol ha demostrado ser teratogénico en ratones y aumentar la incidencia de tumores benignos en ratas. No existen estudios controlados con salbutamol en pacientes embarazadas. Salbutamol se excreta por la leche materna, no así ambroxol. No se recomienda el uso de MUCOFLUX® en el embarazo y la lactancia, a menos que el médico tratante valore que el beneficio esperado para la madre sea mayor que el riesgo potencial para el feto. REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS: Ambroxol puede causar diarrea, náusea, vómito y cefalea. Salbutamol puede causar temblor fino en manos, nerviosismo, hiperactividad, irritabilidad, mareo, insomnio, midriasis, debilidad muscular; dichos efectos se relacionan con la dosis y son comunes para todos los estimulantes  $\beta$ -adrenérgicos. Se han reportado también: taquicardia, palpaciones, dolor precordial y diaforesis. Raramente se han reportado reacciones de hipersensibilidad incluyendo angioedema, urticaria, broncoespasmo, hipotensión y colapso. También calambres musculares. Muy raramente se ha reportado hiperactividad en niños; y arritmias cardíacas en pacientes susceptibles (fibrilación auricular, taquicardia supraventricular y extrasístoles). INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y DE OTRO GENERO: Los betabloqueadores interfieren con el efecto  $\beta$  agonista de salbutamol; sin embargo, en pacientes post infarto agudo de miocardio pueden utilizarse si no existen alternativas de uso aceptables. Salbutamol a dosis elevadas puede acentuar, por secuestro intracelular, la pérdida de potasio inducida por diuréticos no ahorradores del mismo. Los efectos cardiovasculares de salbutamol son potenciados por la coadministración con inhibidores de la MAO o antidepresivos tricíclicos, por lo que en caso de requerirse el uso de salbutamol debe hacerse con precaución extrema. Se ha observado disminución de los niveles plasmáticos de digoxina en sujetos tratados con salbutamol; se recomienda el monitoreo de dichos niveles en pacientes que reciban ambos fármacos. No se recomienda el uso concomitante de otro agente  $\beta_2$  adrenérgico de administración sistémica; sin embargo, se puede usar salbutamol en aerosol. El uso concomitante de halotano incrementa el riesgo de arritmias cardíacas malignas. PRECAUCIONES Y RELACION CON EFECTOS DE CARCINOGENESIS, MUTAGENESIS, TERATOGENESIS Y SOBRE LA FERTILIDAD: Los estudios en animales realizados no han demostrado que ambroxol o salbutamol a las dosis terapéuticas, provoquen alteraciones. DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION: Vía de administración: oral. Dosis: La siguiente tabla de dosificación está calculada con base en la dosis recomendada para salbutamol: (0.1 a 0.2 mg/kg/dosis, tres veces al día. Edad 2 a 4 años (12-16 kg) Dosis recomendada 3 mL c/8 horas Dosis máxima\* 6 mL c/8 horas; Edad >4 y < 6 años (16-22 kg) Dosis recomendada 4 mL c/8 horas Dosis máxima\* 8 mL c/8 horas; Edad >6 años y adultos Dosis recomendada 5 mL c/8 horas Dosis máxima\* 10 mL c/8 horas.\* Debido a que dosis excesivas pueden asociarse con eventos adversos, la dosis y frecuencia de administración únicamente pueden aumentar con base en la evolución clínica y a criterio del médico tratante. Indistintamente se podrá utilizar jeringa o vaso dosificador que cuenten con graduación de dosis SOBREDOSIFICACION O INGESTA ACCIDENTAL: MANIFESTACIONES Y MANEJO (ANTIDOTOS): Ambroxol: no hay reportes de manifestaciones sobredosificación. Se recomienda un tratamiento sintomático y de soporte. Salbutamol: El mejor antídoto para el tratamiento de sobredosis por salbutamol, es un agente  $\beta$ -bloqueador cardioselectivo. Sin embargo los  $\beta$ -bloqueadores deben utilizarse con precaución en pacientes con historia de broncoespasmo. Después de una sobredosis de salbutamol puede producirse hipopotasemia; los niveles séricos de potasio deben monitorearse. PRESENTACIONES: Caja con frasco con 120 mL (Adulto), pipeta o vaso dosificador. Caja con frasco con 60 mL (Infantil), pipeta o vaso dosificador. LEYENDAS DE PROTECCION: Contiene aproximadamente 10 por ciento de otros azúcares. Literatura exclusiva para médicos. No se use en el embarazo y la lactancia. No se deje al alcance de los niños. Su venta requiere receta médica. Hecho en México por: LABORATORIOS LIOMONT, S.A. DE C.V. Adolfo López Mateos Núm. 68 05000 México, D.F. © Marca registrada Reg. 521M2003 SSA IV ; Numero de ingreso:14330020C5242 Bibliografía: 1-IPPA; 2-Baeza; et al. Eficacia clínica de la combinación salbutamol-ambroxol-loratadina en el tratamiento de hiperreactividad bronquial en pacientes pediátricos. Alergia, asma e inmunología pediátrica. Vol. 15; num. 1 Ene-Abr. 2006; 3-Zuñiga; et al. Patologías obstructivas de la vía aérea: Crisis asmática. Neumología y cirugía de torax. Vol. 66 (4): 161-173. 2007

# Mucoflux®

Salbutamol + Ambroxol

## Antiasmático Mucolítico<sup>1</sup>

Acción expectorante y broncodilatadora<sup>1,2</sup>

Mejora la función mucociliar<sup>2</sup>

Suprime sibilancias, disnea y tos<sup>1,2</sup>



## INTRODUCCIÓN

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad genética rara con una prevalencia mundial de 1 a 5 por millón de habitantes. Los pacientes con AF presentan múltiples malformaciones congénitas, falla progresiva de la médula ósea y elevada predisposición a desarrollar leucemia y tumores sólidos. Las características fenotípicas más frecuentes son: talla baja, cambios en la pigmentación de la piel, alteraciones esqueléticas que incluyen ausencia, hipoplasia del eje radial y pulgar, malformaciones renales, genitales y oculares.<sup>1-3</sup> A nivel hematológico, la falla medular se presenta entre los 7 y 10 años de edad. Los pacientes pueden iniciar con citopenias hematológicas de cualquier linaje celular y progresar a pancitopenia. Las neoplasias se pueden presentar hasta en el 20% de los pacientes, las más comunes son la leucemia mieloide aguda, que se presenta en la adolescencia y los tumores de cabeza y cuello que se desarrollan generalmente en la edad adulta.<sup>3-5</sup>

A nivel celular, presentan inestabilidad genómica que se evidencia por una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas por agentes inductores de enlaces cruzados como la mitomicina C (MMC) o el diepoxibutano (DEB). Además, tienen hipersensibilidad a especies reactivas del oxígeno y aldehídos, un estado proinflamatorio por incremento del factor de necrosis tumoral alfa y arresto en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular.<sup>1</sup>

La AF es un síndrome con defecto en la reparación del DNA que se origina cuando uno de los 22 genes AF denominados *FANC* (*FANCA-FANCW*) presenta una variante patogénica.<sup>1,6-8</sup> La mayoría de los genes se heredan de manera autosómica recesiva, excepto *FANCB* que es ligado al X y *FANCR* (*RAD51*) que es autosómico dominante.<sup>9</sup>

De manera normal, las proteínas producidas por los genes *FANC* participan en la vía *FA/BRCA*,

encargada de coordinar la reparación de los enlaces covalentes cruzados (ICLs por sus siglas en inglés) del DNA mediante su detección, procesamiento y eliminación, para preservar la integridad genómica, la progresión del ciclo celular y la sobrevivencia celular.<sup>1,10,11</sup> Cuando esta vía no funciona, se presenta la AF, con incapacidad de reparar los ICLs, inestabilidad cromosómica e hipersensibilidad a la MMC y el DEB; esto se manifiesta como roturas principalmente cromatídicas y aberraciones cromosómicas complejas como las figuras radiales. La hipersensibilidad a la MMC y al DEB se ha utilizado desde hace mucho tiempo como el estándar de oro en el diagnóstico de la enfermedad.<sup>12,13</sup>

En AF, hasta en el 25% de los pacientes se presenta mosaicismo, que se define como la presencia de dos poblaciones celulares en un mismo organismo, una con una variante patogénica en un gen *FANC* y otra con reversión de la variante patogénica, por conversión génica, entrecruzamiento intragénico o por mutación en un segundo sitio en las células progenitoras hematopoyéticas. Las células revertantes son capaces de reparar el daño espontáneo e inducido, como las células normales.<sup>14</sup> Por lo anterior, en los mosaicos AF la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas con DEB o MMC son inferiores a las encontradas en los pacientes AF no-mosaicos, razón por la cual es sumamente relevante identificar los mosaicos cuando el cuadro clínico es muy sugestivo de AF.

Se han reportado casos con mosaicismo AF que presentan una densidad celular sanguínea estable o normalizada y algunos pacientes han sobrevivido hasta la edad adulta sin falla medular ni malignidad hematológica.<sup>14,15</sup> Sin embargo, es importante recordar que los tejidos no-hematopoyéticos generalmente siguen teniendo la variante patogénica original en los genes *FANC*, por lo que la corroboración de que es un paciente positivo a AF se hace en otro tejido, como fibroblastos de piel.

En América Latina, existen pocos países que realizan el diagnóstico citogenético de AF,<sup>16-18</sup> por lo que consideramos que sería de utilidad presentar la descripción del protocolo citogenético utilizado con éxito en nuestro laboratorio durante más de 30 años.

### **METODOLOGÍA CITOGENÉTICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE AF**

La hipersensibilidad de la AF a los agentes inductores de ICLs, ha permitido establecer una prueba diagnóstica de certeza que se basa en el análisis de aberraciones cromosómicas inducidas y que es capaz de identificar pacientes con variante patogénica en cualquiera de los genes *FANC*, con fenotipo AF clásico y no clásico e incluso pacientes que aún no han desarrollado la anemia, por lo que es el estándar de oro en el diagnóstico de AF.

Históricamente se han utilizado varios agentes inductores, dentro de los que destacan la MMC, DEB y cisplatino. A nivel internacional, la estrategia diagnóstica más recomendada y utilizada es la de inducción de daño cromosómico con DEB, debido a que genera menos variabilidad inter-individual en la frecuencia de daño cromosómico, es menos citotóxica y tiene una baja frecuencia de falsos positivos o falsos negativos.<sup>19-20</sup>

El diagnóstico citogenético de AF se puede realizar prenatalmente en células de vellosidades coriónicas de 9 a 12 semanas de gestación, en células de líquido amniótico obtenidas por amniocentesis de la 15 a la 12 semanas de gestación o en sangre fetal. Postnatalmente, se puede utilizar sangre periférica, médula ósea o fibroblastos de piel. Si se usa sangre periférica, se debe asegurar que el paciente no haya sido transfundido recientemente, ya que si existen células normales del donador se podría obtener un resultado no concluyente o un falso negativo.

Cuando el paciente es dependiente de transfusión, el diagnóstico se debe realizar en médula ósea o en fibroblastos de piel.

Mundialmente, existen algunas variaciones en la metodología del ensayo de aberraciones cromosómicas, principalmente varían, la concentración de los agentes inductores de ICLs y el tiempo de exposición. Algunos grupos, como el holandés, de manera simultánea estimulan los linfocitos con fitohemaglutinina y los tratan con 50, 150 y 300nM de MMC durante 72 hrs.<sup>21</sup> En contraste, Auerbach et al (2015) y Castela et al (2011) inicialmente estimulan la proliferación de linfocitos T y 24 h después agregan el DEB; el grupo de Auerbach trata a las células durante 48 o 72 h con 0.01 y 0.1 µg/mL mientras que el grupo de Castella limita la exposición de las células a 48 h con 0.1 µg/mL.<sup>19,20</sup> Nuestro grupo usa una sola concentración del agente, 40 ng/mL de MMC o 0.1 µg/mL de DEB durante 72 horas, la estimulación de linfocitos T se realiza simultáneamente con el tratamiento inductor de ICLs. A pesar de estas diferencias, todos los protocolos son eficientes en el diagnóstico.

En este trabajo, describiremos los protocolos para el diagnóstico citogenético de AF en sangre periférica, médula ósea, fibroblastos y amniocitos, que utilizamos en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría (México); el clastógeno de elección es el DEB. Estas técnicas aseguran la obtención de cromosomas de buena calidad y un número de metafases adecuado que permite hacer el análisis de aberraciones en 25 o 50 células.

#### **A) Diagnóstico en sangre periférica**

La sangre periférica es el tejido de elección para hacer el diagnóstico porque la toma de muestra es menos invasiva, el único requisito es que el paciente no haya sido transfundido o que los hemoderivados hayan sido leucodepletados.

Para realizar una correcta interpretación de los resultados del daño cromosómico en el paciente con sospecha de AF se deben incluir dos controles: a) un negativo con células de un individuo sano cuyos mecanismos de reparación son normales, por lo que son resistentes al DEB y su frecuencia de aberraciones cromosómicas es baja, b) un positivo con células de un paciente con AF (es conveniente que sea una línea linfoblastoide), con hipersensibilidad al DEB y una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas. El control positivo también nos indica la funcionalidad del agente clastogénico y contribuye a proporcionar un diagnóstico de certeza.

#### Muestras biológicas

Paciente con sospecha AF: 2-3 mL de sangre con heparina sódica.

Control negativo: 2-3 mL de sangre con heparina sódica de un individuo sano.

Control positivo: 2-3x10<sup>6</sup> de células de una línea linfoblastoide positiva a AF.

#### Reactivos

Medio A: RPMI o McCoy's con 1% de fito-hemaglutinina y de penicilina-estreptomycin [10,000U/mL-10,000µg/mL]

Medio B: RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado a 56°C por 30 minutos, 1% de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio [100 mM], penicilina-estreptomycin [10,000U/mL-10,000µg/mL] y glutamina [200mM]

Diepoxibutano (DEB) (1,3-butadiene diepoxide, 97%) [0.1 µg/mL]

Colcemida [1µg/mL] o colchicina [2µg/mL]

Solución hipotónica de KCl [0.075M]

Fijador Carnoy (Metanol:Ácido acético, 3:1)

Wright y Giemsa (Usar las soluciones que se usan para cariotipo)

#### Preparación del DEB

En tubo estéril colocar 20 mL de agua destilada estéril y 1 µL de DEB, mezclar y mantener a 4°C. Esta solución se debe preparar en el momento de sembrar los cultivos celulares y aunque el DEB es un inductor de enlaces cruzados altamente reactivo tiene una vida media de solo 3-4 días porque al estar en contacto con el agua, se hidroliza y pierde su actividad clastogénica.<sup>19,21</sup>

#### Cultivos celulares

1. Para realizar el diagnóstico de AF, simultáneamente se siembran cultivos de sangre periférica del paciente y del control positivo y negativo.
2. Sembrar 2 cultivos en tubos cónicos de 15 mL de cada una de las 3 muestras celulares de la siguiente manera: a) Paciente y control negativo: 0.5 mL de sangre + 4.5 mL de medio "A". Los cultivos proliferan bien sin suero fetal, debido a que se siembra sangre completa y llevan su plasma b) Control positivo: 1x10<sup>6</sup> en 5 mL de medio "B".

A un cultivo de cada muestra celular, agregar 10µL de solución de trabajo DEB para obtener una concentración final de DEB de 0.1µg/mL. Por cada muestra celular se tendrá un cultivo sin tratamiento que servirá para obtener la frecuencia espontánea de aberraciones cromosómicas y otro cultivo con DEB para determinar la frecuencia inducida de aberraciones cromosómicas.

3. Incubar todos los cultivos a 37°C durante 72 horas.

**Cosecha celular**

1. Para detener las células en metafase, agregar 50µL por cultivo de solución de colcemida [1µg/mL] o colchicina [2µg/mL], para obtener una concentración final de colcemida [0.01ug/mL] o colchicina [0.02µg/mL] en cada cultivo; incubar de 1-2 h a 37°C.
2. Centrifugar a 500g durante 10 min, desechando el sobrenadante cuidadosamente para evitar resuspender el paquete celular.
3. Agregar 8 mL de solución hipotónica a 37°C, resuspender e incubar por 15 min a 37°C.
4. Para fijar los cultivos, agregar 0.5 mL de fijador Carnoy a 4°C y resuspender por inversión.
5. Centrifugar a 500g durante 10 min, desechando el sobrenadante, resuspender el paquete celular, agregar 8 mL de fijador a 4°C, mezclar muy bien y centrifugar a 500g durante 10 min.
6. Repetir el paso 5 hasta obtener un paquete celular blanco y el sobrenadante transparente.

**Preparaciones para análisis de aberraciones cromosómicas**

1. Para hacer las preparaciones, se usan portaobjetos de vidrio de 25 por 75mm, limpios, húmedos y fríos. Dejar solo 1 mL de fijador en cada tubo, resuspender y colocar 3 o 4 gotas de la suspensión sobre el portaobjetos, evitando que las gotas se superpongan. Etiquetar y colocar el portaobjetos en una placa térmica a 50-60 °C por unos segundos hasta que la laminilla esté completamente seca.

2. Teñir las preparaciones con Wright y Giemsa durante 1 y 2 min respectivamente, enjuagar con agua corriente y dejar secar.
3. Analizar 25-50 metafases con y sin DEB del paciente, control negativo y positivo.

**B) Diagnóstico en médula ósea**

En muchas ocasiones, los pacientes con sospecha de AF son dependientes de transfusión debido a que tienen anemia severa, por lo que lo más adecuado es realizar el estudio de fragilidad cromosómica en médula ósea.

Se requiere una muestra de 2 mL de médula ósea heparinizada. Para el diagnóstico, la siembra, tratamiento con DEB, cosecha celular, elaboración de laminillas y el análisis de aberraciones cromosómicas se realiza de la misma manera que la sangre periférica.

**C) Diagnóstico en fibroblastos de piel**

Los fibroblastos de piel es el tejido de elección cuando los pacientes tienen una pancitopenia severa, cuando han sido transfundidos recientemente (sobre todo si los hemoderivados no están leucodepletados) o cuando se sospecha de un posible mosaico hematológico de AF. A diferencia de los linfocitos de sangre periférica o las células de médula ósea, los fibroblastos son más sensibles a los agentes inductores de ICLs, por lo que para el diagnóstico se utilizan dos concentraciones de DEB, 0.01 y 0.1 µg/mL.

**Muestras biológicas**

Paciente con sospecha AF: biopsia de piel de 5 mm de diámetro.

Control negativo: 2-3x10<sup>6</sup> fibroblastos de un individuo sano o de una línea celular AF genéticamente corregida.

Control positivo:  $2-3 \times 10^6$  de fibroblastos de una línea positiva a AF.

### Reactivos

Medio Amniomax (Gibco) o DMEM suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado durante 30 minutos a 56 °C, 1% de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio [100 mM], penicilina-estreptomicina [10,000U/mL-10,000µg/mL] y glutamina [200mM]

Tripsina [0.25%] /EDTA [0.1%]

Diepoxibutano (DEB) (1,3-butadiene diepoxide, 97%) [0.01 µg/mL y 0.1 µg/mL ]

Colcemida [1µg/mL] o colchicina [2µg/mL]

Solución hipotónica de KCl [0.050 M]

Fijador Carnoy (Metanol: Ácido acético, 3:1)

Wright y Giemsa (Usar las soluciones que se usan para cariotipo)

### Cultivos celulares

1. Tomar una biopsia de piel del paciente con sospecha de AF y transportar en medio de cultivo sin suplementar con 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina, [10,000U/mL-10,000µg/mL]). En la campana de flujo laminar (Bioseguridad 2) lavar la muestra con PBS, eliminar la grasa y el tejido conectivo y seleccionar la epidermis para cortarla en pequeños trozos o explantes. Colocar los explantes en una botella de cultivo de 75cm<sup>3</sup> con solo 2 mL medio Amniomax o DMEM para permitir que los explantes se adhieran al piso de la botella e incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

2. Al día siguiente, agregar 8 mL de medio Amniomax o DMEM e incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta que el cultivo alcance 75% de confluencia.

3. Levantar los fibroblastos con un tratamiento de tripsina [0.25%]/EDTA [0.1%] a 37°C durante 2 min, lavar con PBS dos veces.

4. Sembrar por triplicado 600,000 fibroblastos del paciente, control negativo y positivo en botellas de 75 cm<sup>3</sup> con 10 mL de medio. Incubar por 24 h.

5. Por muestra celular, se tendrán los siguientes cultivos:

- a) Cultivo sin tratamiento (Aberraciones cromosómicas espontáneas)

- b) Tratado con DEB [0.01 µg/mL] (Aberraciones cromosómicas inducidas)

- c) Tratado con DEB [0.1 µg/mL] (Aberraciones cromosómicas inducidas)

Agregar 2 µL de DEB para obtener una concentración final de [0.01 µg/mL] y 20 µL para una concentración final de [0.1 µg/mL].

6. Incubar hasta que los cultivos estén cercanos al 75% de confluencia y tengan suficientes células mitóticas (~ 48-72 h). Las células estarán en contacto con el DEB por dos o tres ciclos celulares.

En algunas ocasiones, las células con DEB crecen muy lento, por lo que lo más conveniente es remover el medio y agregar medio libre de DEB para promover la proliferación celular y que



a las 24 horas haya suficientes células mitóticas para realizar la cosecha. Por el contrario, cuando proliferan rápidamente y alcanzan el 100% de confluencia, generalmente no hay células mitóticas, por lo que es necesario levantar las células y sembrarlas en dos botellas de 75 cm<sup>3</sup> con 10 mL de medio libre de DEB para hacer la cosecha al día siguiente. Es importante mencionar que, en ambos casos, la cosecha debe realizarse 24 horas después de cambiar el medio debido a que solo ha pasado un ciclo celular y aún puede observarse el daño cromosómico inducido por el DEB; en caso contrario, debe repetirse el ensayo completo.

7. Agregar 50µL de colcemida [1µg/mL] o colchicina [2µg/mL], incubar 2-3 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
8. Eliminar el medio en todos los cultivos y levantar las células con tripsina [0.25%] / EDTA [0.1%] a 37°C durante 2 min. Lavar con PBS para eliminar la tripsina, centrifugar 10 min a 500 g.
9. Desechar el sobrenadante y agregar 8 ml de solución hipotónica a 37°C de KCl [0.050 M]. Incubar 20 min a 37°C.
10. Seguir los pasos 4-6 de la cosecha de linfocitos de sangre periférica.
11. La elaboración de laminillas y el análisis de aberraciones cromosómicas se realiza de la misma manera que la sangre periférica.

#### D) Diagnóstico en amniocitos

El diagnóstico prenatal es muy importante para conocer la salud fetal y en caso de portar alguna alteración genética, proporcionar consejo genético a los padres. Se puede realizar tem-

pranamente en células de líquido amniótico, de microvellosidades coriónicas o sangre fetal.

#### Muestras biológicas

Paciente con sospecha AF: 2-4 mL de líquido amniótico.

Control negativo: 2-3x10<sup>6</sup> fibroblastos de un individuo sano o de una línea celular AF genéticamente corregida.

Control positivo: 2-3x10<sup>6</sup> de fibroblastos de una línea positiva a AF.

#### Reactivos

Medio Amniomax o DMEM suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado durante 30 minutos a 56 °C, 1% de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio [100 mM], penicilina-estreptomicina [10,000U/mL-10,000µg/mL] y glutamina [200mM].

Tripsina [0.25%] /EDTA [0.1%]

Diepoxibutano (DEB) (1,3-butadiene diepoxibutano, 97% [0.01 µg/mL y 0.1 µg/mL]

Colcemida [1µg/mL] o colchicina [2µg/mL]

Solución hipotónica de KCl [0.050 M]

Fijador Carnoy (Metanol: Ácido acético, 3:1)

Wright y Giemsa (Usar las soluciones que se usan para cariotipo de rutina)

#### Cultivos celulares

1. Sembrar 3 cultivos con 1x10<sup>6</sup> de células del paciente, fibroblastos normales (control negativo) y fibroblastos positivos para AF (control positivo), en botellas de cultivo de 75 cm<sup>3</sup> con 10 mL de medio

- de cultivo DMEM o Amniomax. Incubar a 37°C hasta que alcancen el 75% de confluencia.
2. Levantar los cultivos de los 3 tipos celulares con tripsina [0.25%]/EDTA[0.1%], lavar con PBS.
  3. Sembrar 3 cultivos con 500,000 células de los 3 tipos celulares en botellas de 75 cm<sup>3</sup> con 10 mL de medio DMEM o Amniomax e incubar por 24 horas.
  4. Por línea celular, se tendrán los siguientes cultivos:
    - a) Cultivo sin tratamiento (Aberraciones cromosómicas espontáneas)
    - b) Tratado con DEB [0.01 µg/mL] (Aberraciones cromosómicas inducidas)
    - c) Tratado con DEB [0.1 µg/mL] (Aberraciones cromosómicas inducidas)

Para obtener una concentración final de [0.01 µg/mL] agregar 2 µL de DEB y para una concentración final de [0.1 µg/mL] adicionar 20 µL de DEB.
  5. Incubar hasta que los cultivos estén cercanos a confluencia y tengan células mitóticas (~ 48-72 h). Para cosechar las células y obtener células en metafase, se debe hacer la misma evaluación que en el paso 5 del protocolo de fibroblastos previamente descrito.
  6. Agregar 50µL de colcemida [1µg/mL] o colchicina [2µg/mL], incubar 2-3 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
  7. Eliminar el medio en todos los cultivos y levantar las células con tripsina [0.25%]/EDTA[0.1%], a 37°C durante 2 min.
- Lavar con PBS para eliminar la tripsina, centrifugar 10 min a 500 g.
8. Desechar el sobrenadante y agregar 8 mL de solución hipotónica a 37°C de KCl [0.050 M]. Incubar 20 min a 37°C.
  9. Seguir los pasos 4-6 de la cosecha de linfocitos de sangre periférica.
  10. La elaboración de laminillas y el análisis de aberraciones cromosómicas se realiza de la misma manera que la sangre periférica.
- El diagnóstico con MMC también se ha utilizado desde hace mucho tiempo por diferentes grupos, sin embargo, se debe tener mucho cuidado en su uso porque si bien es un excelente inductor de ICLs, cuando se congela forma cristales que si no se disuelven adecuadamente, pueden incrementar significativamente su concentración en los cultivos celulares y dar falsos positivos.<sup>19,21</sup> Para evitar este efecto, la MMC se debe descongelar anticipadamente y mantenerla a 37°C durante 2-3 horas antes de agregarla a los cultivos.
- La concentración de MMC que se utiliza es de 40 ng/mL de medio de cultivo, para las muestras de sangre periférica, médula ósea y amniocitos, mientras que para fibroblastos de piel se utilizan 10 ng/mL de medio de cultivo. El resto de los procedimientos son iguales que cuando se utiliza DEB.

### ANÁLISIS DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

Una vez que se haya realizado cualquiera de los protocolos previamente descritos, para conocer la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas, se analizan los cromosomas de 25-50 metafases de los cultivos con y sin DEB del paciente y de los controles negativo y positivo.

El análisis cromosómico se realiza en metafases sin bandeado cromosómico, porque las bandas no permiten visualizar todas las roturas en los cromosomas, mientras que con tinción homogénea se identifican fácilmente y con certeza las aberraciones cromosómicas. La búsqueda de metafases se inicia en un extremo de la laminilla y se van analizando una por una de manera ordenada sin seleccionarlas, hasta alcanzar las 25-50 metafases. En cada metafase se determina el número cromosómico y el tipo de aberraciones cromosómicas, los cromosomas se analizan por número cuando es posible, o por grupo y se cuantifican las siguientes aberraciones: roturas cromatídicas y cromosómicas o isocromatídicas, los fragmentos céntricos y acéntricos, anillos, dicéntricos, figuras radiales y "otras"; la presencia de figuras radiales es la característica citogenética de la AF (**Figura 1**). Los criterios para identificar estos tipos de aberraciones cromosómicas son los siguientes:

A. Rotura cromatídica: se presenta cuando existe una discontinuidad en una sola cromátida del cromosoma, debe ser mayor al ancho de la

cromátida o que el fragmento resultante se encuentre desviado del eje de la cromátida.

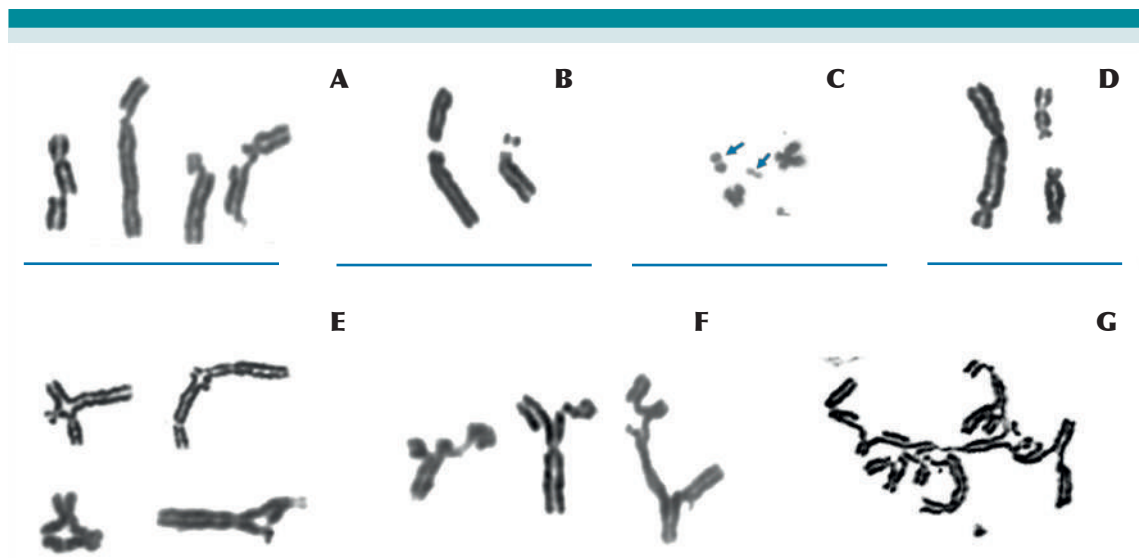
B. Rotura cromosómica o isocromatídica: se presenta cuando existe una discontinuidad en ambas cromátidas que es mayor al ancho de las cromátidas.

C. Fragmentos céntricos: cromosomas que contienen centrómero y que en general se encuentran adicionalmente a los 46 cromosomas.

D. Fragmentos acéntricos: segmentos de cromosomas con dos cromátidas que carecen de centrómero y que pueden formarse por una rotura cromosómica terminal de un cromosoma; pueden ser también un fragmento de una cromátida.

E. Anillos: cromosomas circulares con o sin centrómero

F. Dicéntricos: cromosomas con dos centrómeros, en algunas ocasiones los cromosomas tienen las



**Figura 1.** Tipos de aberraciones cromosómicas observadas en células de pacientes AF expuestas a DEB. A) Roturas cromatídicas B) Roturas cromosómicas o isocromatídicas C) Fragmentos acéntricos (flechas azules) D) Dicéntricos E) Figuras trirradiales y tetrarradiales F) Figuras radiales con roturas G) Figura polirradial.



cromátidas del brazo corto o largo cruzadas que semejan a otro centrómero, para discriminarlo se debe comparar su tinción con la de los centrómeros de los otros cromosomas, si es igual entonces es un dicéntrico y si es más oscura es un cruce de cromátidas y el cromosoma es monocéntrico.

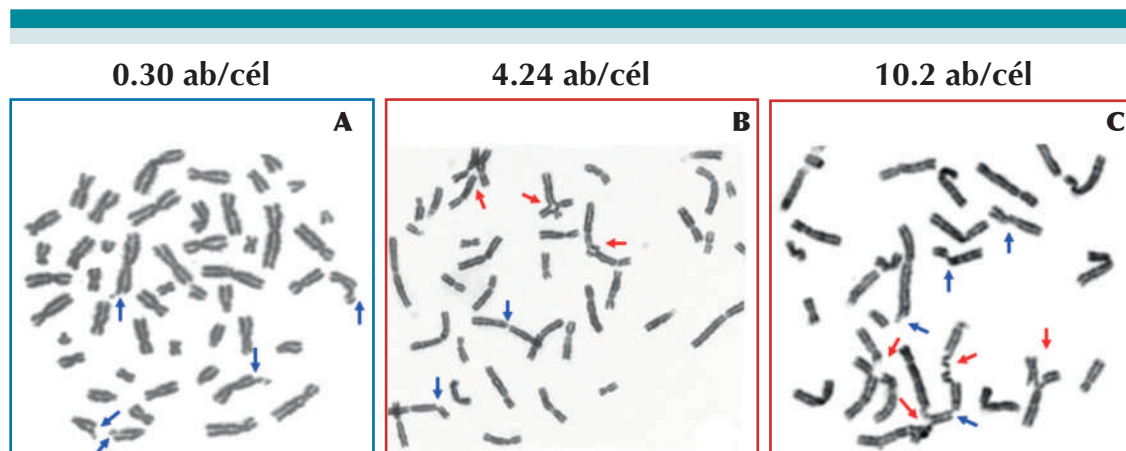
G. Figuras radiales: a) Trirradios: es una figura de intercambio de las cromátidas de dos cromosomas homólogos o no homólogos con 3 ejes, que generalmente se originan por tres roturas y una reparación errónea de los extremos. b) Tetrarradios: es una figura de intercambio de cromátidas de dos cromosomas homólogos o no homólogos con 4 ejes, que se producen por la reparación errónea de dos roturas cromosómicas. c) Polirradios: son figuras de intercambio de cromátidas no hermanas entre más de 3 cromosomas que también se producen por una reparación errónea de sus extremos.<sup>1</sup> Adicionalmente, en estas figuras radiales, se pueden encontrar roturas cromatídicas que también se cuantifican (**Figura 1**).

Con este análisis se obtienen las frecuencias de aberraciones por células espontáneas e inducidas del paciente y de los controles negativo y positivo, y se comparan para determinar el diagnóstico. Un paciente se diagnostica con AF cuando la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida con DEB es 10 veces mayor a la observada en su cultivo sin tratamiento y a la del control negativo, adicionalmente esta respuesta de hipersensibilidad al agente inductor de enlaces cruzados es similar a la del control positivo (**Figura 2 y 3**)

## DESCRIPCIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

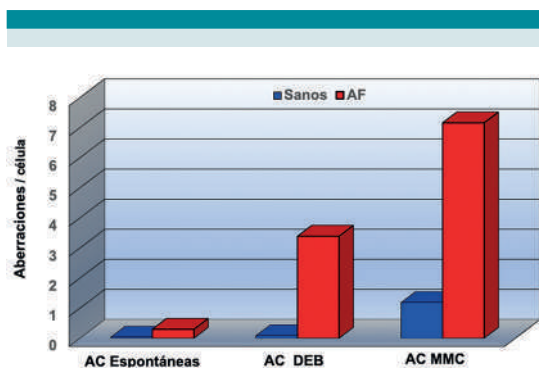
### a) Tipos de alteraciones en células normales y AF

De acuerdo a la experiencia del laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, las células de individuos sanos presentan una frecuencia de aberraciones cromosómicas espontánea de 0 a 0.32 aberraciones/célula (ab/cél) e



**Figura 2.** Diagnóstico citogenético positivo de un paciente AF. **A)** Metafase del paciente sin tratamiento, con una frecuencia de ab/cél mayor que la que se observa en un individuo sano, **B)** Metafase de un paciente positivo al diagnóstico de AF en donde se observa la hipersensibilidad al DEB y la presencia de figuras radiales que son características en la AF; la respuesta es similar a la del control positivo, **C)** Metafase de un linfoblasto con AF (control positivo) con una elevada frecuencia de ab/cél y figuras radiales con roturas cromatídicas. Las flechas azules indican roturas cromatídicas y cromosómicas o isocromatídicas y las rojas muestran las figuras radiales.

inducida con DEB de 0 a 0.28 ab/cél debido a que sus mecanismos de reparación son funcionales y pueden reparar los ICLs inducidos (**Cuadro 1**).<sup>22</sup> Las aberraciones que se presentan regularmente con y sin tratamiento son roturas cromatídicas y cromosómicas o isocromatídicas, generalmente no muestran figuras radiales (**Figura 1**).



**Figura 3.** Comparación de las frecuencias de ab/cél en individuos sanos y AF, sin y con reto con DEB y MMC. Los pacientes positivos a AF presentan una frecuencia de ab/cél inducidas con DEB y MMC >10X que la observada en los individuos sanos. Nótese que la MMC produce una mayor frecuencia de ab/cél que el DEB.

En contraste, las células AF presentan frecuencias de daño cromosómico basal e inducido significativamente mayores a las observadas en células normales, espontáneamente presentan de 0.04 a 1.6 ab/cél e inducidas con DEB de 1.32 a 5.86 ab/cél (**Cuadro 1**); de manera espontánea, generalmente se presentan de 1 a 3 roturas cromatídicas y/o isocromatídicas en las 25 metafases analizadas y en algunos casos incluso se puede apreciar una figura radial. De manera inducida, las células AF evidencian su hipersensibilidad al DEB con la presencia de un mayor número de células dañadas y de aberraciones, se pueden encontrar entre 15 y 20 metafases de las 25 analizadas, con más de 3 aberraciones cromosómicas dentro de las que destacan la presencia de aberraciones complejas como las figuras radiales (tri y tetrarradiales) y múltiples roturas cromatídicas (**Figura 2 y 4**); por ejemplo, se pueden encontrar células con 10 roturas cromatídicas y 3 figuras radiales. La presencia de figuras radiales es indicativo de AF.

La reproducibilidad de la hipersensibilidad al DEB y por consiguiente del diagnóstico citogenético de la AF, se puede observar en el **Cuadro**

**Cuadro 1.** Frecuencias de ab/cél espontáneas e inducidas por DEB, obtenidas en cohortes AF de un laboratorio mexicano y uno español

Aberraciones cromosómicas espontáneas			
Población	n	Promedio de ab/cél	Rango
Individuos sanos de México	117	0.04	0.0-0.32
Individuos sanos de España	105	0.03	0.0-0.24
Pacientes AF de México	18	0.30	0.04-1.6
Pacientes AF de España	68	0.25	0.0-1.6
Aberraciones cromosómicas inducidas por DEB (0.1µg/mL)			
Población	n	Promedio de ab/cél	Rango
Individuos sanos de México	117	0.09	0.0-0.28
Individuos sanos de España	105	0.06	0.0-0.26
Pacientes AF de México	18	3.39	1.32-5.86
Pacientes AF de España	68	4.34	1.38-10.0

n= Número de individuos  
ab/cél= Aberraciones por célula.  
(Esmer et al, 2004; Castela et al, 2011)

1, la respuesta de las células de pacientes mexicanos es muy similar a la encontrada en los pacientes españoles; los individuos sanos también tienen un comportamiento parecido.<sup>20,22</sup>

Estas diferencias tanto en frecuencia como en tipo de daño permiten establecer un diagnóstico de certeza de la AF, ya que su fenotipo celular es extremadamente constante.

#### b) Diferencias esperadas entre células AF y controles positivos y negativos

Un paciente positivo a AF debe mostrar hipersensibilidad y una frecuencia de aberraciones cromosómicas con DEB aproximadamente 10 veces mayor a la observada en su cultivo sin tratamiento y a la del control negativo, esta respuesta celular debe ser similar a la del control positivo y diferente a la del control negativo que no muestra hipersensibilidad (**Figura 3**) Un alto porcentaje de las células AF deben estar dañadas (40~80%) y deben presentar figuras radiales que son la aberración cromosómica más característica en AF y que no tienen los pacientes negativos a AF (**Figuras 2 and 3**).

Un paciente negativo a AF tiene una respuesta celular muy distinta, no es hipersensible al DEB y las frecuencias de aberraciones espontáneas e inducidas deben ser muy similares a las observadas en el control negativo y completamente diferente a las del control positivo (**Figura 4**). Las frecuencias de aberraciones espontáneas e inducidas generalmente son menores a 0.32 ab/cél.

Las células de los controles positivos, una línea celular AF con variante patogénica bialélica en alguno de los genes *FANCA*, siempre deben ser hipersensibles al DEB o a la MMC, regularmente deben presentar una frecuencia de daño cromosómico espontáneo de 0.1 a 0.4 ab/cél, inducido con DEB de 4 a 20 ab/cél y 100% de las células aberrantes con múltiples figuras radiales (tri, tetra y polirradiales) y gran cantidad de roturas cromosómicas.

Este comportamiento celular es similar al observado en los pacientes detectados como positivos con el reto a DEB, sin embargo, en las líneas celulares las frecuencias de ab/cél suelen ser más altas que las observadas en los pacientes.

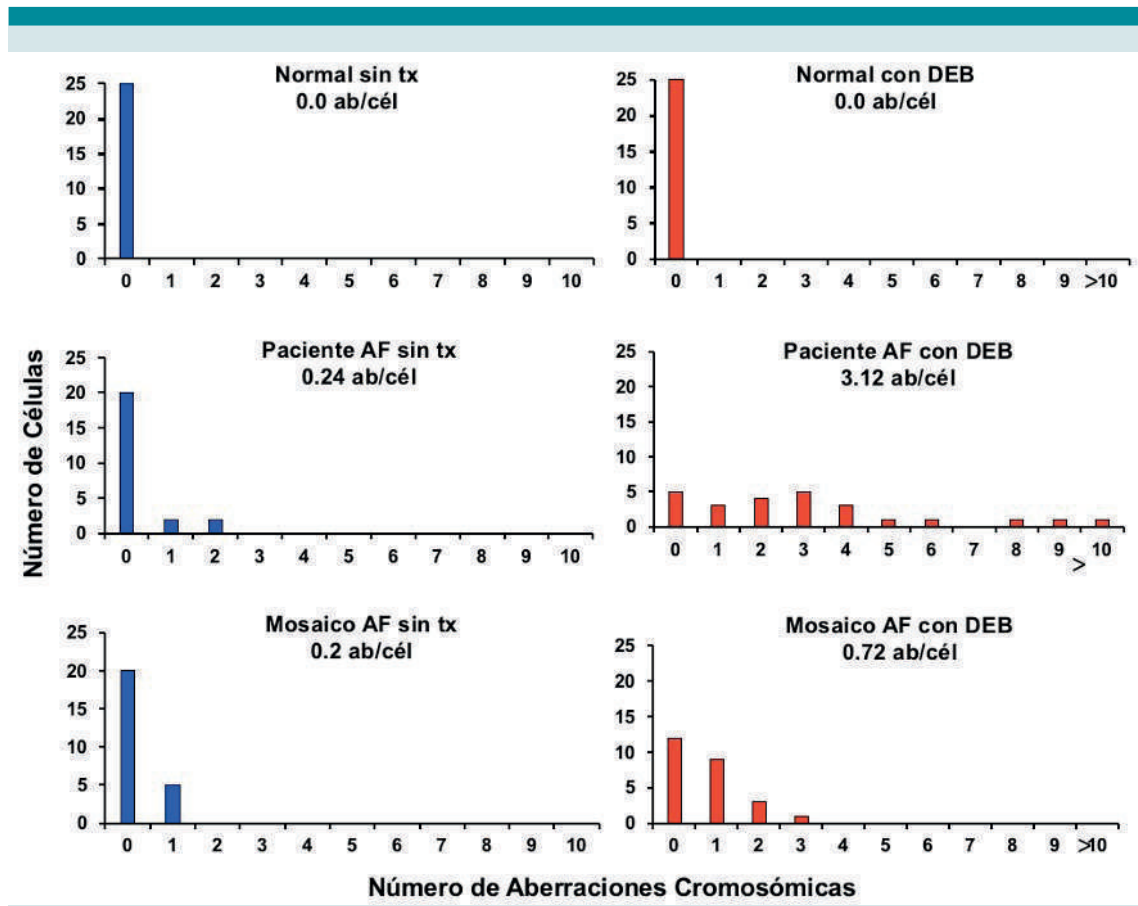
#### c) Sospecha de mosaicismo

En algunos pacientes el diagnóstico no es concluyente, aun cuando se empleen los controles positivos y negativos correctamente, las frecuencias de aberraciones inducidas con DEB o MMC tienen valores intermedios, no cumplen el criterio de un incremento de 10 veces con respecto a su frecuencia basal y a la del control negativo, y el porcentaje de células aberrantes es menor al 30% por lo que es posible la presencia de mosaicismo celular (**Figura 4**).

#### CONFIRMACIÓN DE MOSAICISMO

La confirmación del paciente con mosaicismo es muy relevante debido a que se puede descartar un falso negativo y a que puede proporcionar un pronóstico favorable para los pacientes. Ostra y colaboradores,<sup>21</sup> han demostrado que cuando se sospecha de un mosaico en un paciente, este se puede corroborar en linfocitos de sangre periférica tratados con 50, 150 y 300 nM de MMC durante 72 horas, al comparar su respuesta celular con la de un individuo sano y un paciente positivo a AF. La distribución de células con diferente número de aberraciones cromosómicas es claramente distinta en el mosaico AF con respecto al paciente AF (control positivo) y al individuo sano (control negativo); en la concentración mas alta de MMC, observaron que en el mosaico celular existen 10% de células sin daño y 90% de células con 1 a 10 ab/cél mientras que en el positivo AF casi el 100% de las células tienen más de 10 aberraciones y no existen células sin aberraciones.<sup>21</sup> La confirmación puede realizarse también siguiendo esta metodología, pero con DEB en lugar de MMC, los resultados son





**Figura 4.** Detección de mosaicismo en pacientes con anemia de Fanconi. La frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas con diepoxibutano y la distribución de células con aberraciones cromosómicas en el paciente con mosaicismo es diferente a la observada en el control negativo y positivo. El mosaico de anemia de Fanconi con diepoxibutano muestra un incremento de células sin daño y no cumple el criterio de aumento 10 veces mayor respecto a su frecuencia basal y a la del control negativo. Adicionalmente, no muestra células con 4 o más ab/cél, como se observan claramente en el paciente positivo a anemia de Fanconi (control positivo).

muy similares. Generalmente la corroboración de mosaicismo se realiza en un tejido distinto al hematológico, el más adecuado y utilizado son los fibroblastos de piel tratados con DEB como se ha descrito anteriormente. Las frecuencias de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas con DEB se comparan con las de los controles negativo y positivo, así como el comportamiento de las células mediante el análisis de la gráfica de la distribución de las

células con diferente número de aberraciones cromosómicas (**Figura 4**).

Idealmente, la confirmación del estado de mosaico debe complementarse con la determinación molecular de la variante patogénica que causa la AF, mediante metodologías de biología molecular para demostrar un genotipo *FANC* constitutivamente patogénico y la ausencia de una de las variantes en el compartimento hematológico.

## REPORTE CITOGENÉTICO AF

El reporte de las muestras del paciente y de los controles, deben incluir las frecuencias por célula

de aberraciones espontáneas e inducidas con DEB o MMC, el número de figuras radiales y el porcentaje de células aberrantes, un ejemplo se muestra en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 2.** Ejemplo de tabla con la información necesaria para hacer el reporte citogenético del estudio de aberraciones cromosómicas para diagnóstico de AF

Muestra	Número de células analizadas	Frecuencia de aberraciones espontáneas por célula	Frecuencia de aberraciones inducidas con DEB por célula	Número total de figuras radiales espontáneas	Número total de figuras radiales inducidas con DEB	Porcentaje de células aberrantes espontáneas	Porcentaje de células aberrantes inducidas con DEB
Control negativo	25	0.0	0	0	0	0	0
Control positivo*	25	0.4	8.0	0	11	40	100
Paciente	25	0.08	2.24	0	13	8.0	40

\*El control positivo es una línea linfoblastoide derivada de un paciente con AF

## Fanconi anemia, Part 1. Cytogenetic diagnosis

### INTRODUCTION

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease with a worldwide prevalence of 1 to 5 per million inhabitants. Patients with FA have multiple congenital malformations, progressive bone marrow failure, and a high predisposition to develop leukemia and solid tumors. The most frequent phenotypic characteristics are: short stature, changes in skin pigmentation, skeletal alterations including absence or hypoplasia of the radial axis and thumb, renal, genital and ocular malformations.<sup>1-3</sup> At the hematological level, bone marrow failure occurs between 7 and 10 years of age. Patients can initiate with hematologic monocytopenias of any cell lineage and

then progress to pancytopenia. Neoplasms can occur in up to 20% of patients, the most common are acute myeloid leukemia, which occurs in adolescence and head and neck tumors that generally develop in adulthood.<sup>3-5</sup>

At the cellular level, FA patients present genomic instability, evidenced by a high frequency of spontaneous chromosomal aberrations and hypersensitivity to cross-linking agents such as mitomycin C (MMC) or diepoxybutane (DEB). In addition, they show hypersensitivity to reactive oxygen species and aldehydes, a pro-inflammatory state due to an increase in tumor necrosis factor alpha and arrest in the G2 phase of the cell cycle.<sup>1</sup>

FA is a DNA repair syndrome, it is the consequence of altered function of one of the 22 FA genes called *FANC* (*FANCA-FANCW*) due to pathogenic variants.<sup>1,6-8</sup> Most of the genes are inherited in an autosomal recessive manner, except for *FANCB* which is X-linked and *FANCR* (*RAD51*) which is autosomal dominant (9).

Ordinarily, the proteins produced by the *FANC* genes work together in the FA / BRCA pathway, to coordinate the repair of the DNA covalent cross-links (ICLs) by detecting, processing and eliminating those lesions, to preserve the genomic integrity, cell cycle progression and cell survival.<sup>1,10,11</sup> FA occurs when this pathway works incorrectly, leading to an inability to repair ICLs, chromosomal instability, and hypersensitivity to MMC and DEB, presenting chromatid breaks and complex chromosomal aberrations such as radial figures. Hypersensitivity to MMC and DEB has long been used as the gold standard for the diagnosis of FA.<sup>12,13</sup> To 25% of patients with FA, can have a condition named mosaicism. This consists in the presence of two genetically different cell populations in the same organism: one with a defect in a *FANC* gene and the second in which one of the pathogenic variants is reversed either by gene conversion, intragenic crossover or by mutation in a second site of the gene. Revertant hematopoietic progenitor cells are capable of repairing spontaneous and induced damage, like normal cells.<sup>14</sup> The mosaic condition in FA can be a diagnostic challenge, since these individuals have a lower frequency of DEB or MMC induced chromosomal aberrations than non-mosaic FA patients. The identification of mosaicism is highly relevant to avoid a false negative when the clinical picture is highly suggestive of FA. Cases with FA mosaicism might present a stable or normalized blood cell counts and some patients have survived to adulthood without bone marrow failure or hematological malignancy,<sup>14,15</sup> however It is important to remember that non-hematopoietic tissues generally have the original pathogenic variant

in the *FANC* genes, so the corroboration of a positive diagnosis in a suspected hematopoietic mosaic has to be made in another tissue, like skin fibroblasts.

In Latin America, there are few countries that perform the cytogenetic diagnosis of FA,<sup>16-18</sup> so we consider that it would be useful to present the description of the cytogenetic protocol used successfully in our laboratory for more than 30 years.

### CYTOGENETIC METHODOLOGY FOR THE DIAGNOSIS OF FA

The hypersensitivity of FA cells to ICL inducing agents has made it possible to establish a reliable diagnostic test that is based on the analysis of induced chromosomal aberrations. This test remains the gold standard for diagnosis for FA since it can identify patients with FA irrespective of which *FANC* gene is affected, and also whether the patient has a classic FA phenotype, a non-classical presentation and even asymptomatic patients.

Historically, several inducing agents have been used, such as MMC, DEB and cisplatin. But for diagnostic purposes, it has been widely recognized that the use of DEB is preferred since it is less cytotoxic, and it generates low inter-individual variability in the frequency of chromosomal damage, resulting in a low frequency of false positives and false negatives.<sup>19,20</sup>

The cytogenetic diagnosis of FA can be performed in several different tissues as long as there are cells undergoing mitosis. It is a test that can be performed prenatally either in chorionic villus cells between 9 and 12 weeks of gestation, or in amniotic fluid cells obtained by amniocentesis between 12 and 15 weeks of gestation, the test can also be performed in fetal blood. Postnatally, peripheral blood, bone marrow, or skin fibroblasts can be used. If peripheral blood is used, it must be ensured that the patient has not



been recently transfused with non leucodepleted blood derivatives, if normal cells from the donor were to be found, an inconclusive or false negative result could be obtained. When a patient is transfusion dependent, the diagnostic test must be made in hemathologic cells directly obtained from bone marrow or in skin fibroblasts.

There are variations in the chromosomal aberration assay protocol between experienced laboratories in Fanconi anemia diagnosis. The main differences are in the ICL inducing agents; their type, the concentration and the exposure time used. The Dutch group uses 3 different concentrations of MMC (50nM, 150nM and 300nM), they simultaneously stimulate lymphocytes with phytohaemagglutinin and treat the cells for 72 hours.<sup>21</sup> In contrast, Auerbach et al (2015) and Castella et al (2011) first stimulate the T cells and 24 hours later they add DEB; then the Auerbach group treats the cells for 48 or 72 hours with 0.01 and 0.1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  while the Castella group limits the exposition of the cells to 48 hours with 0.1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Our group uses a single concentration of the agent, either 40 ng / mL of MMC or 0.1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  of DEB for 72 hours, T cell stimulation is done simultaneously to ICL inducing treatment. Despite these differences, all protocols are efficient for FA diagnosis.<sup>19,20</sup>

In this work, we will describe the protocols for the cytogenetic diagnosis of FA in peripheral blood, bone marrow, fibroblasts and amniocytes, that we use in the Cytogenetics laboratory of the National Institute of Pediatrics (Mexico); for this protocol the clastogen of choice is DEB. These techniques ensure the obtainment of good quality chromosomes and an adequate number of metaphases to allow aberration analysis in 25 or 50 cells.

#### A) Diagnosis in peripheral blood

Peripheral blood is the tissue of choice to perform the diagnosis because sampling is less invasive,

the only requirement is that the patient has not been transfused in the past two months or that the blood products have been leucodepleted.

In order to correctly interpret the results of chromosomal damage in the patient with suspected FA, two controls must be included: a) a negative control, cells from a healthy individual whose repair mechanisms are normal, so they are resistant to DEB and their frequency of chromosomal aberrations is low, b) a positive control, cells from a patient with FA (a lymphoblastoid cell line), with hypersensitivity to DEB and a high frequency of chromosomal aberrations. The positive control is important to indicate the functionality of the clastogenic agent, it contributes in providing an accurate diagnosis.

#### Biological samples

Patient with suspected FA: 2-3 mL of blood collected in sodium heparin.

Negative control: 2-3 mL of blood in sodium heparin from a healthy individual.

Positive control:  $2-3 \times 10^6$  cells from a FA positive lymphoblastoid cell line.

#### Reagents

Medium A: RPMI or McCoy's with 1% phytohemagglutinin and penicillin-streptomycin [10,000U/mL-10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].

Medium B: RPMI supplemented with 10% fetal calf serum inactivated at 56°C for 30 minutes, 1% non-essential amino acids, sodium pyruvate [100 mM], penicillin-streptomycin [10,000U/mL-10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] and glutamine [200mM]

Diepoxybutane (DEB) (1,3-butadiene diepoxide, 97%) [0.1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ]

Colcemide [1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ] or Colchicine [2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ]

Hypotonic solution of KCl [0.075M]

Carnoy Fixative (Methanol: Acetic Acid, 3: 1)

Wright and Giemsa staining (Same the solutions used for a routine karyotype)

### DEB preparation

Prepare DEB working solution by placing 20 mL of sterile distilled water and 1  $\mu$ L of DEB in a sterile tube, mix and keep at 4 ° C. This solution must be prepared at the time of cell culture seeding, although DEB is a highly reactive cross-link inducer, it has a half-life of only 3-4 days because when in contact with water, it hydrolyzes and loses its clastogenic activity.<sup>19,21</sup>

### Cell cultures

1. To diagnose FA, peripheral blood cultures of the patient and the positive and negative control are grown simultaneously.

For each sample, establish two cell cultures using 15mL conical tubes, as follows:

- a) Patient and negative control: 0.5 mL of blood + 4.5 mL of medium "A". The cultures proliferate well without fetal serum, because whole blood that carries its own plasma, is seeded.
  - b) Positive control:  $1 \times 10^6$  in 5 mL of medium "B".
2. Add 10  $\mu$ L of DEB working solution only to one of the cultures of each type of cell sample, for a final concentration of DEB 0.1  $\mu$ g / mL], this culture will be used to determine the DEB induced frequency of chromosomal aberrations. The other sample of each cell type will remain

untreated to obtain the spontaneous frequency of chromosomal aberrations.

3. Incubate all cultures at 37 ° C for 72 hours.

### Cell harvest

1. To arrest cells in metaphase, add 50  $\mu$ L per culture, of colcemide [1 $\mu$ g / mL ] or colchicine [2 $\mu$ g / mL] solution per culture, for a final concentration of colcemid [0.01 $\mu$ g/mL] or colchicine [0.02 $\mu$ g/mL]; incubate for 1-2 hours at 37 ° C.
2. Centrifuge at 500g for 10 min, carefully discard the supernatant to avoid resuspending the cell pack.
3. Add 8 mL of pre-warmed hypotonic solution (37°C), resuspend and incubate for 15 min. at 37 ° C.
4. To prefix the cultures, add 0.5 mL of cold Carnoy fixative (4°C) and resuspend by inversion.
5. Centrifuge at 500g for 10 min, discard the supernatant, resuspend the cell pack, add 8 mL of fixative (4°C), mix very well and centrifuge at 500g for 10 min.
6. Repeat step 5 until a white cell pack and clear supernatant are obtained.

### Slides for chromosome aberration analysis

1. To make the slides, clean, wet and cold (4 °C) 25mm x 75mm glass slides are used. After centrifugation, carefully take the supernatant out until 1 mL of Carnoy fixative is left in each tube. Resuspend and drip 3-4 drops of the suspension on the slide, avoiding overlapping drops. Label and place the slide on a thermal

plate at 50-60°C for a few seconds until the slide is completely dry.

2. Stain the preparations with Wright and Giemsa for 1 and 2 min respectively, rinse under running water and allow to dry.
3. Analyze 25-50 metaphases per culture with and without DEB from the patient, negative and positive control.

### B) Diagnosis in bone marrow

On many occasions, patients with suspected FA are transfusion-dependent due to severe bone marrow failure, in such patients it is suggested to carry out the study of chromosomal aberrations in bone marrow.

A 2 mL sample of heparinized bone marrow is required. For diagnosis, cell culture growing, DEB treatment, cell harvesting, slide preparation, and chromosome aberration analysis is performed in the same way as peripheral blood.

### C) Diagnosis in skin fibroblasts

Skin fibroblast is the tissue of choice when patients have severe pancytopenia, when they have recently been transfused (especially if the blood products are not leucodepleted), or when a possible hematological mosaic of FA is suspected. We have found that fibroblasts are more sensitive to ICL inducing agents, so for these cells two DEB concentrations are tested (0.01 and 0.1 µg / mL) for diagnosis.

### Biological samples

Patient with suspected FA: a 5mm diameter skin biopsy.

Negative control: 2-3 x 10<sup>6</sup> fibroblasts from a healthy individual or a genetically corrected FA cell line.

Positive control: 2-3x10<sup>6</sup> fibroblasts from a FA positive line.

### Reagents

Amniomax medium (Gibco) or DMEM supplemented with 15% fetal calf serum

Inactivated for 30 minutes at 56°C, 1% non-essential amino acids, sodium pyruvate [100 mM], penicillin-streptomycin [10,000U/mL-10,000µg/mL] and glutamine [200mM]

Trypsin [0.25%] / EDTA [0.1%]

Diepoxybutane (DEB) (1,3-butadiene diepoxide, 97%) [0.1 µg / mL]

Colcemide [1µg/mL] or Colchicine [2µg/mL]

Hypotonic solution of KCl [0.050 M]

Carnoy Fixative (Methanol: Acetic Acid, 3: 1)

Wright and Giemsa staining (Use the solutions used for routine karyotype)

### Cell cultures

1. The skin biopsy from the patient with suspected FA is transported in culture medium with 1% antibiotic penicillin-streptomycin [10,000U/mL-10,000µg/mL] solution. In the laminar flow hood (Biosafety 2) wash the sample with PBS, remove fat and connective tissue and select the epidermis to cut into small pieces or explants. Place the explants in a 75cm<sup>3</sup> culture bottle with only 2mL Amniomax medium or DMEM to allow the explants to adhere to the bottom of the bottle and incubate at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.
2. The next day, add 8 mL of Amniomax or DMEM medium and incubate at 37°C

with 5% CO<sub>2</sub> until the culture reaches 75% confluence.

3. Detach fibroblasts with 0.25% trypsin / 0.1% EDTA treatment at 37°C for 2 min, wash with PBS twice.
4. Seed in triplicate 600,000 fibroblasts from the patient, negative and positive control in 75 cm<sup>3</sup> bottles with 10 mL of medium. Incubate for 24 hrs.
5. Per every cell sample, the following cultures will be grown:
  - a) Culture without treatment (Spontaneous chromosomal aberrations)
  - b) Treated with DEB [0.01 µg/mL] (Induced chromosomal aberrations)
  - c) Treated with DEB [0.1 µg/mL] (Induced chromosomal aberrations)

Add 2 µL of DEB working solution to obtain a final concentration of [0.01 µg/mL] and 20 µL for a final concentration of [0.1 µg/mL].

6. Incubate until cultures are close to 75% confluence and have enough mitotic cells (~ 48-72 hrs). The cells will be in contact with DEB for two to three cell cycles.

In some occasions, cells with DEB grow very slowly, then it is necessary to remove the medium and add DEB-free medium to promote cell proliferation; within 24 hours should be enough to obtain enough mitotic cells for analysis. On the contrary, when they proliferate rapidly and reach 100% confluence, mitotic cells are generally absent, so it is necessary to detach the cells and reseed them in two 75 cm<sup>3</sup> bottles with 10 mL of DEB-free medium and harvest the

next day. It is important to mention that in both cases, the harvest must be carried out 24 hours after changing the medium because only one cell cycle has passed and the chromosomal damage induced by DEB can still be observed; otherwise, the full test must be repeated.

7. Add 50µL of colcemide [1µg / mL ] or colchicine [2µg / mL], incubate 2-3 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.
8. Remove the medium in all cultures and detach the cells with 0.25% trypsin / 0.1% EDTA at 37°C for 2 min. Wash with PBS to remove trypsin, centrifuge 10 min at 500 g.
9. Discard the supernatant and add 8 mL of hypotonic solution of KCl [0.050 M] at 37°C. Incubate 20 min at 37°C.
10. Follow steps 4-6 of the peripheral blood lymphocyte harvest.
11. Slides preparation and chromosome aberration analysis is performed in the same way as peripheral blood.

#### D) Diagnosis in amniocytes

Prenatal diagnosis is very important to know the fetal health and in case of carrying a genetic alteration, to provide genetic counseling to the parents. It can be performed early in cells from amniotic fluid, chorionic microvilli, or fetal blood.

#### Biological samples

Patient with suspected FA: 2-4 mL of amniotic fluid

Negative control: 2-3x10<sup>6</sup> fibroblasts from a healthy individual or a genetically corrected AF cell line.





Positive control:  $2-3 \times 10^6$  fibroblasts from a FA positive line.

### Reagents

Amniomax medium or DMEM supplemented with 15% inactivated fetal bovine serum for 30 minutes at  $56^\circ\text{C}$ , 1% non-essential amino acids, sodium pyruvate [100 mM], penicillin-streptomycin [10,000U/mL-10,000 $\mu\text{g}$ /mL] and glutamine [200mM]

Trypsin [0.25%] /EDTA [0.1%]

Diepoxybutane (DEB) (1,3-butadiene diepoxide, 97%) [0.1  $\mu\text{g}$  / mL]

Colcemide [1 $\mu\text{g}$ /mL] or colchicine [2 $\mu\text{g}$ /mL]

Hypotonic solution of KCl [0.050 M]

Carnoy Fixative (Methanol: Acetic Acid, 3: 1)

Wright and Giemsa staining (Use the solutions used for routine karyotype)

### Cell cultures

1. Grow 3 cultures with  $1 \times 10^6$  cells from the patient, normal fibroblasts (negative control) and FA positive fibroblasts (positive control), in  $75\text{ cm}^3$  culture bottles with 10 mL of DMEM or Amniomax culture medium. Incubate at  $37^\circ\text{C}$  until they reach 75% confluence.
2. Detach the cells from the cultures of the 3 cell types with 0.25% trypsin / 0.1% EDTA , wash with PBS.
3. Grow 3 cultures with 500,000 cells of the 3 cell types in  $75\text{ cm}^3$  bottles with 10 mL of DMEM or Amniomax medium and incubate for 24 hours.

4. Per cell line, the following cultures will be taken:

- a) Culture without treatment (Spontaneous chromosomal aberrations)
- b) Treated with DEB [0.01  $\mu\text{g}$ /mL] (Induced chromosomal aberrations)
- c) Treated with DEB [0.1  $\mu\text{g}$ /mL] (Induced chromosomal aberrations)

To obtain a final concentration of [0.01  $\mu\text{g}$ /mL] add 2  $\mu\text{L}$  of DEB and for a final concentration of [0.1  $\mu\text{g}$ /mL] add 20  $\mu\text{L}$  of DEB.

5. Incubate until cultures are close to confluence and have mitotic cells (~ 48-72 hrs). To harvest the cells and obtain cells in metaphase, the same evaluation must be made as in step 5 of the fibroblast protocol previously described.
6. Add 50 $\mu\text{L}$  of colcemide [1 $\mu\text{g}$ /mL] or colchicine [2 $\mu\text{g}$ /mL], incubate 2-3 hours at  $37^\circ\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ .
7. Remove the medium in all cultures and lift the cells with 0.25% trypsin / 0.1% EDTA at  $37^\circ\text{C}$  for 2 min. Wash with PBS to remove trypsin, centrifuge 10 min at 500 g.
8. Discard the supernatant and add 8 mL of hypotonic solution of KCl [0.050 M] at  $37^\circ\text{C}$ . Incubate 20 min at  $37^\circ\text{C}$ .
9. Follow steps 4-6 of the peripheral blood lymphocyte harvest.
10. Slice making and chromosome aberration analysis is performed in the same manner as peripheral blood.

The diagnosis with MMC has also been used for a long time by different groups, however, care must be taken in its use because although it is an excellent inducer of ICLs, when it freezes it forms crystals that if not properly dissolved, can significantly increase the mutagen concentration in cell cultures and give false positives.<sup>19,21</sup> To avoid this effect, MMC must be thawed and kept at 37°C for 2-3 hours before adding it to cultures.

The MMC concentration used is 40ng / mL of culture medium, for peripheral blood, bone marrow and amniocytes samples, while 10ng / mL of culture medium is used for skin fibroblasts. The rest of the procedures are the same than when using DEB.

### CHROMOSOME ABERRATION ANALYSIS

The frequency of spontaneous and induced chromosomal aberrations, is obtained by analyzing the chromosomes of 25-50 metaphases from untreated and DEB-challenged cultures from the patient, and the negative and positive controls.

Chromosome analysis is performed in metaphases stained in solid color, that is without chromosomal banding. The banding technique, although essential for chromosome identification is a burden during chromosome aberration analysis since it prevents visualization of all the breaks in the chromosomes, whereas with homogeneous staining, chromosomal aberrations are easily and accurately identified. It is important to avoid selecting metaphases for analysis; one must begin the search for metaphases at one end of the slide and subsequently analyze every metaphase found until reaching 25-50 metaphases. For each metaphase, the chromosomal number and the type of chromosomal aberrations are determined and systematically recorded, the chromosomes are analyzed by number when possible, or by group and the following aberrations are quantified: chromatid and chromosomal or isochromatidic breaks, centric and acentric fragments, rings, dicentrics,

radial figures and "others"; the presence of radial figures is the cytogenetic characteristic of FA (**Figure 1**). The criteria for identifying these types of chromosomal aberrations are as follows:

A. Chromatid break: it occurs when there is a discontinuity in a single chromatid of the chromosome, it must be either larger than the width of the chromatid or the resulting fragment must be deviated from the chromatid axis.

B. Chromosomal or isochromatidic break: it occurs when there is a discontinuity in both chromatids that is greater than the width of the chromatids.

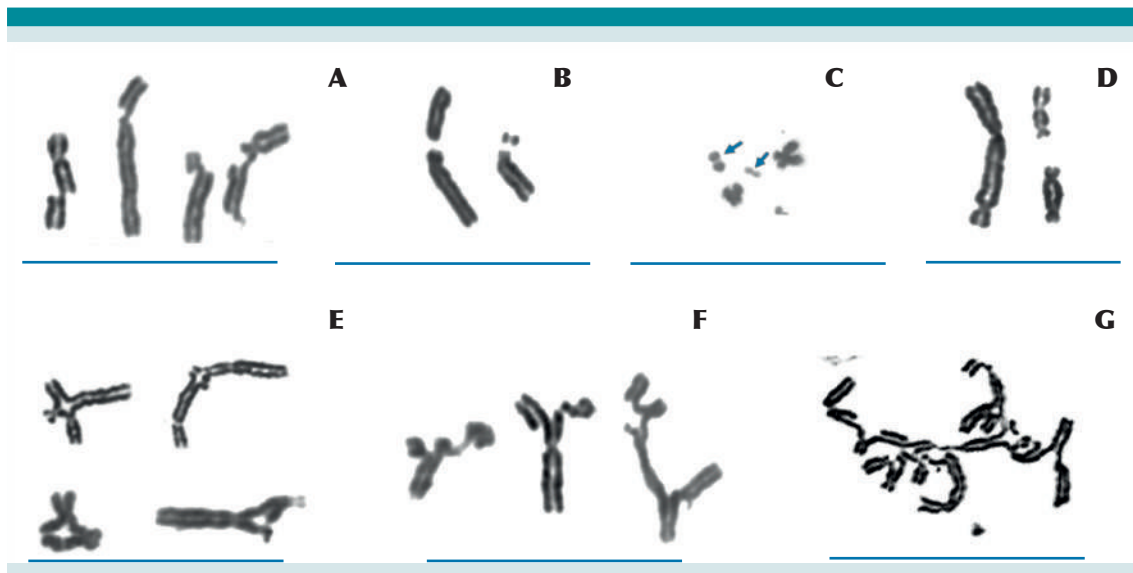
C. Centric fragments: centromere-containing chromosomes that are generally found in addition to the expected 46 chromosomes.

D. Acentric fragments: segments of chromosomes with two chromatids that lack a centromere and that can be formed by a terminal chromosomal break; it can also be as a fragment of a chromatid.

E. Rings: circular chromosomes with or without centromere.

F. Dicentric: chromosomes with two centromeres. In some occasions chromosomes have the chromatids of the short or long arm placed in a crossed manner which gives the illusion of another centromere. To discriminate this, it is important to compare the staining of this structure to the staining of the centromeres of the other chromosomes, if it is similar then it is a dicentric but if it is darker it is a cross of chromatids and the chromosome is monocentric.

G. Radial figures: a) Triradial: it is a figure of exchange of the chromatids of two homologous or non-homologous chromosomes with 3 axes, which generally originate from three breaks and an erroneous joining of the broken ends. b) Tetraradial: it is a chromatid exchange figure with 4



**Figure 1.** Types of chromosomal aberrations observed in cells from FA patients exposed to DEB. **A)** Chromatidic breaks **B)** Chromosomal or isochromatidic breaks **C)** Acentric fragments (blue arrows) **D)** Dicentric **E)** Trirradial and tetraradial figures **G)** Poliradial figure

axes, which are produced by the erroneous joining of two chromosomal breaks involving two homologous or non-homologous chromosomes, c) Poliradial: it is formed by several breaks and non-sister chromatid exchange involving more than 3 chromosomes; they are also produced by an erroneous joining of their broken ends.<sup>1</sup> Additionally, in these radial figures, chromatid breaks that alter the continuity of the radial figure can be found and must also be quantified (**Figure 1**).

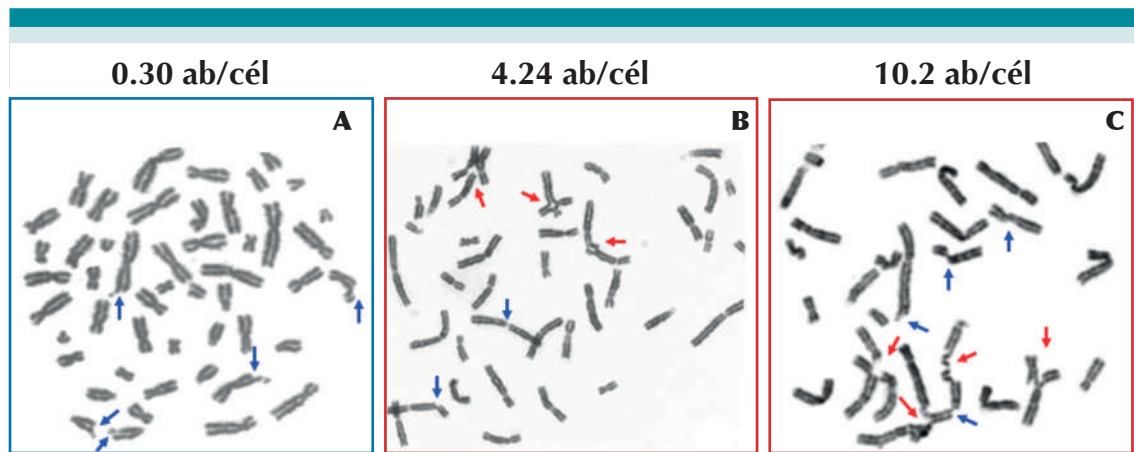
With this analysis, the spontaneous and induced cell aberration frequencies of the patient and negative and positive controls are obtained and compared to determine the diagnosis. A patient is diagnosed with FA when the frequency of chromosomal aberrations induced with DEB is 10 times higher than that observed in his own culture without treatment and in that of the negative control, additionally this hypersensitivity response to the cross-linking inducing agent is similar to that of the control positive (**Figures 2 and 3**).

## DESCRIPTION AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

### a) Types of alterations in normal and FA cells

According to the experience of the cytogenetics laboratory of the National Institute of Pediatrics, normal cells present a frequency of spontaneous chromosomal aberrations ranging 0 to 0.32 aberrations / cell (ab / cell) and induced with DEB ranging 0 to 0.28 ab / cell because their repair mechanisms are functional and can repair induced ICLs.<sup>22</sup> (Table 1). The aberrations that regularly occur independent of treatment are chromatidic and chromosomal or isochromatidic breaks, generally radial figures are not to be found in individuals without FA (**Figures 1**).

In contrast, FA cells have basal and agent induced chromosomal aberration frequencies significantly higher than those observed in normal cells. The spontaneous frequencies range from 0.04 to 1.6 ab / cell and DEB induced



**Figure 2.** Positive cytogenetic diagnosis of a FA patient. **A)** Metaphase from a patient without treatment, with a frequency of ab/cell greater than that observed in a healthy individual, **B)** Metaphase from a FA positive patient where hypersensitivity to DEB and the presence of radial figures, characteristic in FA, are observed; the response is similar to that of the positive control **C)** Metaphase from a FA lymphoblast (positive control) with a high frequency of ab/cell and radial figures with chromatidic breaks. Blue arrows indicate chromatidic and chromosomal or isochromatidic breaks and red arrows show radial figures.

frequency goes from 1.32 to 5.86 ab / cell (Table 1). We have observed that generally for non-treated samples 1 to 3 chromatidic and / or isochromatidic breaks occur in the 25 metaphases analyzed, sporadically a radial figure can be found. In DEB treated samples, FA cells show their hypersensitivity by showing a greater number of damaged cells and aberrations; 15 to 20 metaphases out of the 25 analyzed, can have more than 3 chromosomal aberrations. Complex aberrations such as radial figures (tri and tetradial) and multiple chromatidic breaks are observed (**Figure 2**); i.e. cells with 10 chromatidic breaks and 3 radial figures. The presence of radial figures is highly indicative of FA.

The reproducibility of hypersensitivity to DEB and consequently of the cytogenetic diagnosis of FA, can be seen in **Table 1**. The response of cells from Mexican patients is very similar to what has been described in Spanish patients; healthy individuals also have a similar behavior.<sup>20,22</sup>

These differences in both frequency and type of damage is indicative of an extremely constant cellular phenotype that allows for a diagnosis of FA to be established with certainty.

#### **b) Expected differences between FA cells and positive and negative controls**

A patient that is positive for FA must show the characteristic hypersensitivity to DEB that translates into a chromosomal aberrations frequency approximately 10 times higher than the one observed in his untreated cells. This cellular response must be similar to that of the positive control and different from that of the negative control that does not show that hypersensitivity (**Figure 3**). A high percentage of FA cells are usually damaged (~40-80%) and they most likely present triradial and tetradial figures that are the most characteristic chromosomal aberration in FA. Radial figures are very specific to FA, patients who are negative for FA do not have these aberrations (**Figure 2 and 3**).



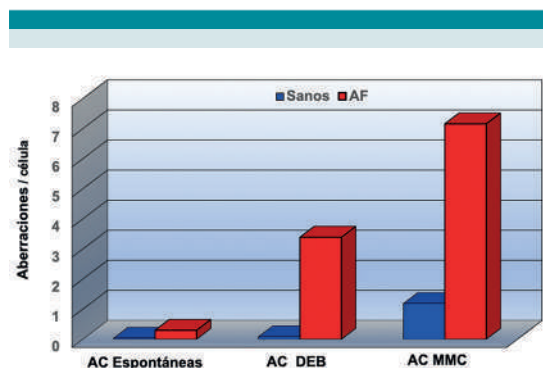
**Table 1.** Spontaneous and DEB-induced ab/cell frequencies, obtained in FA cohorts from a Mexican and a Spanish laboratory

Spontaneous chromosomal aberrations			
Population	n	Mean ab/cell	Range
Mexican healthy individuals	117	0.04	0.0-0.32
Spanish healthy individuals	105	0.03	0.0-0.24
Mexican FA patients	18	0.30	0.04-1.6
Spanish FA patients	68	0.25	0.0-1.6
Induced chromosomal aberrations DEB (0.1µg/mL)			
Population	n	Mean Ab/Cell	Range
Mexican healthy individuals	117	0.09	0.0-0.28
Spanish healthy individuals	105	0.06	0.0-0.26
Mexican FA patients	18	3.39	1.32-5.86
Spanish FA patients	68	4.34	1.38-10.0

n= Number of individuals

ab/cell= Aberrations per cell.

(Esmer et al, 2004; Castela et al, 2011)



**Figure 3.** Comparison of the frequencies of ab/cell in healthy individuals and FA, without and with challenge with DEB and MMC. FA-positive patients present a frequency of ab/cell induced with DEB and MMC >10X that observed in healthy individuals. Note that MMC produces a higher frequency of ab/cell than DEB.

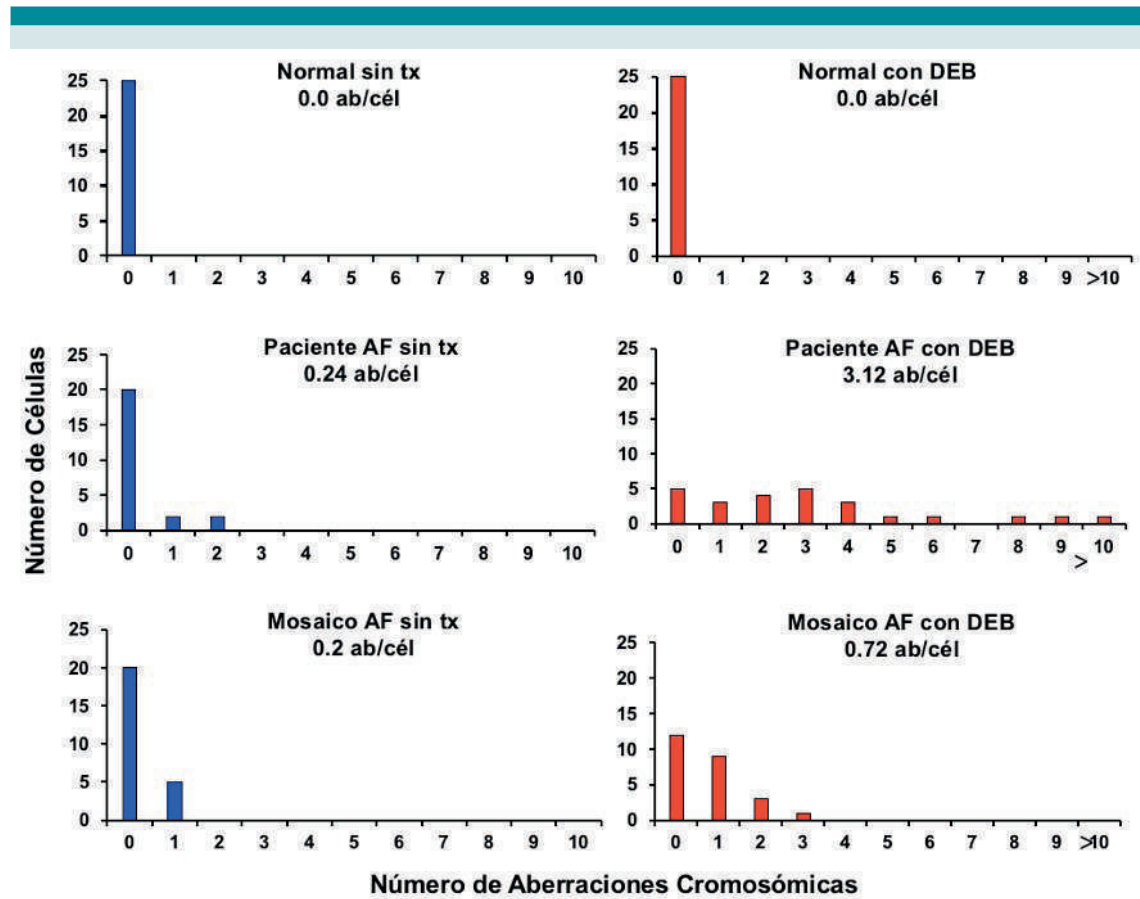
The FA-negative patient has a very different cellular response, he is not hypersensitive to DEB and the frequencies of spontaneous and induced aberrations are very similar to those observed in the negative control and completely different

from those of the positive control (**Figure 4**). Spontaneous and induced aberration frequencies should be less than 0.32 ab / cell.

Cells from positive controls, a FA cell line with a bi-allelic pathogenic variant in one of the *FANCA* genes, are always hypersensitive to DEB or MMC, regularly they must present a frequency of spontaneous chromosomal damage of 0.1 to 0.4 ab / cell and induced with DEB of 4 to 20 ab / cell; with DEB, 100% of the cells are aberrant with multiple radial figures (tri, tetra, and polyradial), with a large number of chromatid breaks. Even when the cellular behavior of a positive cell line is similar to that observed in patients detected as positive with the DEB challenge, the ab / cell frequencies are usually higher than those seen in patients.

### c) Suspicion of mosaicism

In some patients the diagnosis is not conclusive, even when the positive and negative controls are used correctly, the frequencies of aberrations induced with DEB or MMC have intermediate



**Figure 4.** Detection of mosaicism in FA. The frequency of spontaneous and DEB-induced chromosomal aberrations and the distribution of cells with chromosomal aberrations in the mosaic patient were very different from that observed in the negative and positive control. The FA mosaic with DEB shows a higher number of undamaged cells than in the FA positive patient and does not meet the criterion of a 10-fold increase with respect to its baseline frequency and that of the negative control. Additionally, it does not show cells with 4 or more ab/cell, as clearly observed in the AF-positive patient (positive control).

values, they do not meet the criterion of a 10-fold increase with respect to their baseline frequency and that of the negative control. The percentage of aberrant cells is less than 30%, when such results are identified, the presence of cellular mosaicism must be suspected. (Figure 4).

### CONFIRMATION OF MOSAICISM

Suspicion and confirmation of the patient with mosaicism is highly relevant because a false negative can be ruled out and can provide a favorable prognosis for patients. Oostra et al.<sup>21</sup> have shown that when a mosaicism is suspected in a patient, it can be corroborated in peripheral blood lymphocytes treated with 50, 150 and 300 nM of MMC for 72 hours, by comparing its cellular response with that of a healthy individual and one FA positive patient. The distribution of cells with different numbers of chromosomal aberrations is clearly different in the FA mosaic with respect to the FA patient (positive control) and the healthy individual (negative control); at the highest concentration of MMC, they observed that in the cell mosaic there are still 10% of cells without

damage and 90% of cells with 1 to 10 ab / cell, while in the positive FA almost 100% of the cells have more than 10 aberrations and there are no cells without aberrations.<sup>21</sup> Confirmation can also be performed following this methodology, with DEB instead of MMC, the results are very similar.

Generally, mosaicism corroboration is performed in a tissue other than hematological tissue, the most suitable and most commonly used being skin fibroblasts treated with DEB as described above. The frequencies of spontaneous and DEB-induced chromosome aberrations are compared with those of the negative and positive controls, as well as the behavior of the cells by analyzing the distribution graph of cells with different numbers of chromosome aberrations (Figure 4).

Ideally, the confirmation of the mosaic state must be complemented with molecular determination of the pathogenic variant that causes FA, by means of molecular biology methodologies to demonstrate a constitutionally pathogenic *FANCA* genotype and the absence of one of the variants in the hematologic compartment.

**Table 2.** Example of the information necessary to make the cytogenetic report of the study of chromosomal aberrations for FA diagnosis

Sample	number of cells analyzed	Frequency of spontaneous aberrations per cell	Frequency of DEB-induced aberrations per cell	Total number of spontaneous radial figures	Total number of radial figures induced with DEB	Percentage of spontaneous aberrant cells	Percentage of aberrant cells induced with DEB
Negative control	25	0.0	0	0	0	0	0
Positive Control*	25	0.4	8.0	0	11	40	100
Patient	25	0.08	2.24	0	13	8.0	40

\*Positive control is a lymphoblastoid line derived from a patient with FA

## AF CYTOGENETIC REPORT

The report of the patient and control samples must include the frequencies per cell of spontaneous and induced aberrations with DEB or MMC, the number of radial figures and the percentage of aberrant cells, an example is shown in **Table 2**.

## REFERENCIAS

- García-de Teresa B, Rodríguez A, Frias S. Chromosome instability in Fanconi anemia: from breaks to phenotypic consequences. *Genes*. 2020;21(12):1528. doi: 10.3390/genes11121528.
- Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxibutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet*. 2015;85: 8.7.1–8.7.17. doi: 10.1002/0471142905.hg0807s85.
- Fiesco-Roa M, Giri N, McReynolds LJ, Best AF, Alter BP. Genotype-Phenotype Associations in Fanconi Anemia: A Literature Review. *Blood Rev*. 2019; 37: 100589. doi: 10.1016/j.blre.2019.100589
- Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014;27(3-4):214-21. doi: 10.1016/j.beha.2014.10.002.
- Savage SA, Walsh MF. Myelodysplastic Syndrome, Acute Myeloid Leukemia, and Cancer Surveillance in Fanconi Anemia. *Hematol Oncol Clin. North Am*. 2018 ;32(4):657-668. doi: 10.1016/j.hoc.2018.04.002.
- Sawyer SL, Tian L, Kahkonen M, Schwartzentruber J, Kircher M, Majewski J. et al. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discov*. 2015;5(2):135–142. doi: 10.1158/2159-8290.
- Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(6):337-49. doi: 10.1038/nrm.2016.48.
- Mamrak NE, Shimamura A, Howlett NG. Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia *Blood Rev*. 2017; 31(3): 93–99. doi: 10.1016/j.blre.2016.10.002.
- Garaycochea J. I. and Patel K. J. Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia? *Blood*. 2014;123: 26-34. 10.1182/blood-2013-09-427740
- Rodríguez A and D'Andrea A. Fanconi anemia pathway. *Curr Biol*. 2017;25;27(18):R986-R988. doi: 10.1016/j.cub.2017.07.043.
- Liu W, Palovcak A, Li F, Zafar A, Yuan F, Zhang Y. Fanconi anemia pathway as a prospective target for cancer intervention. *Cell Biosci*. 2020;16(10):39. doi: 10.1186/s13578-020-00401-7. eCollection 2020.
- Cervenka J, Hirsch BA. Cytogenetic differentiation of Fanconi anemia, "idiopathic" aplastic anemia, and Fanconi anemia heterozygotes. *Am J Med Genet*. 1983;15(2):211-23. doi: 10.1002/ajmg.1320150205.
- Auerbach AD. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxibutane (DEB) test. *Exp Hematol*. 1993;21(6):731-3.
- Nicoletti N, Rao G, Bueren JA, Río P, Navarro S, Surrallés J. et al. Mosaicism in Fanconi anemia: concise review and evaluation of published cases with focus on clinical course of blood count normalization. *Annals of Hematology* 2020; 99:913–924 doi.org/10.1007/s00277-020-03954-2
- Fargo JH, Rochowski A, Giri N, Savage SA, Olson SB, Alter BP. Comparison of chromosome breakage in non-mosaic and mosaic patients with Fanconi anemia, relatives, and patients with other inherited bone marrow failure syndromes. *Cytogenet Genome Res*. 2014;144(1):15–27
- Lima CSP, Lourenço GJ, Rodriguez DEA, Zocca M, Bertuzzo CS. Cytogenetic and Molecular Diagnosis of Fanconi Anemia. *Rev. Bras. Hemoter*. 2003;25(3) doi.org/10.1590/S1516-84842003000300012
- Moreno OM, Sánchez AI, Herreño A, Giraldo G, Suárez F, Prieto JC, et al. Phenotypic Characteristics and Copy Number Variants in a Cohort of Colombian Patients with VACTERL Association. *Mol Syndromol*. 2020;11(5-6):271-283. doi: 10.1159/000510910
- Gutierrez-Gutierrez R, Pupo-Balboa J, Lavaut-Sánchez K, Calixto-Robert Y, Machín-García S. Diagnóstico citogenético de la anemia de Fanconi en pacientes cubanos con sospecha clínica de la enfermedad. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2021;37(1):e1260.
- Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxibutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet*. 2015;85: 8.7.1–8.7.17. doi: 10.1002/0471142905.hg0807s85.
- Castella M, Pujol R, Callén E, Ramírez MJ, Casado JA, Talavera M. et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet*. 2011;48(4):242-50. doi: 10.1136/jmg.2010.084210.
- Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H. and de Winter JP. Diagnosis of Fanconi anemia: Chromosomal breakage analysis. *Anemia*. 2012:238731. doi: 10.1155/2012/238731.
- Esmer C, Sánchez S, Ramos S, Molina B, Frias, S. and Carnevale, A. DEB Test for Fanconi Anemia Detection in Patients with Atypical Phenotypes. *Am. J. Med. Genet*. 2004;124:35–39.