



<https://doi.org/10.18233/apm.v45i4.2850>

Anemia de Fanconi, Parte 3. Seguimiento citogenético en médula ósea de pacientes con anemia de Fanconi

Fanconi anemia, Part 3. Cytogenetic monitoring in the bone marrow of patients with Fanconi anemia.

Silvia Sánchez,¹ Pedro Reyes,^{1,2} Marco Antonio Mejía Barrera,^{1,3} Antonio Paz Martínez,^{1,3} Sara Frias^{1,4}

Resumen

La anemia de Fanconi es el síndrome de falla medular hereditaria más frecuente; en estos pacientes suele desarrollarse de manera progresiva y las complicaciones hematológicas pueden agravarse durante la adolescencia y la adultez temprana hasta el desarrollo de condiciones asociadas a neoplasias, como el síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide aguda.

El inicio y evolución hacia la neoplasia en la anemia de Fanconi, ha sido asociado a pérdidas y ganancias de regiones cromosómicas y pueden ser monitoreadas a través de la búsqueda de alteraciones citogenéticas clonales, distintivas de la enfermedad que se localizan en los cromosomas 1, 3 y 7. En este artículo presentamos la metodología seguida por nuestro laboratorio para la detección y seguimiento de los cambios cromosómicos, a través de técnicas de bandeado GTG e hibridación *in situ* con fluorescencia. Dicha estrategia representa una forma costo-efectiva para realizar el seguimiento longitudinal de los cambios en la médula ósea de los pacientes que, de manera conjunta con el análisis morfológico y el monitoreo de los recuentos sanguíneos periféricos, permite la toma de decisiones terapéuticas oportunas, como la programación de trasplante de células troncales y progenitoras hematopoyéticas, cuando es posible.

PALABRAS CLAVE: anemia de Fanconi; falla medular; duplicación 1q; duplicación 3q; delección 7q; monosomía 7.

Abstract

Fanconi anemia is the most common hereditary bone marrow failure syndrome; in these patients usually develops progressively, and hematological complications may worsen during adolescence and early adulthood, leading to the development of neoplasm-associated conditions such as myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. The onset and evolution toward neoplasia in Fanconi anemia, has been associated with losses and gains of chromosomal regions, and can be monitored by searching for clonal cytogenetic alterations located on chromosomes 1, 3 and 7 being characteristic of the disease. In this article, we present the methodology used by our laboratory to detect and monitor chromosome alterations, using banding GTG and fluorescence *in situ* hybridization techniques. This strategy represents a cost-effective way to perform longitudinal monitoring of changes in the bone marrow of patients, which, together with morphological analysis and monitoring of peripheral blood counts, allows timely therapeutic decisions to be made, such as programming transplantation of hematopoietic stem and progenitor cells, when possible.

KEYWORDS: Fanconi anemia; bone marrow failure; duplication 1q; duplication 3q; deletion 7q; monosomy 7.

¹ Laboratorio de citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

² Laboratorio de oncología experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

³ Posgrado en Ciencias biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

⁴ Departamento de Medicina genómica y toxicología ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

Recibido: 05 de diciembre 2023

Aceptado: 11 de junio 2024

Correspondencia

Sara Frias
sarafrías@iibiomedicas.unam.mx

Este artículo debe citarse como: Sánchez S, Reyes P, Mejía-Barrera MA, Paz-Martínez A, Frias S. Anemia de Fanconi, Parte 3. Seguimiento citogenético en médula ósea de pacientes con anemia de Fanconi. Acta Pediatr Mex 2024; 45 (4): 343-368.

VITERNUM

Es el estimulante fisiológico del apetito



El niño gana peso entre los 30 y 60 días

Con **VITERNUM** el niño mejora el apetito y la tensión materna disminuye sustancialmente, rompiendo el círculo vicioso del niño que no come.

Mejora el estado nutricional del niño con desnutrición

Facilita el aumento en la talla



Revisar IPP:



VITE-01A-19
NO. DE ENTRADA: 173300202C4471

1. Generalidades

La anemia de Fanconi (AF) (OMIM: 227650) es un síndrome de inestabilidad genómica asociado a anomalías en el desarrollo, falla de la médula ósea (MO) y predisposición a cáncer.^{1,2} Hasta la fecha se han descrito variantes patogénicas germinales asociadas a pacientes con AF, en al menos 22 genes (*FANCA* a *FANCW*), cuyos productos proteicos participan en la vía FA-BRCA, una ruta que asiste en la reparación y replicación del DNA, además de otros procesos celulares.³

Las células de los pacientes con AF se caracterizan por su hipersensibilidad a agentes inductores de enlaces cruzados intercatenarios (ICL, del inglés *interstrand crosslink*), un tipo de lesión altamente tóxica que impide la separación de las hebras de DNA.^{4,5} Los ICL pueden generarse por exposición ambiental, como en el caso del consumo de alimentos que contienen psoralenos naturales y aldehídos, (bebidas alcohólicas), dietas altas en grasa, estrógenos y nitrosaminas (tabaco).^{6,7} Por otra parte, diversas drogas anticancerígenas, como el cisplatino, la mitomicina C (MMC) y algunas mostazas nitrogenadas, también generan ICL.^{8,9}

La falla de la vía FA-BRCA, que constituye el principal mecanismo para la reparación de los ICL, tiene como consecuencia la formación de aberraciones cromosómicas (AC) estructurales, que son distintivas del fenotipo celular de la AF. Por esta razón, en la prueba citogenética para el diagnóstico se cuantifican rupturas en los cromosomas, figuras radiales de intercambio, cromosomas en anillo, dicéntricos, etc. en linfocitos expuestos a diepoxibutano (DEB) o MMC.^{10,11}

La AF es el síndrome de falla medular (FM) hereditario más frecuente.² En la FM se presenta una producción disminuida de uno o más de los principales linajes hematopoyéticos, debido a la insuficiencia o ausencia de precursores hemato-

poyéticos en la MO. La FM se presenta en más del 75% de los pacientes con AF, generalmente en la primera década de la vida, con conteos sanguíneos inferiores a los valores normales para la edad.^{1,2,12-15} La FM puede ser clasificada en tres grandes categorías, de acuerdo al grado de citopenia observada.^{16,17} (**cuadro 1**)

Las alteraciones hematológicas en los pacientes con AF pueden agravarse hasta el desarrollo de condiciones asociadas a neoplasias, como los síndromes mielodisplásicos (SMD) y/o leucemia mieloide aguda (LMA).^{2,18} Se ha postulado que la inestabilidad genómica, en combinación con la inflamación crónica en la MO, inherentes a la AF, representan una fuerte presión selectiva para la evolución de clonas malignas.¹⁸

En la AF se ha reportado una incidencia acumulada de SMD de 50% para los 50 años, mientras que la LMA se ha estimado cercana al 5% para los 30 años.¹ Aunque la LMA puede diagnosticarse *de novo*, sin alteración hematológica previa, frecuentemente se desarrolla a partir de SMD en la adolescencia, debido al incremento gradual de la proporción de blastos a través del tiempo. La mediana de edad del SMD oscila entre los 13-15 años, mientras que para la LMA se encuentra al inicio de la adultez temprana, entre los 17-19 años.^{1,18,19} Es importante mencionar que en pacientes con AF, la LMA es más común que la leucemia linfoblástica aguda y los linfomas, los cuales han sido excepcionalmente reportados.^{14,18}

2. Alteraciones citogenéticas clonales y no clonales de evolución a SMD/LMA en pacientes con AF

El análisis citogenético en muestras de MO a lo largo de diferentes cohortes de pacientes con AF ha permitido la detección de anomalías en el cariotipo, asociadas a la transformación premaligna o maligna, que se van adquiriendo durante el desarrollo de SMD y de LMA. El

Cuadro 1. Severidad de la falla medular (modificada de Camitta et al, 1979)

| | Leve | Moderada (hipoplásica o anemia aplásica) | Severa (anemia aplásica severa) |
|--------------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------|
| Conteo absoluto de neutrófilos | <1,500/mm ³ | <1,000/mm ³ | <500/mm ³ |
| Conteo de plaquetas | 150,000-50,000/mm ³ | <50,000/mm ³ | <30,000/mm ³ |
| Nivel de hemoglobina | ≥8 g/dL* | <8 g/dL | <8 g/dL |

* Menor de lo normal para la edad, pero >8 g/dL.

riesgo estimado de desarrollar SMD o LMA, tres años después de la observación de un evento clonal (independientemente del cromosoma involucrado) es del 35%.¹² Por estas razones, el seguimiento citogenético ha mostrado tener un gran impacto sobre el pronóstico y la toma de decisiones terapéuticas en la enfermedad.

Se han caracterizado un amplio espectro de AC, dentro de las cuales son comunes las translocaciones desbalanceadas, así como las deleciones y duplicaciones parciales.¹⁸ Las AC asociadas con mayor frecuencia a la evolución clonal hacia SMD y LMA en la AF, han sido la duplicación en una porción del brazo largo del cromosoma 1 (1q+), la duplicación parcial del cromosoma 3 (3q+) y la monosomía 7 (-7) o la pérdida parcial en el brazo largo de este cromosoma (7q-).^{20,21} En menor frecuencia han sido reportadas alteraciones en 21q22 (*RUNX1*) así como deleciones parciales en 5q, 13q y 20q.^{18,22,23}

La heterogeneidad de estos cambios pone de manifiesto la necesidad de abordar el análisis cromosómico mediante técnicas de citogenética clásica y molecular. Por ejemplo, las ganancias en 1q o las pérdidas en 7q pueden detectarse mediante técnicas de bandeado con tinción de Giemsa (bandeo GTG), mientras que las ganancias en 3q o las alteraciones en 21q22 suelen requerir ensayos de mayor resolución, como la hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés) o la hibridación *in situ* fluorescente en interfase (iFISH, por sus siglas en inglés). Esta última ha resultado especialmente

útil para la detección de poblaciones clonales incipientes.¹⁸

Por otro lado, durante el análisis del cariotipo pueden encontrarse alteraciones cromosómicas no clonales; la investigación en modelos celulares de inmortalización espontánea sugiere que estos cambios constituyen eventos celulares tempranos, que representan la transición hacia el establecimiento final de un estado clonal permanente.^{24,25}

Actualmente, la guía de manejo de pacientes con AF sugiere que las ganancias en 1q, 3q y la pérdida parcial o total del cromosoma 7 (7q-/-7), que comprenden la mayoría de las alteraciones clonales detectadas en los pacientes con AF, se busquen de manera dirigida mediante iFISH en un número elevado de células, con el fin de detectar su presencia aún si están en baja proporción.²⁰

3. Análisis de muestras de médula ósea de pacientes con AF por citogenética convencional y molecular

En pacientes con diagnóstico confirmado de AF, se recomienda realizar una revisión anual de la MO, que incluya tanto la evaluación de la arquitectura y celularidad del tejido, para considerar cambios morfológicos asociados a displasia, como el cariotipo, a fin de detectar alteraciones citogenéticas asociadas SMD y LMA. Con base en los resultados obtenidos de estos estudios, el lapso para el seguimiento posterior puede ser menor a un año.^{10,20}

La metodología que se utiliza en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría de México para el análisis citogenético de la MO en estos pacientes se realiza siguiendo un esquema general. **Figura 1**

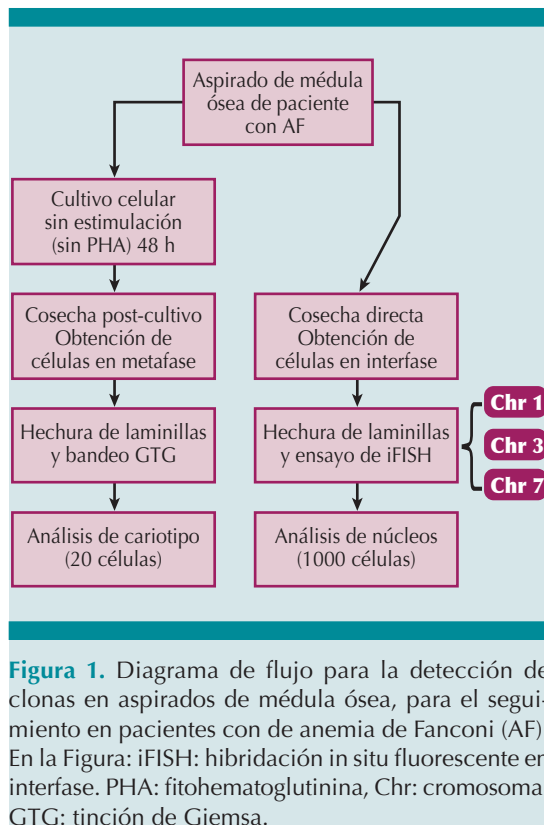
La metodología detallada, se presenta a continuación.

3.1 Muestras Biológicas

Los aspirados de MO deben tomarse en tubos que utilicen heparina sódica como anticoagulante (tapa verde). Se necesitan al menos 3 ml de la muestra.

3.2 Soluciones y reactivos:

- Medio para MO MarrowMax (INVITROGEN).



- Colcemida [10 µg/mL] (KaryoMax, GIBCO).
- Solución hipotónica: Cloruro de potasio (KCl) [0.075 M].
- Solución fijadora de Carnoy: Metanol: Ácido acético, proporción 3:1 v/v.
- Solución amortiguadora de Gurr: Diluir 1 pastilla Gurr™ (INVITROGEN) en 1 L de solución isotónica (cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%, pH final de la solución: 7.2).
- Solución de Tripsina/EDTA para bandeo cromosómico: Diluir 0.015 g de tripsina (1:250, GIBCO) + 0.01 g de EDTA (Sigma-Aldrich) en 50 mL de solución amortiguadora de Gurr.
- Amortiguador Sörensen: Diluir 2.56 g de fosfato de sodio dibásico + 6.63 g de fosfato de potasio en 1 L con H₂O destilada.
- Solución de tinción de Wright: Mezclar 25 mL de azul-eosin metileno (tinción de Wright, MERCK) con 25 ml de solución Sörensen.
- Solución de tinción de Giemsa: Mezclar 15 mL de solución para tinción de Giemsa (MERCK) con 35 mL de solución Sörensen.
- Solución de pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich): Diluir una alícuota [0.5mg/mL] en 40 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0.01 N (concentración final: 2.5x10⁻⁵ g/mL).
- Solución fijadora de Formaldehído: Mezclar 1 mL de formaldehído al 37% con 0.18 g de cloruro de magnesio (MgCl₂). Completar con 39 mL de amortiguador de fosfatos salino (PBS) 1X.
- Solución salina de Citrato de Sodio 2X (2X SSC): Diluir 100 mL de 20X SSC

(Sigma-Aldrich) en 900 mL de H₂O destilada.

Lavados post hibridación FISH:

- Solución de lavado 1 (0.4X SSC/0.3%Igepal): Mezclar 20 mL de 20X SSC con 950 mL de H₂O destilada. Añadir 3 mL de Igepal (Sigma-Aldrich). Aforar a 1L con H₂O destilada.
- Solución de lavado 2 (2X SSC/0.1% Igepal): Mezclar 100 mL de 20X SSC con 850 mL H₂Odestilada. Añadir 1 mL de Igepal (Sigma-Aldrich). Aforar a 1L con H₂O destilada.
- Alcoholes graduales: Preparar tres soluciones de etanol/agua destilada en las siguientes proporciones v/v: 70%, 85% y 100%.
- Medio de contratinción preparado con 95 µL de medio de montaje para fluorescencia Vectashield (VECTOR Laboratories) + 5 µL medio de montaje para fluorescencia Vectashield con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (VECTOR Laboratories).

3.3. Procedimientos

3.3.1 Cultivo celular de MO para obtención de metafases.

1. En un tubo cónico de centrífuga (15 mL), estéril, agregar 1 mL de aspirado de médula ósea a 5 mL de medio MarrowMax, previamente calentado a 37°C. Incubar durante 48 h, a 37°C. De ser posible, hacerlo por duplicado.
2. Agregar 60 µL de Colcemida e incubar de 2 h a 37°C.
3. Centrifugar a 500xg durante 10 min. Retirar con pipeta Pasteur el sobrenadante (SN), sin resuspender el paquete celular.

4. Resuspender el paquete celular y agregar 8 ml de solución hipotónica a 37°C, incubar por 30 min.
5. Para fijar los cultivos, agregar 1 mL de solución fijadora de Carnoy a 4°C y mezclar por inversión.
6. Centrifugar a 500xg durante 10 min, desechar el SN y resuspender el paquete celular.
7. Agregar 8 mL de solución fijadora de Carnoy a 4°C, mezclar bien y centrifugar a 500xg durante 10 min.
8. Repetir los pasos 6 y 7, hasta obtener un paquete celular blanco y SN transparente. Las muestras se pueden almacenar a 4°C, hasta el momento de la preparación de las laminillas.

3.3.1.1 Preparación de laminillas para bandeo cromosómico

Nota: Utilizar portaobjetos de vidrio de 25mm x 75mm, lavados y conservados en refrigeración en metanol al 2%.

1. Retirar el SN del tubo ya cosechado, hasta conservar aproximadamente 0.5-1 mL de fijador (de acuerdo al tamaño del paquete celular). Resuspender con pipeta Pasteur y colocar 2 o 3 gotas de la suspensión sobre el portaobjetos. Durante este paso, evite la superposición de las gotas. Dejar secar.
2. Evaluar la calidad y cantidad de las metafases obtenidas en un microscopio con contraste de fases. Dependiendo de esta evaluación preliminar, estimar el número de laminillas a gotear por paciente. Regularmente, se realizan de 3 a 5 laminillas por muestra.
3. Etiquetar y colocar los portaobjetos en una placa térmica o estufa a 50°C-60°C

durante 24 h, para deshidratar la laminilla.

3.3.1.2 Bando cromosómico (Bandas GTG)

Nota: Para este procedimiento se recomienda usar vasos de tinción tipo Coplin (o similar), con las siguientes soluciones:

- a) Tripsina/EDTA.
 - b) Solución amortiguadora de Gurr, para enjuague.
 - c) Solución amortiguadora de Gurr.
 - d) Solución de tinción de Wright.
 - e) Solución de tinción de Giemsa.
 - f) Agua de la llave (doméstica).
4. La laminilla se introduce en la solución a) por 30 s - 60 s a temperatura ambiente.
 5. Enjuagar brevemente en la solución b).
 6. Colocar la laminilla en la solución c) durante 5 min.
 7. Teñir las preparaciones con tinción de Wright y tinción de Giemsa durante 30 s y 2 min respectivamente, enjuagar con agua de la llave y dejar secar.
 8. Evaluar al microscopio de luz en campo claro y almacenar las laminillas hasta el momento del análisis.

3.3.1.3 Análisis

Se deben analizar al menos 20 metafases, de acuerdo a los lineamientos descritos en el manual "*International System for Human Cytogenetics Nomenclature*" (ISCN, por sus siglas en inglés), considerando los conceptos de clonalidad citogenética descritos en el capítulo de neoplasias.²⁶

3.3.2 iFISH en muestras de MO

3.3.2.1 Cosecha directa de MO

1. En un tubo de centrifuga cónico (15 mL), estéril, agregar 1-1.5 mL del aspirado de MO a 8 mL de solución hipotónica. Incubar a 37°C durante 45 min.
2. Reproducir el protocolo de la sección 3.3.1, a partir del paso 5.

3.3.2.2 Laminillas para iFISH

1. Las laminillas se preparan de la misma manera que en el paso 1 de la sección 3.3.1.1
2. Evaluar a través de un microscopio de luz la refringencia y cantidad de citoplasma en las células, utilizando el contraste de fases. Ocasionalmente se requieren tratamientos enzimáticos adicionales para la eliminación de citoplasma y/o descondensación de los núcleos. Si los núcleos se observan grises y libres de citoplasma, continuar con la maduración de la laminilla (paso 1 de la siguiente sección).
3. Si las células se observan refringentes, tratar enzimáticamente con la solución de pepsina a 37°C, por 10 s-20 s. El tiempo de tratamiento dependerá del grado de refringencia observado previamente, a mayor refringencia, mayor tiempo.
4. Lavar las laminillas con PBS 1X durante 10 min.
5. Fijar las laminillas en solución de formaldehído durante 10 min.
6. Lavar las laminillas en PBS 1X nuevo durante 10 min.
7. Deshidratar las laminillas en soluciones de alcohol graduales (70%, 85% y

100%) durante dos minutos cada una y dejar secar.

3.3.2.3 Procedimiento de tinción para iFISH

Nota: Se sugiere el uso de sondas para las regiones específicas 1q25 (con sonda control 1p36), 3q27 (*BCL6*, tipo *break apart*), CEP7 (centrómero del cromosoma 7) con región específica en 7q31; para hacer tres diferentes ensayos multicolor.¹⁹ Para los pasos de lavado, se recomienda el uso de frascos de tinción tipo Coplin (o similar).

1. Maduración. Incubar las laminillas en una solución 2X SSC durante 30 minutos, a 37 °C. Posteriormente, deshidratar las laminillas en alcoholes graduales (70%, 85% y 100%) por dos minutos cada uno, y dejar secar.
2. Preparar la mezcla de la sonda de elección, según las instrucciones del proveedor. Colocar la mezcla sobre la laminilla, en la zona de hibridación seleccionada y tapar con un cubreobjetos de 22x22 mm. Sellar alrededor del cubreobjetos con pegamento plástico.
3. Codesnaturalizar la sonda y el DNA de las células en la laminilla, colocándola en una placa caliente a 75°C por 1.5 min.
4. Hibridación. Incubar en cámara húmeda a 37°C durante toda la noche (mínimo 6 horas).
5. Lavados post-hibridación. Precalear la solución de lavado 1 a 72°C (\pm 2°C), retirar el pegamento plástico y el cubreobjetos, introducir la laminilla en la solución de lavado 1, por 2 min. La temperatura y el tiempo en este paso son de suma importancia, ya que de esto depende la limpieza y calidad de la señal fluorescente obtenida.

6. Pasar la laminilla a la solución de lavado 2 a temperatura ambiente, durante 2 min, dejar escurrir.
7. Sin permitir que la laminilla llegue a secarse, colocar 10 μ l de medio de contratinción vectashield/DAPI en un cubreobjetos y colocarlo sobre la región hibridada de la laminilla. Eliminar el exceso haciendo una ligera presión con papel absorbente.
8. Conservar las laminillas a 4°C, protegidas de la luz, hasta el momento de su análisis en el microscopio de fluorescencia.

3.3.2.4 Criterios de análisis para iFISH

Para este paso se requiere de un microscópico de epi-fluorescencia, equipado con filtros de fluorescencia y con contraste de fases integrado. Se requiere que, además de los filtros individuales, se disponga de filtros cuya óptica permita la detección simultánea de varias longitudes de onda (conocidos como “filtros dobles, o de triple banda”). De esta manera, la selección de los fluoróforos empleados debe fundamentarse en el espectro de excitación y emisión que será reconocido por el microscopio. Usualmente, las señales de las sondas disponibles comercialmente son capturadas en diversos colores del espectro visible (como rojo, verde, azul, naranja, entre otros). Adicionalmente, se requiere también un objetivo 100X con contraste de fases (lente PH3).

Criterios de Evaluación:²⁷

- La laminilla debe tener una eficiencia de hibridación mayor al 95%
- Considerar sólo núcleos con bordes intactos, sin superposición de otros núcleos. Si los bordes de la célula se observan discontinuos o difusos, esa célula debe omitirse.

- Para que una señal sea cuantificada, su dominio debe estar separado de otra señal (detectada con la misma fluorescencia), por una distancia mayor a la mitad del diámetro de un dominio fluorescente. Esta señal debe distinguirse claramente dentro de la célula, verificando que dicha señal no sea producto de algún artefacto, mediante observación bajo contraste de fases.
- En caso de encontrar un número de dominios fluorescentes diferente al esperado para la región analizada (es decir, dominios extras o la falta de ellos), esta alteración será cuantificada de acuerdo a lo anterior, considerando que las células deben estar ubicadas en zonas de la laminilla con hibridación efectiva y uniforme.

Para la búsqueda de amplificaciones o deleciones, se emplea un ensayo constituido por una mezcla de dos fluorocromos diferentes sobre el mismo cromosoma. De esta manera, una señal debe hibridar sobre la región de interés, mientras que la otra hibrida en una zona centromérica o en un locus específico (considerada como "sonda control"). Este sistema de detección resulta también útil para la identificación de aneuploidías.

Por otra parte, las sondas tipo "break apart" están diseñadas para hibridar sobre dos zonas cercanas de un mismo gen. Cada una de estas zonas está marcada de manera diferencial con un fluorocromo (por ejemplo, verde y rojo). Cuando la estructura de la región cromosómica permanece intacta, usualmente la señal roja y verde se superponen, y se observa la presencia de una señal amarilla completa o parcial en la zona de superposición. Cuando ocurre una ruptura en la secuencia, las señales ya no permanecen juntas, observándose como señales roja y verde separadas.

Para el iFISH se aconseja analizar un mínimo de 1000 células por ensayo. En el caso particular de la AF, debido a la inestabilidad cromosómica, se ha sugerido que deben detectarse valores $\geq 10\%$ de células con alteración, para que se consideren como una clona anormal.²⁰ Sin embargo, se recomienda que cada laboratorio establezca su propio valor de corte, mediante el estudio de cada sonda en población sana. Basados en esta estrategia, nuestro equipo de trabajo reconoce una población clonal cuando el cambio está presente en una proporción $\geq 5\%$ de las células analizadas. **Figura 2**

3.4 Reporte de hallazgos

El informe final para las metodologías que hemos descrito (iFISH y bandas GTG), se debe realizar de acuerdo a la versión más actualizada del manual ISCN. El informe debe abordar las siguientes consideraciones:

- Nombre del paciente, edad, fecha de nacimiento y fecha de toma de la muestra
- Documentar el número total de células analizadas, con descripción de las alteraciones clonales cromosómicas numéricas y estructurales.
- Además de las alteraciones clonales, se recomienda documentar en un registro del laboratorio, las no clonales (de célula única).
- Se sugiere el uso de comentarios, en un texto pequeño, sobre la relevancia de las alteraciones clonales encontradas (si es el caso), a fin de orientar a los médicos tratantes sobre las decisiones terapéuticas futuras.

A fin de ilustrar el uso de las fórmulas citogenéticas, a continuación, se describen figuras y fórmulas con algunos ejemplos: **Figura 3**

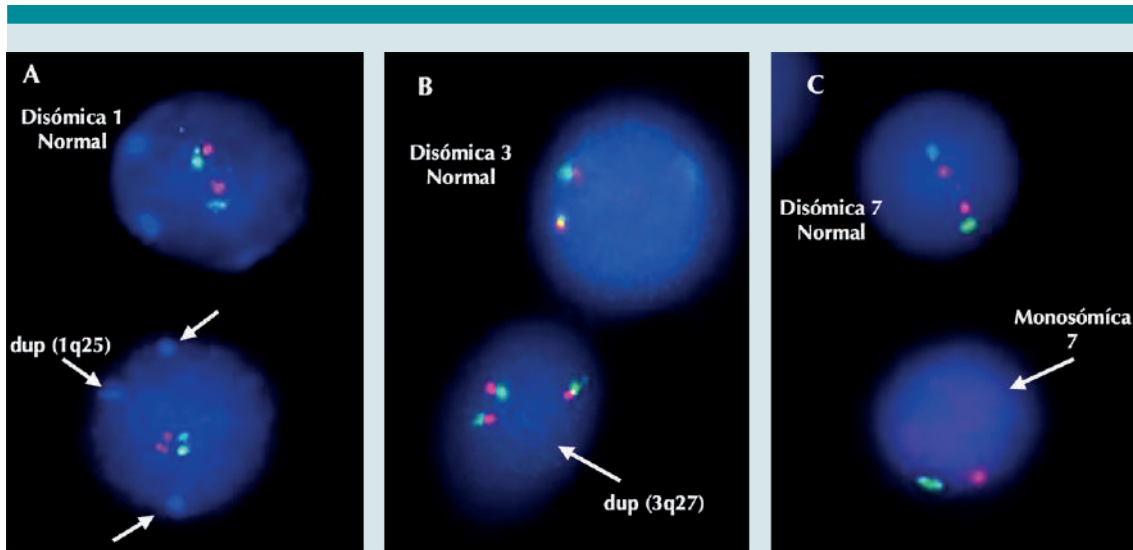


Figura 2. Ensayos de FISH en células en interfase. A) Ensayo para la detección del cromosoma 1 en sus regiones 1p36(rojo) 1ptel(verde) y 1q25 (aqua), se observa célula con dup(1q25) (flechas). B) Ensayo para detección de la región 3q27 (extremo 3' en verde y extremo 5' en rojo), presencia de célula con dup(3q27) (flecha). C) Ensayo para detección del centrómero del cromosoma 7 (verde) y la región 7q31 (rojo), se observa una célula con monosomía 7 (flecha).

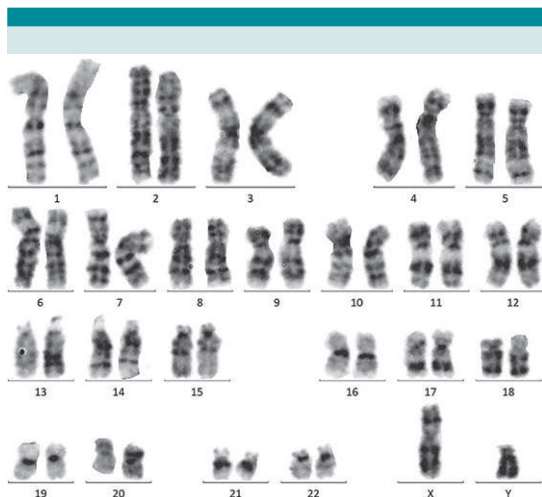


Figura 3. Cariotipo normal en médula ósea de paciente con AF: 46, XY.

Cariotipo: 46,XY[20]

Frecuencia de aberraciones cromosómicas = 0.08 ab/célula

Comentario:

Cariotipo normal sin alteraciones cromosómicas clonales, en 20 células analizadas. La inestabilidad cromosómica, al igual que las rupturas reportadas, son hallazgos esperados debido al diagnóstico de AF. Se sugiere seguimiento con cariotipo con bandas GTG y FISH para cromosomas 1, 3 y 7 en MO, anual o antes de acuerdo a la evolución hematológica del paciente y a la decisión del médico tratante.

Figura 4

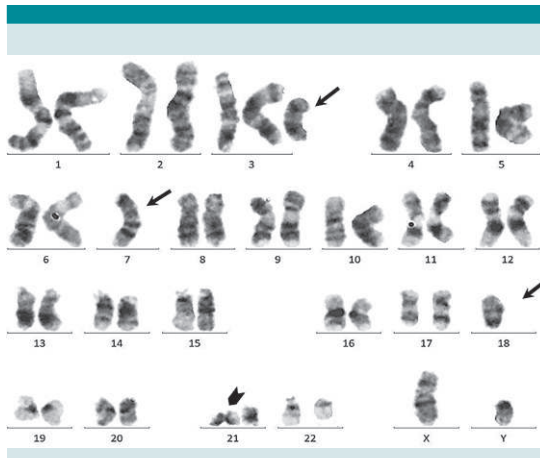


Figura 4. Cariotipo en médula ósea de paciente con AF. Flechas: Se observan diversas alteraciones que involucran a los cromosomas 3 y 7 que son marcadores genéticos de progresión a SMD o LMA y además al cromosoma 18. Cabeza de flecha: ruptura cromatídica. 45,XY,-7,-18, +der(3?)(p12).

Cariotipo: 45,XY,-7,-18, +der(3?)(p12)[15]/45, idem,-21,+mar1[3]/45,idem,-13,+mar2[1]/ 45, idem,dcl(2)(p23)[1]

Comentario:

Presencia de clones celulares con aberraciones numéricas y estructurales de riesgo para desarrollar leucemia mieloide aguda y/o síndrome mielodisplásico. Las alteraciones clonales encontradas corresponden a ganancia de 3q y a monosomía 7, las cuales se han asociado con un mayor riesgo de SMD/LMA en pacientes con AF, además de pérdida del cromosoma 18. Se sugiere seguimiento clínico cercano.

El ejemplo 2 presenta un paciente que tiene una clona con alteraciones cromosómicas asociadas al desarrollo de LMA y/o SMD en AF, de la cual se origina por lo menos una subclona celular extra; adicionalmente, muestra una monosomía del cromosoma 18 y alteraciones de célula única que pueden derivar de la línea celular principal (mainline) o bien de una subclona.

4. Papel de las alteraciones citogenéticas en la evolución de la médula ósea de AF hacia síndrome mielodisplásico/leucemia mieloide aguda

Aunque no se tiene del todo claro como la inestabilidad cromosómica contribuye a la progresión de la FM hacia neoplasias mieloides, actualmente se tienen observaciones importantes al respecto. Algunos reportes indican que la presencia de pérdidas y ganancias de regiones cromosómicas en la AF juegan un papel más importante respecto al inicio de la evolución clonal, que los cambios del tipo mutaciones puntuales.^{22,23,28} Estas alteraciones en los brazos cromosómicos, producto de translocaciones no balanceadas y otras alteraciones estructurales, conducen a cambios en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés) que se acumulan progresivamente durante la FM, y son mucho más frecuentes en AF que en casos de LMA esporádicos no relacionados con la AF.²³ Estas CNV usualmente se detectan como AC y como se ha mencionado anteriormente, las más frecuentes en la evolución hacia SMD/LMA son las duplicaciones en 1q y 3q, así como la pérdida total del cromosoma 7 o de sus brazos largos que representan cerca del 75% de las anomalías cromosómicas presentes en la MO de los pacientes con AF.²⁹

Actualmente se ha demostrado que la aparición de una duplicación en el brazo largo del cromosoma 1, específicamente en la región 1q32, implica el incremento de dosis génica del gen *MDM4*, un modulador negativo del gen supresor de tumores *TP53*. El análisis longitudinal de muestras de pacientes con AF a través de la combinación de arreglos de CGH, secuenciación masiva de DNA y RNA, y citogenética, revela que la vía de p53 se atenúa por la presencia de 1q+, durante la transición clonal, que se presenta como un evento temprano, previo a la expansión de blastos. Así, 1q+/MDM4 actúa como un "switch" de la expansión clonal, que

no induce directamente el cáncer, pero conduce a la MO hacia un estado pre-leucémico. El aumento lineal en el número de blastos, ocurre posteriormente, luego de la aparición de otros eventos clonales, como +3q o -7q.²³

La aparición de 3q+ favorece la activación de *EV11*, un gen que codifica para un factor de transcripción y cuya sobreexpresión correlaciona con una forma agresiva y de mal pronóstico de la LMA.^{30,31} Por otra parte, las alteraciones en el cromosoma 7 (-7/7q-) se encuentran asociadas a mal pronóstico en neoplasias mieloides, con una alta prevalencia entre los casos pediátricos con SMD, frecuentemente asociados a síndromes de FM. Sin embargo, a pesar de que se han propuesto varios genes candidatos para determinar el rol de estos cambios en la leucemogénesis, su rol no ha sido elucidado.^{32,33} En la AF se ha propuesto que las alteraciones en 3q y 7/7q- representan un mayor riesgo de desarrollar SMD o LMA, y se sugiere que los pacientes con anomalías en el cromosoma 7 deben ser remitidos a trasplante de MO, del mismo modo que si se observa una clona con presencia de duplicación 3q en expansión.^{20,34}

Finalmente, los cambios que involucran al gen *RUNX1* (ubicado en 21q22) han sido asociados con estadios más avanzados del SMD y a la progresión hacia la LMA en AF. Estos cambios pueden estar acompañados de alteraciones en genes de la vía RAS, lo cual contrasta con la presentación “clásica” del SMD en adultos. En modelos experimentales, se ha encontrado que variantes en este gen contribuyen a la desregulación del ciclo celular en G1/S y a la activación de la señalización inmune innata en la AF.^{28,35} Otras alteraciones menos frecuentes, como deleciones en 20q, 11q, 5q y la trisomía 8, también se han reportado en la ruta de la evolución blástica hacia LMA.²³

Todos estos datos indican que el seguimiento citogenético longitudinal de la MO de los

pacientes AF es indispensable para detectar estos cambios cromosómicos que junto con el monitoreo hematológico de la MO permitirán tomar decisiones oportunas para el manejo de la enfermedad.

5. Sobre el seguimiento y tratamiento de los pacientes con AF

La revisión celular morfológica y citogenética de manera seriada en muestras de MO persigue identificar la evolución clonal hacia SMD o LMA, complementando los hallazgos presentes en conteos sanguíneos periféricos. En adición, algunos autores abogan por el uso del conteo de blastos en sangre periférica, en conjunto con un sistema de clasificación que asigne un efecto potencial de las alteraciones citogenéticas que pudiesen encontrarse en los pacientes, para facilitar la toma de decisiones terapéuticas.³⁶ Durante el manejo de pacientes con AF se recomienda un monitoreo hematológico para evaluar los conteos sanguíneos cada 3 o 4 meses, así como un aspirado de MO anual (o más frecuente si la FM ya está presente), para evaluación morfológica y citogenética.³⁷ En esta última, se debe considerar la búsqueda de alteraciones cromosómicas estructurales por cariotipo, así como de las alteraciones específicas conocidas por iFISH.³⁸ **Cuadro 2**

Actualmente la citogenética convencional, puede complementarse con metodologías como FISH Multiplex (M-FISH), microarreglos basados en CGH, microarreglos de SNP, o secuenciación masiva.^{23,29,39,40} Sin embargo, a pesar de que estas metodologías refinan el estudio y sin duda pueden aportar información adicional, la evaluación de la expansión clonal asociada a la progresión neoplásica en muestras de MO por bandeado GTG y por iFISH, producen resultados confiables y a bajo costo, siendo técnicas que pueden encontrarse al alcance de laboratorios de citogenética en países en desarrollo.

Hoy en día, la opción terapéutica más recomendada contra las complicaciones hematológicas en la AF es el trasplante de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (TCPH). Un estudio llevado a cabo en más de 100 pacientes con AF trasplantados, develó que los pacientes que sólo presentaban anomalías citogenéticas en la MO tenían una mejor tasa de supervivencia que aquellos que ya habían avanzado a SMD o LMA.⁴¹

Debido a la repercusión que los resultados citogenéticos tienen sobre el pronóstico y tratamiento del paciente y sobre su posibilidad de inclusión dentro de un protocolo de TCPH, se aconsejan los siguientes períodos de valoración para su realización. **Cuadro 2**

En el contexto del paciente con AF, la detección de anomalías citogenéticas es de particular interés, porque la inestabilidad cromosómica intrínseca de estos pacientes favorece la evolución clonal. Dicho seguimiento, a través de las técnicas descritas en el presente artículo, permite respaldar una vigilancia hematológica más estrecha, que facilite el estudio de la progresión clonal en los pacientes, con énfasis en las fases tempranas de la malignización, para que la intervención médica, a través del TCPH, cuando sea posible, ocurra de forma oportuna.

Cuadro 2. Evaluación y seguimiento hematológico de pacientes con AF (Modificada de (Sroka et al., 2020))

| Evaluación | | | Seguimiento | |
|---------------------------------------|------------------------|---|--------------------------------|--|
| Estabilidad de los conteos sanguíneos | Clasificación de la FM | Alteraciones citogenéticas clonales (duplicación 1q,3q, monosomía 7q o total) | Análisis de conteos sanguíneos | Análisis morfológico y Citogenético de la MO |
| Estable | Sin FM, o Leve | Ausente | Cada 3-4 meses. | Anual |
| Estable | Sin FM, o Leve | Presente* | Cada 3 meses | Cada 3-6 meses. |
| Inestables | Moderada o Severa | Ausente | Cada 3 meses | Anual** |
| Inestables | Moderada o Severa | Presente | Cada 1-2 meses. | Revisión inmediata |

*En ausencia de SMD morfológico. ** Realizar antes, si los conteos sanguíneos sugieren progresión a SMD/LMA.

Financiamiento:

Esta investigación fue parcialmente financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), proyecto número CF-2023-G-800; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (proyecto PAPIIT IN205120) y por el Instituto Nacional de Pediatría, Recursos Fiscales E022 proyecto INP 2020/012.

Agradecimientos:

Antonio Paz-Martínez agradece el apoyo del CONAHCYT, a través de la beca 762510 para desarrollar su Maestría en Ciencias Biológicas.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés. Los financiadores no tuvieron ningún papel en el diseño o la redacción del manuscrito.

REFERENCIAS

- Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in the national cancer institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica*. 2018 Jan 1;103(1):30–39. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.178111>.
- Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev*. 2010 Apr 24;24(3):101–122. <https://doi.org/10.1016/j.bre.2010.03.002>.

3. Rodriguez A, D'Andrea A. Fanconi anemia pathway. *Curr Biol*. 2017 Sep 25;27(18):R986–R988. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.043>.
4. Bhattacharjee S, Nandi S. DNA damage response and cancer therapeutics through the lens of the Fanconi Anemia DNA repair pathway. *Cell Commun Signal*. 2017 Oct 10;15(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0195-9>.
5. Rodriguez A, Sosa D, Torres L, Molina B, Frias S, Mendoza L. A Boolean network model of the FA/BRCA pathway. *Bioinformatics*. 2012 Mar 15;28(6):858–866. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts036>.
6. Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: Implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*. 2005 Apr;35(3):187–193. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.03.009>.
7. Mizumoto A, Ohashi S, Hirohashi K, Amanuma Y, Matsuda T, Muto M. Molecular mechanisms of acetaldehyde-mediated carcinogenesis in squamous epithelium. *Int J Mol Sci*. 2017 sep 10;18(9):1943. <https://doi.org/10.3390/ijms18091943>.
8. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 June 24; 11(7):467–480. <https://doi.org/10.1038/nrc3088>.
9. Rodriguez A, Torres L, Juarez U, Sosa D, Azpeitia E, Teresa BG, Cortes E, Ortiz R, Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Mendoza L, Frias S. Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process. *Theor Biol Med Model*. 2015 Sep 18;12(1):1–22. <https://doi.org/10.1186/s12976-015-0011-4>.
10. García-De-teresa B, Rodríguez A, Frias S. Chromosome instability in fanconi anemia: From breaks to phenotypic consequences. *Genes*. 2020 Dec 2;11(12):1–35. <https://doi.org/10.3390/genes11121528>.
11. Meetei AR, De Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, Van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*. 2003 Sep 14;35(2):165–170. <https://doi.org/10.1038/ng1241>.
12. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*. 1994 Sept 1;84(5):1650–1655.
13. Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: New players and new functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 May 5;17(6):337–349. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.48>.
14. Kutler DI, Singh B, Satagopan J. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1249–1256.
15. Moore C, Krishnan K.. Bone marrow failure. *Treasure Island (FL): StatPearls*. Epub 2021.
16. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Santos G, Gordon-Smith EC, Gale RP, Rapoport JM, Starb R. Severe Aplastic Anemia: A Prospective Study of the Effect of Early Marrow Transplantation on Acute Mortality. *Blood*. 1976 Jul. 48(1):63–70.
17. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Gale RP, Kopeccky KJ, Rapoport JM, Santos G, Gordon-Smith EC, Starb R.. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. *Blood*. 1979 Mar;53(3):504–514. <https://doi.org/10.1182/blood.v53.3.504.504>.
18. Peffault de Latour R, Soulier J. How I treat MDS and AML in Fanconi anemia. *Blood*. 2016 Jun 16;127(24):2971–2979. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-583625>.
19. Altintas B, Giri N, McReynolds LJ, Best A, Alter BP. Genotype-phenotype and outcome associations in patients with Fanconi anemia: the National Cancer Institute cohort. *Haematologica*. 2023 Jan 1;108(1):69–82. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279981>.
20. Mehta PA, Harris RE, Davies SM, Kim MO, Mueller R, Lampkin B, Mo J, Myers K, Smolarek TA. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome-acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Dec;203(2):180–186. <https://doi.org/10.1016/j.cancer-gencyto.2010.07.127>.
21. Tonnies H, Huber S, Kuhl JS, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: Gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood*. 2003 May 15;101(10):3872–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3243>.
22. Quentin S, Cucchini W, Ceccaldi R, Nibourel O, Pondarre C, Pages MP, Vasquez N, D'Enghien CD, Larghero J, De Latour RP, Rocha V, Dalle JH, Schneider P, Michallet M, Michel G, Baruchel A, Sigaux F, Gluckman E, Leblanc T, Stoppa-Lyonnet D, Preudhomme C, Socie G, Soulier J. Myelodysplasia and leukemia of fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 2011 Apr 14;117(15):161–171. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-308726>.
23. Sebert M, Gachet S, Leblanc T, Rousseau A, Bluteau O, Kim R, Ben Abdelali R, Sicre de Fontbrune F, Maillard L, Fedronie C, Murigneux V, Bellenger L, Naouar N, Quentin S, Hernandez L, Vasquez N, Da Costa M, Prata PH, Larcher L, De Tersant M, Duchmann M, Raimbault A, Trimoreau F, Fenneteau O, Cucchini W, Gachard N, Auger N, Tueur G, Blanluet M, Gazin C, Souyri M, Langa Vives F, Mendez-Bermudez A, Lapillonne H, Lengline E, Raffoux E, Fenaux P, Ades L, Forcade E, Jubert C, Domenech C, Strullu M, Bruno B, Buchbinder N, Thomas C, Petit A, Leverger G, Michel G, Cavazzana M, Gluckman E, Bertrand Y, Boissel N, Baruchel A, Dalle JH, Clappier E, Gilson E, Deriano L, Chevret S, Sigaux F, Socie G, Stoppa-Lyonnet D, De The H, Antoniewski C, Bluteau D, Peffault de Latour R, Soulier J. Clonal hematopoiesis driven by chromosome 1q/MDM4 trisomy defines a canonical route toward leukemia in Fanconi anemia. *Cell Stem Cell*. 2023 feb 2;30(2):153-170.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.01.006>.
24. Heng HH, Regan SM, Liu G, Ye CJ. Why it is crucial to analyze non clonal chromosome aberrations or NCCAs? *Mol Cyto-*

- genet. 2016 Feb 13; 9(1):1–12. <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0223-2>.
25. Rangel N, Forero-Castro M, Rondon-Lagos M. New insights in the cytogenetic practice: Karyotypic chaos, non-clonal chromosomal alterations and chromosomal instability in human cancer and therapy response. *Genes*. 2017 Jun 3;8(6):2–29. <https://doi.org/10.3390/genes8060155>.
 26. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S(Eds.). *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. 1st ed. Karger; 2020. 156 p. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-06867-2>.
 27. Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, Monakhov VV, Kirillova EA, Soloviev IV, Yurov YB. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *J Histochem Cytochem*. 2005 Mar;53(3):375–380. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6424.2005>
 28. Chao MM, Thomay K, Goehring G, Wlodarski M, Pastor V, Schlegelberger B, Schindler D, Kratz C P, Niemeyer C. Mutational Spectrum of Fanconi Anemia Associated Myeloid Neoplasms. *Klin Padiatr*. 2017 Nov 13;229(6):329–334. <https://doi.org/10.1055/s-0043-117046>.
 29. Cioc AM, Wagne JE, MacMillan ML, DeFor T, Hirsch B. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: Morphologic and cytogenetic characteristics. *Am J Clin Pathol*. 2010 Jan 1;133(1):92–100. <https://doi.org/10.1309/AJCP7W9VMJENZOVG>.
 30. Groschel S, Lugthart S, Schlenk RF, Valk PJ, Eiwien K, Goudswaard C, Van Putten WJ, Kayser S, Verdonck LF, Lubbert M, Ossenkoppele GJ, Germing U, Schmidt-Wolf I, Schlegelberger B, Krauter J, Ganser A, Dohner H, Lowenberg B, Dohner K, Delwel R. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 22;28(12):2101–2107. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.0646>.
 31. Konantz M, André MC, Ebinger M, Grauer M, Wang H, Grzywna S, Rothfuss OC, Lehle S, Kustikova OS, Salih HR, Handgretinger R, Fend F, Baum C, Kanz L, Quintanilla-Martinez L, Schulze-Osthoff K, Essmann F, Lengerke C. EVI-1 modulates leukemogenic potential and apoptosis sensitivity in human acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013 Jul 25;27(1):56–65. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.211>.
 32. Inaba T, Honda H, Matsui H. The enigma of monosomy 7. *Blood*. 2018 Jun 28;131(26):2891–2898. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/131/26/2891/1465937/blood822262.pdf>.
 33. Schwartz JR, Ma J, Lamprecht T, Walsh M, Wang S, Bryant V, Song G, Wu G, Easton J, Kesserwan C, Nichols KE, Mullighan CG, Ribeiro RC, Klcó JM. The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes. *Nat Commun*. 2017 Nov 16;8(1):1557. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01590-5>.
 34. Neitzel H, Kuhl JS, Gerlach A, Ebell W, Tonnie H. *Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging*. Monog Hum Genet. Basel. Karger. 2007. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of fanconi anemia patients: Results and implications; p. 79–94. <https://doi.org/10.1159/000102549>.
 35. Marion W, Koppe T, Chen CC, Wang D, Frenis K, Fierstein S, Sensharma P, Aumais O, Peters M, Ruiz-Torres S, Chihanga T, Boettcher S, Shimamura A, Bauer DE, Schlaeger T, Wells SI, Ebert BL, Starczynowski D, da Rocha EL, Rowe RG. RUNX1 mutations mitigate quiescence to promote transformation of hematopoietic progenitors in Fanconi anemia. *Leukemia*. 2023 June 30;37(8):1698–1708. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01945-6>.
 36. Behrens YL, Gohring G, Bawadi R, Coktu S, Reimer C, Hoffmann B, Sanger B, Kafer S, Thol F, Erlacher M, Niemeyer CM, Baumann I, Kalb R, Schindler D, Kratz CP. A novel classification of hematologic conditions in patients with Fanconi anemia. *Haematologica*. 2021 Nov 1;106(11):3000–3003. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279332>.
 37. Sroka I, Frohnmayer L, Ravenhorst V, Wirkkula L. (Eds.). *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines*. 5th ed. Eugene: Fanconi Anemia Research Fund; 2020. 265 p.
 38. Alter BP. *Diagnosis, Genetics, and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes* Blanche. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007. 2007 Jan 1;1:29–39. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.03.002>
 39. Lestou VS, Gascoyne RD, Sehn L, Ludkovski O, Chhanabhai M, Klasa RJ, Husson H, Freedman AS, Connors JM, Horsman DE. Multicolour fluorescence in situ hybridization analysis of t(14;18)-positive follicular lymphoma and correlation with gene expression data and clinical outcome. *Br J Haematol*. 2003 Aug 21;122(5):745–759. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04502>.
 40. Mrozek K. Cytogenetic, Molecular Genetic, and Clinical Characteristics of Acute Myeloid Leukemia With a Complex Karyotype. *Semin Oncol*. 2008 Aug;35(4):365–377. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2008.04.007>.
 41. Ayas M, Saber W, Davies SM, Harris RE, Hale GA, Socie G, Lerademacher J, Thakar M, Deeg HJ, Al-Seraihy A, Battiwalla M, Camitta BM, Olsson R, Bajwa RS, Bonfim CM, Pasquini R, MacMillan ML, George B, Copelan EA, Wirk B, Al Jefri A, Fasth AL, Guinan EC, Horn BN, Lewis VA, Slavin S, Stepensky P, Bierings M, Gale RP. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for fanconi anemia in patients with pretransplantation cytogenetic abnormalities, myelodysplastic syndrome, or acute leukemia. *J Clin Oncol*. 2013 Apr 1; 31(13):1669–1676. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.9719>.

Versión en inglés:

1. Background

Fanconi anemia (FA) (OMIM: 227650) is a genomic instability syndrome, associated with developmental abnormalities, bone marrow (BM) failure, and predisposition to cancer.^{1,2} To date, germline pathogenic variants associated with patients with FA, have been described in at least 22 genes (*FANCA* - *FANCW*), whose protein products are involved in the FA-BRCA pathway, a route that supports DNA repair and replication, among other cellular processes.³

Cells from patients with FA are characterized by their hypersensitivity to agents that induce interstrand crosslinks (ICL), a type of highly toxic lesion that prevents DNA strands separation.^{4,5} ICLs can be generated by environmental exposures, such as the consumption of foods containing natural psoralens and aldehydes (alcoholic beverages), diets high in fat, estrogens, and nitrosamines (tobacco).^{6,7} On the other hand, several anticancer drugs, including cisplatin, mitomycin C (MMC), and some nitrogen mustards, also produce ICL.^{8,9}

Failure of the FA-BRCA pathway, the main mechanism for ICL repair, leads to the formation of structural chromosomal aberrations (CAs). These are distinctive of the cellular phenotype of FA. For this reason, the cytogenetic test for FA diagnosis relies on the quantification of breaks, radial exchange figures, ring chromosomes, dicentric chromosomes, etc. in lymphocytes exposed to diepoxybutane (DEB) or MMC.^{10,11}

FA is the most common of the inherited bone marrow failure syndromes.² FA patients have reduced production of one or more of the major hematopoietic lineages, due to the insufficiency or absence of hematopoietic precursors in the BM. BM failure develops in more than 75% of patients with FA, usually in the first decade

of life, with blood counts lower than normal values for the patient's age.^{1,2,12-15} BM failure is classified into three broad categories, according to the degree of the cytopenia observed.^{16,17}

Table 1

Hematological alterations in patients with FA can worsen, leading to the development of myelodysplastic syndromes (MDS) and/or acute myeloid leukemia (AML).^{2,18} It has been proposed that genomic instability, combined with chronic inflammation in the BM, inherent to FA, represents a strong selective pressure for the evolution of malignant clones.¹⁸

In FA, a cumulative incidence of MDS of 50% by the age of 50 has been reported, while in AML it has been estimated to be close to 5% by the age of 30¹. Although AML can be diagnosed *de novo*, without previous hematological alteration, it often develops from MDS in adolescence, due to the gradual increase in the proportion of blasts over time. The median age of MDS ranges is between 13-15 years; while for AML it is found at the beginning of early adulthood, between 17-19 years.^{1,18,19} Importantly, AML is more common in FA patients than acute lymphoblastic leukemia and lymphomas, which have been exceptionally reported.^{14,18}

2. Clonal and non-clonal cytogenetic alterations leading to MDS/AML in patients with FA

Cytogenetic analysis of BM samples has allowed the detection of karyotype abnormalities associated with premalignant or malignant transformation, acquired during the development of MDS and AML in various cohorts of patients with FA. The estimated risk of developing MDS or AML, three years after the observation of a clonal event (regardless of the chromosome involved) is 35%.¹² For these reasons, cytogenetic monitoring has been shown to have a significant impact on the prognosis and therapeutic decision-making in the disease.

Table 1. Severity of the bone marrow failure (modified from Camitta et al., 1979).

| | Mild | Moderate (hypoplastic or aplastic anemia) | Severe (severe aplastic anemia) |
|---------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| Absolute neutrophil count | <1,500/mm ³ | <1,000/mm ³ | <500/mm ³ |
| Platelet count | 150,000-50,000/mm ³ | <50,000/mm ³ | <30,000/mm ³ |
| Hemoglobin level | ≥8 g/dL* | <8 g/dL | <8 g/dL |

* lower than normal for age, but >8 g/dL.

A wide range of CAs have been characterized. Unbalanced translocations, as well as deletions and partial duplications are common.¹⁸ The CAs most consistently associated with clonal evolution towards MDS and AML in FA are a duplication of part of the long arm of chromosome 1 (1q+), a partial duplication of chromosome 3 (3q+) and monosomy 7 (-7) or partial loss of the long arm of this chromosome (7q-).^{20,21} Less frequently, alterations in 21q22 (*RUNX1*) and partial deletions in 5q, 13q and 20q have been reported.^{8,22,23}

The heterogeneity of these changes highlights the need to approach chromosome analysis using classical and molecular cytogenetic techniques. For example, gains in 1q or losses in 7q can be detected using banding techniques with Giemsa staining (GTG banding), whereas gains in 3q or alterations in 21q22 typically require higher resolution assays, such as comparative genomic hybridization (CGH) or interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH). The latter is especially useful for the detection of incipient clonal populations.¹⁸

At the same time, during karyotype analysis, non-clonal chromosomal changes may be found. Research in cellular models of spontaneous immortalization suggests that these changes are early cellular events that represents the transition

towards the final establishment of a permanent clonal state.^{24,25}

Currently, the management guideline for patients with FA suggests that gains in 1q, 3q and partial or total loss of chromosome 7 (7q-/-7), which comprise the majority of clonal alterations detected in patients with FA, should be targeted using iFISH in a large number of cells, in order to detect their presence, even if they are present in a small proportion.²⁰

3. Analysis of bone marrow samples from patients with FA by conventional and molecular cytogenetics

In patients with a confirmed diagnosis of FA, it is recommended to perform an annual review of the BM, including assessment of tissue architecture and cellularity, to consider morphological changes associated with dysplasia, and karyotype to detect cytogenetic alterations associated with MDS and LMA. Based on the results obtained of these studies, the follow-up period may be less than one year.^{10,20}

The methodology used in the Cytogenetics Laboratory of the National Institute of Pediatrics of Mexico, for the cytogenetic analysis of BM in these patients follows a general scheme. **Figure 1**

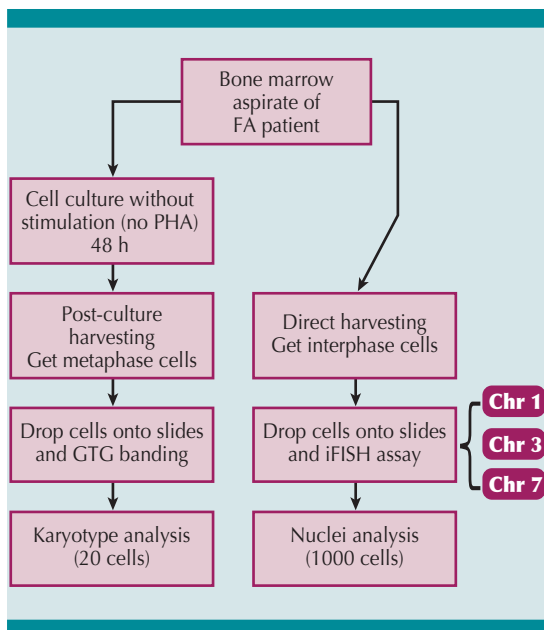


Figure 1. Flowchart for the detection of cytogenetic clones in bone marrow aspirates, for the follow-up of patients with Fanconi anemia (FA). In the figure: iFISH: interphase fluorescence *in situ* hybridization. PHA: phytohemagglutinin, Chr: chromosome. GTG: Giemsa staining.

The detailed methodology is presented below.

3.1 Biological Samples.

BM aspirates should be collected in tubes containing heparin as an anticoagulant (green cap). At least 3 ml of sample is required.

3.2 Solutions and reagents:

- MarrowMax BM medium (INVITROGEN).
- Colcemid [10 µg/mL] (KaryoMax, GIBCO).
- Hypotonic solution: Potassium chloride (KCl) [0.075 M].
- Carnoy's fixative solution: Methanol: Acetic acid, 3:1 v/v.

- Gurr's buffer solution: Dilute 1 Gurr™ tablet (INVITROGEN) in 1 L of isotonic solution (0.9% sodium chloride (NaCl), final pH of the solution: 7.2).
- Trypsin/EDTA solution for chromosome banding: Dilute 0.015 g of trypsin (1:250, GIBCO) + 0.01 g of EDTA (Sigma-Aldrich) in 50 mL of Gurr's buffer solution.
- Sörensen buffer: Dilute 2.56 g of dibasic sodium phosphate + 6.63 g of potassium phosphate in 1 L with distilled H₂O.
- Wright's staining solution: Mix 25 mL of eosin methylene blue (Wright's stain, MERCK) with 25 mL of Sörensen's solution.
- Giemsa staining solution: Mix 15 mL of Giemsa staining solution (MERCK) with 35 mL of Sörensen solution.
- Porcine gastric mucosa pepsin solution (Sigma-Aldrich): Dilute an aliquot [0.5mg/mL] in 40 mL of 0.01 N hydrochloric acid (HCl) (final concentration: 2.5x10⁻⁵ g/mL).
- Formaldehyde fixing solution: Mix 1 mL of 37% formaldehyde with 0.18 g of magnesium chloride (MgCl₂). Complete with 39 mL of 1X phosphate buffer saline (PBS).
- 2X Sodium Citrate Saline Solution (2X SSC): Dilute 100 mL of 20X SSC (Sigma-Aldrich) in 900 mL of distilled H₂O.

FISH post-hybridization washes:

- Wash solution 1 (0.4X SSC/0.3% Igepal): Mix 20 mL of 20X SSC with 950 mL of distilled H₂O. Add 3 mL of Igepal (Sigma-Aldrich). Adjust to 1L with distilled H₂O.
- Wash solution 2 (2X SSC/0.1% Igepal): Mix 100 mL of 20X SSC with 850 mL

distilled H₂O. Add 1 mL of Igepal (Sigma-Aldrich). Adjust to 1L with distilled H₂O.

- Prepare three ethanol/distilled water solutions in the following v/v ratios: 70%, 85% and 100%.
- Counterstaining medium, prepared with 95 µL of Vectashield fluorescence mounting medium (VECTOR Laboratories) + 5 µL Vectashield fluorescence mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (VECTOR Laboratories).

3.3. Procedures.

3.3.1 BM cell culture to obtain metaphases.

1. In a sterile conical centrifuge tube (15 mL), add 1 mL of BM aspirate to 5 mL of MarrowMax medium, pre-warmed to 37°C. Incubate for 48 h, at 37°C. If possible, run in duplicate.
2. Add 60 µL of Colcemid and incubate for 2 h at 37°C.
3. Centrifuge at 500xg for 10 min. Remove the supernatant (SN) with a Pasteur pipette, without resuspending the cell pellet.
4. Resuspend the cell package and add 8 mL of hypotonic solution at 37°C, incubate for 30 min.
5. Prefix the cultures by adding 1 mL of Carnoy's fixative solution at 4°C and mix by inversion.
6. Centrifuge at 500xg for 10 min, discard the SN and resuspend the cell pellet.
7. Add 8 mL of Carnoy's fixative solution at 4°C, mix well and centrifuge at 500xg for 10 min.
8. Repeat steps 6 and 7 until a white and transparent SN cellular pellet is obtained.

The samples can be stored at 4°C, until the slides are prepared.

3.3.1.1 Preparation of slides for chromosome banding.

Note: Use 25mm x 75mm glass slides, washed and cooled in 2% methanol.

1. Remove the SN from the previously harvested tube, until approximately 0.5-1 mL of fixative remains (according to the size of the cell pellet). Resuspend with a Pasteur pipette and place 2 or 3 drops of the suspension on the slide. Avoid overlapping drops during this step. Allow to dry.
2. Evaluate the quality and quantity of the metaphases obtained using phase contrast microscope. Based on this preliminary evaluation, estimate the number of slides to be dropped per patient. Typically, 3 to 5 slides are prepared per sample.
3. Label the slides and place them on a thermal plate or oven at 50°C-60°C for 24 hours, to dehydrate the slide.

3.3.1.2 Chromosome banding (GTG Bands).

Note: For this procedure, it is recommended to use Coplin-type staining glasses (or similar), with the following solutions:

- a) Trypsin/EDTA.
- b) Gurr's buffer solution, for rinsing.
- c) Gurr buffer solution.
- d) Wright's staining solution.
- e) Giemsa staining solution.
- f) Tap water (domestic).

4. Place the slide in solution a), for 30 s - 60 s at room temperature.
5. Rinse briefly in solution b).
6. Place the slide in solution c), for 5 min.
7. Stain the slides with Wright's stain and Giemsa's stain for 30 s and 2 min respectively, rinse with tap water and allow drying.
8. Examine under a light microscope in a bright field and store the slides until analysis.

3.3.1.3 Analysis.

At least 20 metaphases should be analyzed, according to the guidelines described in the "International System for Human Cytogenetics Nomenclature" (ISCN) manual. The concepts of cytogenetic clonality described in the chapter of neoplasms²⁶ must be taken account.

3.3.2 iFISH in BM samples.

3.3.2.1 Direct harvest of BM.

1. In a sterile conical centrifuge tube (15 mL), add 1-1.5 mL of the BM aspirate to 8 mL of hypotonic solution. Incubate at 37°C for 45 min.
2. Reproduce the protocol from section 3.3.1, starting with step 5.

3.3.2.2 iFISH Slides

1. Prepare the slides as described in step 1 of section 3.3.1.1
2. Evaluate the refraction and amount of cytoplasm in the cells through light microscopy, using phase contrast. Additional enzymatic treatments to remove cytoplasm and/or decondense nuclei may be necessary. If the nuclei appear grey

and free of cytoplasm, continue with slide maturation (step 1 of the next section).

3. If the cells appear refractive, enzymatically treat with the pepsin solution at 37°C, for 10 s - 20 s. The treatment time will depend on the degree of refraction previously observed, the greater the refraction, the longer the time.
4. Wash the slides with 1X PBS for 10 min.
5. Fix the slides in formaldehyde solution for 10 min.
6. Wash the slides in fresh 1X PBS for 10 min.
7. Dehydrate the slides in alcohol solutions (70%, 85% and 100%) for two minutes each, and allow to dry.

3.3.2.3 Staining procedure for iFISH.

Note: It is suggested to use probes for the specific regions 1q25 (with control probe 1p36), 3q27 (*BCL6*, break apart type), CEP7 (centromere of chromosome 7) with a specific region in 7q31; to perform three different multicolor tests²⁰. The use of Coplin staining bottles (or similar) is recommended for the washing steps.

1. Maturation. Incubate the slides in a 2X SSC solution for 30 minutes, at 37 °C. Then, dehydrate the slides in alcohol solutions (70%, 85% and 100%) for two minutes each, and allow to dry.
2. Prepare the probe mixture of choice, according to the supplier's instructions. Place the mixture on the slide, in the selected hybridization area and cover with a 22x22 mm coverslip. Seal around the coverslip with plastic adhesive.
3. Codenature the probe and the DNA of the cells on the slide, by placing it on a hot plate at 75°C for 1.5 min.

4. Hybridization. Incubate overnight at 37°C (minimum 6 hours) in a humidity chamber.
 5. Post-hybridization washes. Preheat wash solution 1, to 72°C (\pm 2°C), remove the plastic adhesive and the coverslip, and place the slide into the wash solution 1 for 2 min. The temperature and time of this step determine the cleanliness and quality of the fluorescent signal obtained.
 6. Transfer the slide to wash solution 2 at room temperature for 2 minutes, and allow to drain.
 7. Without allowing the slide to dry, place 10 μ l of Vectashield/DAPI counterstain medium on a coverslip and cover the hybridized area of the slide. Remove the excess by lightly pressing with absorbent paper.
 8. Store the slides at 4°C, protected from light, until analysis under the fluorescence microscope.
- Only include nuclei with intact borders, without overlapping other nuclei. If the cell borders appear discontinuous or diffuse, that cell should be excluded.
 - For a signal to be quantified, its domain must be separated from another signal (detected with the same fluorescence) by a distance greater than half the diameter of a fluorescent domain. This signal must be clearly distinguishable within the cell, and it must be verified that the signal is not the product of some artefact, by observation under phase contrast.
 - If a different number of fluorescent domains than expected is found, i.e., extra or missing domains, this alteration is quantified, considering that the cells must be located in areas of the slide, with effective and uniform hybridization.

3.3.2.4 Analysis criteria for iFISH.

This step requires an epi-fluorescence microscope, equipped with different fluorescence filters and phase contrast. In addition to single filters, triple and double band filters are required to allow the simultaneous detection of multiple wavelengths. In this way, the choice of the fluorophores used must therefore be based on the excitation and emission spectrum recognized by the microscope. Usually, the signals from commercially available probes are detected in various colors of the visible spectrum (such as red, green, blue, and orange, among others). In addition, a 100X phase contrast (PH3 lens) is required.

Evaluation Criteria:²⁷

- The slide must have a hybridization efficiency greater than 95%.

The detection of amplifications or deletions is the result of an assay in which two different fluorochromes are used on the same chromosome. In this way, one signal must hybridize over the region of interest, while the other hybridizes in a centromeric area or in a specific locus and are considered as “control probes”. This detection system is also useful for identifying of aneuploidies.

On the other hand, “*break apart*” probes are designed to hybridize to two adjacent regions of the same gene. Each of these zones is differentially labelled with a fluorochrome (e.g., green and red). If the chromosomal region remains intact, the red and green signals will usually overlap, and the presence of a complete or partial yellow signal will be observed in the overlapping area. If the sequence breaks, the signals no longer remain together and will be observed as separate red and green signals.

For iFISH it is recommended to analyze a minimum of 1000 cells per assay. In the particular

case of FA, due to chromosomal instability, it has been suggested that values $\geq 10\%$ of cells with alteration should be detected to be considered an abnormal clone.²⁰ However, it is recommended that each laboratory establishes its own cut-off value, by studying each probe in a healthy population. Based on this strategy, our team recognizes a clonal population when the change is present in a proportion of $\geq 5\%$ of the analyzed cells. **Figure 2**

3.4 Report of findings

The final report for the methods we have described (iFISH and GTG bands) must be prepared in accordance with the most recent version of the ISCN manual. The report should address the following considerations:

- Patient name, age, date of birth and date of sample collection.

- Record the total number of cells analyzed, with a description of the numerical and structural chromosomal clonal alterations.
- In addition to clonal alterations, it is recommended to document non-clonal (single cell) alterations in a laboratory record.
- The use of a small text commentary, on the relevance of the clonal alterations found (if applicable), is suggested to assist the treating physician on future therapeutic decisions.

Here are some examples to illustrate the use of cytogenetic formulas, figures, and formulas: **Figure 3**

Karyotype: 46,XY[20]

Chromosomal aberrations frequency = 0.08 ab/cell

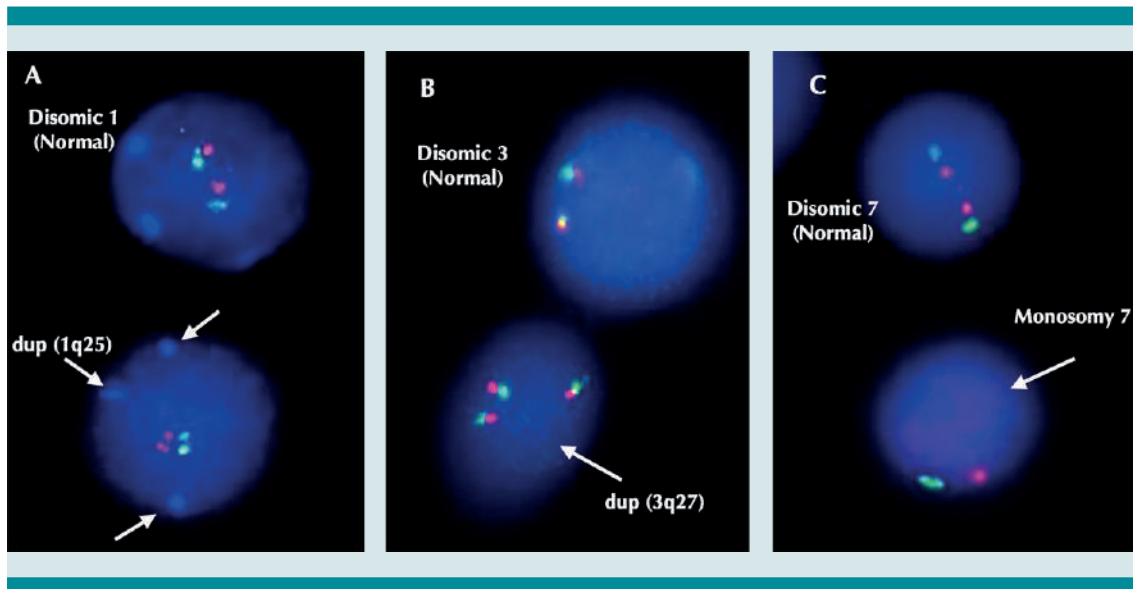


Figure 2. FISH assays on interphase cells. A) Assay for the detection of chromosome 1 in its regions 1p36 (red), 1ptel (green) and 1q25 (aqua), a cell with dup(1q25) is observed (arrows). B) Assay for detection of the 3q27 region (3' end in green and 5' end in red), presence of cell with dup(3q27) (arrow). C) Assay to detect the centromere of chromosome 7 (green) and the 7q31 region (red), a cell with monosomy 7 is observed (arrow).

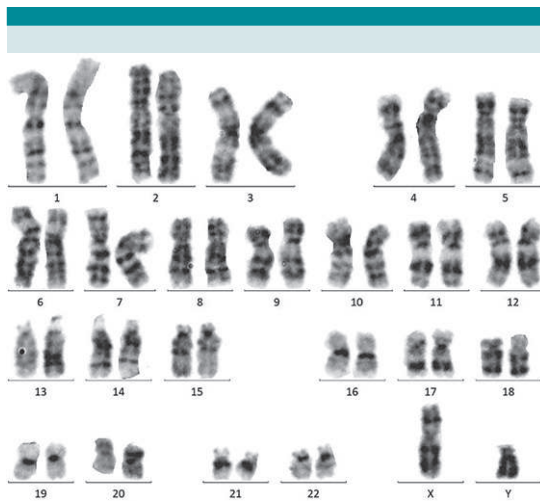


Figure 3. Normal karyotype in the bone marrow of a patient with FA: 46, XY. Karyotype: 46,XY[20]. Frequency of chromosomal aberrations = 0.08/cell.

Comment:

Normal karyotype without clonal chromosomal alterations, in 20 analyzed cells. Breaks were expected findings due to chromosomal instability of FA. Follow-up with karyotyping with GTG bands and FISH for chromosomes 1, 3 and 7 in BM is recommended annually, or earlier according to the patient's hematological evolution and the decision of the treating physician. **Figure 4**

Karyotype:45,XY,-7,-18,+der(3?)(p12)[15]/45, idem,-21,+mar1[3]/45, idem,-13,+mar2[1]/45, idem,del(2)(p23)[1]

Comment:

Presence of cellular clones with numerical and structural aberrations associated with the risk of developing acute myeloid leukemia and/or myelodysplastic syndromes. The clonal alterations found correspond to gain of 3q and monosomy 7, which are associated with a higher risk of MDS/AML in patients with FA, in addition to the loss

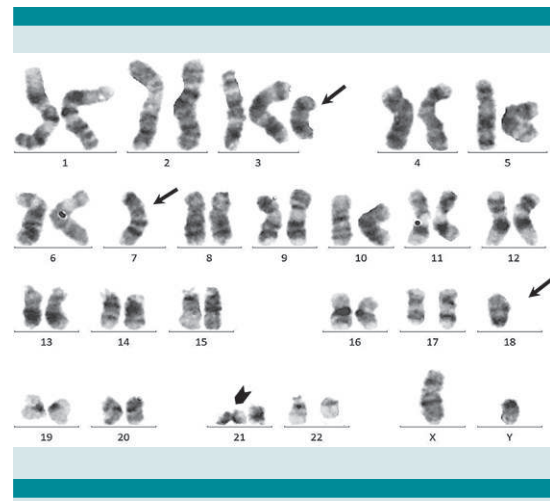


Figure 4. Bone marrow karyotype of a patient with FA. Arrows: Several alterations are observed on chromosomes 3 and 7, which are genetic markers for progression to MDS or AML, and also on chromosome 18. Arrowhead: chromatid break. 45,XY,-7,-18,+der(3?)(p12). Karyotype: 45,XY,-7,-18,+der(3?)(p12)[15]/45, idem,-21,+mar1[3]/45, idem,-13,+mar2[1]/45, idem, del(2)(p23)[1].

of chromosome 18. Close clinical follow-up is recommended.

Example 2 shows a patient who has a clone with chromosomal changes associated with the development of AML and/or MDS in FA, from which at least one extra cell subclone is derived; Additionally, it shows a monosomy of chromosome 18 and single-cell alterations that may be derived from the main cell line (mainline) or from a subclone.

4. Role of cytogenetic alterations in the evolution of FA bone marrow towards myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia.

Although it is not entirely clear how chromosomal instability contributes to the progression of BM failure to myeloid neoplasms, there are currently important observations in this regard. Some reports highlight that the presence of losses and

gains of chromosomal regions in FA, play a more important role in the beginning of clonal evolution, than point mutation-type changes.^{22,23,28} These chromosome arms alterations, resulting from unbalanced translocations and other chromosome alterations, lead to copy number variations (CNV) that progressively accumulate during BM failure, and are much more frequent in FA than in cases of sporadic AML unrelated to FA.²³ These CNVs are usually detected as CA and as mentioned above, the most frequent in the progression to MDS/AML are duplications in 1q and 3q, as well as the total loss of chromosome 7 or of its long arms, which account for about 75 % of the chromosomal abnormalities present in the BM of patients with FA.²⁹

Recently, it has been shown that the presence of a duplication in the long arm of chromosome 1, specifically in the 1q32 region, implies an increase in the gene dosage of the *MDM4* gene, a negative modulator of the tumor suppressor gene *TP53*. Longitudinal analysis of samples from patients with FA using a combination of array CGH, high-throughput DNA and RNA sequencing, and cytogenetics, reveals that the p53 pathway is attenuated by the presence of the 1q+ during the clonal transition, which is an early event, prior to blast expansion. Thus, 1q+/*MDM4* acts as a switch of clonal expansion that does not directly induce cancer but drives the BM toward a pre-leukemic state. The linear increase in the number of blasts occurs later, after the appearance of other clonal events, such as +3q or -7q.²³

The presence of 3q+ favors the activation of *EV11*, a gene encoding a transcription factor and whose overexpression correlates with an aggressive form of AML with a poor prognosis.^{30,31} On the other hand, alterations in chromosome 7 (-7/7q-) are associated with a poor prognosis in myeloid neoplasms, with a high prevalence among pediatric cases of MDS, often associated with BM failure syndromes. However, although

several candidate genes have been proposed to determine the role of these changes in leukemogenesis, their role has not been elucidated.^{32,33} In FA, it has been proposed that alterations in 3q and 7/7q- are associated with a greater risk of developing MDS or AML, and it has been suggested that patients with abnormalities in chromosome 7 should be considered for BM transplantation, in the same way as when a clone with an expanding 3q duplication is observed.^{20,34}

Finally, changes involving the *RUNX1* gene (located at 21q22) have been associated with more advanced stages of MDS and progression to AML in FA. These changes may be accompanied by alterations in genes of the RAS pathway, which contrasts with the “classic” presentation of MDS in adults. In experimental models, variants in this gene have been found to contribute to cell cycle deregulation in G1/S and activation of innate immune signaling in FA.^{28,35} Other less frequent alterations, such as deletions in 20q, 11q, 5q, and trisomy 8, have also been reported in the pathway of blastic evolution towards AML.²³

All these data indicate that longitudinal cytogenetic monitoring of the BM of FA patients is essential to detect these chromosomal changes which, together with hematological monitoring of the BM, will allow timely decisions for the management of the disease.

5. About the monitoring and treatment of patients with FA.

Serial morphological and cytogenetic cellular examination of BM samples aims to identify clonal evolution towards MDS or AML, which complements the findings of peripheral blood counts. In addition, some authors advocate the use peripheral blood blast counts, in conjunction with a classification system that assigns a potential impact of cytogenetic alterations, that could be found in patients, to facilitate the therapeutic decision-making.³⁶ During the management of

patients with FA, hematological monitoring is recommended to evaluate blood counts every 3 or 4 months, as well as an annual BM aspirate (or more frequently if BM failure is already present), for morphological and cytogenetic evaluation.³⁷ The latter should include search for structural chromosomal alterations by karyotype, as well as the known specific alterations by iFISH.³⁸ **Table 2**

Currently, conventional cytogenetics can be complemented by methods such as multiplex FISH (M-FISH), CGH-based microarrays, SNP microarrays, or high-throughput sequencing.^{23,29,39,40} However, although these methodologies refine the study and can undoubtedly provide additional information, the evaluation of clonal expansion associated with neoplastic progression in BM samples by GTG banding and iFISH, provides reliable and affordable results, being techniques that can be found in cytogenetic laboratories of developing countries.

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is currently the most recommended therapeutic option against hematological complications in FA. A study of more than 100 transplanted patients with FA showed that patients with only BM cytogenetic abnormalities had a better survival rate than those who had already progressed to MDS or AML.⁴¹

Due to the impact that the cytogenetic results have on the patient's prognosis and treatment, as

well as the possibility of inclusion within an HSCT protocol, the following evaluation periods are recommended for their implementation. **Table 2**

In the context of patients with FA, the detection of cytogenetic abnormalities is particularly important, since the intrinsic chromosomal instability of these patients favors clonal evolution. Such monitoring, through the techniques described in this article, allows supporting closer hematological surveillance, which facilitates the study of clonal progression in patients, with emphasis on the early phases of malignancy, so that medical intervention, through the TCPH, when possible, occurs on time.

Funding:

This research was partially funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), grant number CF-2023-G-800; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT project IN205120) and by Instituto Nacional de Pediatría, Recursos Fiscales E022 project INP 2020/012.

Acknowledgments:

Antonio Paz-Martínez acknowledges the support of CONACYT, through the scholarship 762510 to develop his Master in Biological Sciences.

Table 2. Hematological evaluation and follow-up of patients with FA (Modified from Sroka et al, 2020).

| Evaluation | | | Follow-Up | |
|---------------------------|------------------------------|--|--------------------------|--|
| Stability of blood counts | Classification of BM failure | Clonal cytogenetic alterations (duplication 1q,3q, monosomy 7q or total) | Analysis of blood counts | Morphological and cytogenetic analysis of the BM |
| Stable | No BMF, or Mild | Absent | Every 3-4 months | Annual |
| Stable | No BMF, or Mild | Present* | Every 3 months | Every 3-6 months. |
| Unstable | Moderate or Severe | Absent | Every 3 months | Annual** |
| Unstable | Moderate or Severe | Present | Every 1-2 months | Immediate review |

*In the absent of morphological MDS. **Perform earlier, if blood counts suggest progression to MDS or AML.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design or writing of the manuscript.

REFERENCES

- Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in the national cancer institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica*. 2018 Jan 1;103(1):30–39. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.178111>.
- Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev*. 2010 Apr 24;24(3):101–122. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.03.002>.
- Rodríguez A, D'Andrea A. Fanconi anemia pathway. *Curr Biol*. 2017 Sep 25;27(18):R986–R988. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.043>.
- Bhattacharjee S, Nandi S. DNA damage response and cancer therapeutics through the lens of the Fanconi Anemia DNA repair pathway. *Cell Commun Signal*. 2017 Oct 10;15(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0195-9>.
- Rodríguez A, Sosa D, Torres L, Molina B, Frias S, Mendoza L. A Boolean network model of the FA/BRCA pathway. *Bioinformatics*. 2012 Mar 15;28(6):858–866. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts036>.
- Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: Implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*. 2005 Apr;35(3):187–193. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.03.009>.
- Mizumoto A, Ohashi S, Hirohashi K, Amanuma Y, Matsuda T, Muto M. Molecular mechanisms of acetaldehyde-mediated carcinogenesis in squamous epithelium. *Int J Mol Sci*. 2017 sep 10;18(9):1943. <https://doi.org/10.3390/ijms18091943>.
- Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 June 24; 11(7):467–480. <https://doi.org/10.1038/nrc3088>.
- Rodríguez A, Torres L, Juárez U, Sosa D, Azpeitia E, Teresa BG, Cortes E, Ortiz R, Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Mendoza L, Frias S. Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process. *Theor Biol Med Model*. 2015 Sep 18;12(1):1–22. <https://doi.org/10.1186/s12976-015-0011-4>.
- García-De-teresa B, Rodríguez A, Frias S. Chromosome instability in fanconi anemia: From breaks to phenotypic consequences. *Genes*. 2020 Dec 2;11(12):1–35. <https://doi.org/10.3390/genes11121528>.
- Meetei AR, De Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, Van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*. 2003 Sep 14;35(2):165–170. <https://doi.org/10.1038/ng1241>.
- Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*. 1994 Sept 1;84(5):1650–1655.
- Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: New players and new functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 May 5;17(6):337–349. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.48>.
- Kutler DI, Singh B, Satagopan J. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1249–1256.
- Moore C, Krishnan K.. Bone marrow failure. Treasure Island (FL): StatPearls. Epub 2021.
- Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Santos G, Gordon-Smith EC, Gale RP, Rapoport JM, Starb R. Severe Aplastic Anemia: A Prospective Study of the Effect of Early Marrow Transplantation on Acute Mortality. *Blood*. 1976 Jul. 48(1):63–70.
- Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Gale RP, Kopecky KJ, Rapoport JM, Santos G, Gordon-Smith EC, Storb R.. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. *Blood*. 1979 Mar;53(3):504–514. <https://doi.org/10.1182/blood.v53.3.504.504>.
- Peffault de Latour R, Soulier J. How I treat MDS and AML in Fanconi anemia. *Blood*. 2016 Jun 16;127(24):2971–2979. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-583625>.
- Altintas B, Giri N, McReynolds LJ, Best A, Alter BP. Genotype-phenotype and outcome associations in patients with Fanconi anemia: the National Cancer Institute cohort. *Haematologica*. 2023 Jan 1;108(1):69–82. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279981>.
- Mehta PA, Harris RE, Davies SM, Kim MO, Mueller R, Lampkin B, Mo J, Myers K, Smolarek TA. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome-acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Dec;203(2):180–186. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2010.07.127>.
- Tonnies H, Huber S, Kuhl JS, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: Gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood*. 2003 May 15;101(10):3872–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3243>.
- Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R, Nibourel O, Pondarre C, Pages MP, Vasquez N, D'Enghien CD, Larghero J, De Latour RP, Rocha V, Dalle JH, Schneider P, Michallet M, Michel G, Baruchel A, Sigaux F, Gluckman E, Leblanc T, Stoppa-Lyonnet D, Preudhomme C, Socie G, Soulier J. Myelodysplasia and leukemia of fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 2011 Apr 14;117(15):161–171. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-308726>.
- Sebert M, Gachet S, Leblanc T, Rousseau A, Bluteau O, Kim R, Ben Abdelal R, Sicre de Fontbrune F, Maillard L, Fedronie C, Murigneux V, Bellenger L, Naouar N, Quentin S, Hernandez L, Vasquez N, Da Costa M, Prata PH, Larcher L, De Tersant M, Duchmann M, Raimbault A, Trimoreau F, Fenneteau O, Cuccuini W, Gachard N, Auger N, Tueur G, Blanluet M, Gazin

- C, Souyri M, Langa Vives F, Mendez-Bermudez A, Lapillonne H, Lengline E, Raffoux E, Fenaux P, Ades L, Forcade E, Jubert C, Domenech C, Strullu M, Bruno B, Buchbinder N, Thomas C, Petit A, Leverger G, Michel G, Cavazzana M, Gluckman E, Bertrand Y, Boissel N, Baruchel A, Dalle JH, Clappier E, Gilson E, Deriano L, Chevret S, Sigaux F, Socie G, Stoppa-Lyonnet D, De The H, Antoniewski C, Bluteau D, Peffault de Latour R, Soulier J. Clonal hematopoiesis driven by chromosome 1q/MDM4 trisomy defines a canonical route toward leukemia in Fanconi anemia. *Cell Stem Cell*. 2023 Feb 2;23(2):153-170.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.01.006>.
24. Heng HH, Regan SM, Liu G, Ye CJ. Why it is crucial to analyze non clonal chromosome aberrations or NCCAs? *Mol Cytogenet*. 2016 Feb 13; 9(1):1-12. <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0223-2>.
 25. Rangel N, Forero-Castro M, Rondon-Lagos M. New insights in the cytogenetic practice: Karyotypic chaos, non-clonal chromosomal alterations and chromosomal instability in human cancer and therapy response. *Genes*. 2017 Jun 3;8(6):2-29. <https://doi.org/10.3390/genes8060155>.
 26. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S (Eds.). *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. 1st ed. Karger; 2020. 156 p. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-06867-2>.
 27. Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, Monakhov VV, Kirillova EA, Soloviev IV, Yurov YB. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *J Histochem Cytochem*. 2005 Mar;53(3):375-380. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6424.2005>
 28. Chao MM, Thomay K, Goehring G, Wlodarski M, Pastor V, Schlegelberger B, Schindler D, Kratz C P, Niemeyer C. Mutational Spectrum of Fanconi Anemia Associated Myeloid Neoplasms. *Klin Padiatr*. 2017 Nov 13;229(6):329-334. <https://doi.org/10.1055/s-0043-117046>.
 29. Cioc AM, Wagne JE, MacMillan ML, DeFor T, Hirsch B. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: Morphologic and cytogenetic characteristics. *Am J Clin Pathol*. 2010 Jan 1;133(1):92-100. <https://doi.org/10.1309/AJCP7W9VMJENZOVG>.
 30. Groschel S, Lugthart S, Schlenk RF, Valk PJ, Eiwien K, Goudswaard C, Van Putten WJ, Kayser S, Verdonck LF, Lubbert M, Ossenkoppele GJ, Germing U, Schmidt-Wolf I, Schlegelberger B, Krauter J, Ganser A, Dohner H, Lowenberg B, Dohner K, Delwel R. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 22;28(12):2101-2107. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.0646>.
 31. Konantz M, André MC, Ebinger M, Grauer M, Wang H, Grzywna S, Rothfuss OC, Lehle S, Kustikova OS, Salih HR, Handgretinger R, Fend F, Baum C, Kanz L, Quintanilla-Martinez L, Schulze-Osthoff K, Essmann F, Lengerke C. EVI-1 modulates leukemogenic potential and apoptosis sensitivity in human acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2013 Jul 25;27(1):56-65. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.211>.
 32. Inaba T, Honda H, Matsui H. The enigma of monosomy 7. *Blood*. 2018 Jun 28;131(26):2891-2898. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/131/26/2891/1465937/blood822262.pdf>.
 33. Schwartz JR, Ma J, Lamprecht T, Walsh M, Wang S, Bryant V, Song G, Wu G, Easton J, Kesserwan C, Nichols KE, Mullighan CG, Ribeiro RC, Klco JM. The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes. *Nat Commun*. 2017 Nov 16;8(1):1557. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01590-5>.
 34. Neitzel H, Kuhl JS, Gerlach A, Ebell W, Tonnie H. Fanconi Anemia. A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging. *Monog Hum Genet*. Basel. Karger. 2007. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of fanconi anemia patients: Results and implications; p. 79-94. <https://doi.org/10.1159/000102549>.
 35. Marion W, Koppe T, Chen CC, Wang D, Frenis K, Fierstein S, Sensharma P, Aumais O, Peters M, Ruiz-Torres S, Chihanga T, Boettcher S, Shimamura A, Bauer DE, Schlaeger T, Wells SI, Ebert BL, Starczynowski D, da Rocha EL, Rowe RG. RUNX1 mutations mitigate quiescence to promote transformation of hematopoietic progenitors in Fanconi anemia. *Leukemia*. 2023 June 30;37(8):1698-1708. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01945-6>.
 36. Behrens YL, Gohring G, Bawadi R, Coktu S, Reimer C, Hoffmann B, Sanger B, Kafer S, Thol F, Erlacher M, Niemeyer CM, Baumann I, Kalb R, Schindler D, Kratz CP. A novel classification of hematologic conditions in patients with Fanconi anemia. *Haematologica*. 2021 Nov 1;106(11):3000-3003. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279332>.
 37. Sroka I, Frohnmayer L, Ravenhorst V, Wirkkula L. (Eds.). *Fanconi Anemia Clinical Care Guidelines*. 5th ed. Eugene: Fanconi Anemia Research Fund; 2020. 265 p.
 38. Alter BP. *Diagnosis, Genetics, and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes* Blanche. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007. 2007 Jan 1;1:29-39. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.03.002>
 39. Lestou VS, Gascoyne RD, Sehn L, Ludkovski O, Chhanabhai M, Klasa RJ, Husson H, Freedman AS, Connors JM, Horsman DE. Multicolour fluorescence in situ hybridization analysis of t(14;18)-positive follicular lymphoma and correlation with gene expression data and clinical outcome. *Br J Haematol*. 2003 Aug 21;122(5):745-759. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04502>.
 40. Mrozek K. Cytogenetic, Molecular Genetic, and Clinical Characteristics of Acute Myeloid Leukemia With a Complex Karyotype. *Semin Oncol*. 2008 Aug;35(4):365-377. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2008.04.007>.
 41. Ayas M, Saber W, Davies SM, Harris RE, Hale GA, Socie G, Lerademacher J, Thakar M, Deeg HJ, Al-Seraihy A, Battiwalla M, Camitta BM, Olsson R, Bajwa RS, Bonfim CM, Pasquini R, MacMillan ML, George B, Copelan EA, Wirk B, Al Jefri A, Fasth AL, Guinan EC, Horn BN, Lewis VA, Slavin S, Stepensky P, Bierings M, Gale RP. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for fanconi anemia in patients with pretransplantation cytogenetic abnormalities, myelodysplastic syndrome, or acute leukemia. *J Clin Oncol*. 2013 Apr 1; 31(13):1669-1676. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.9719>.