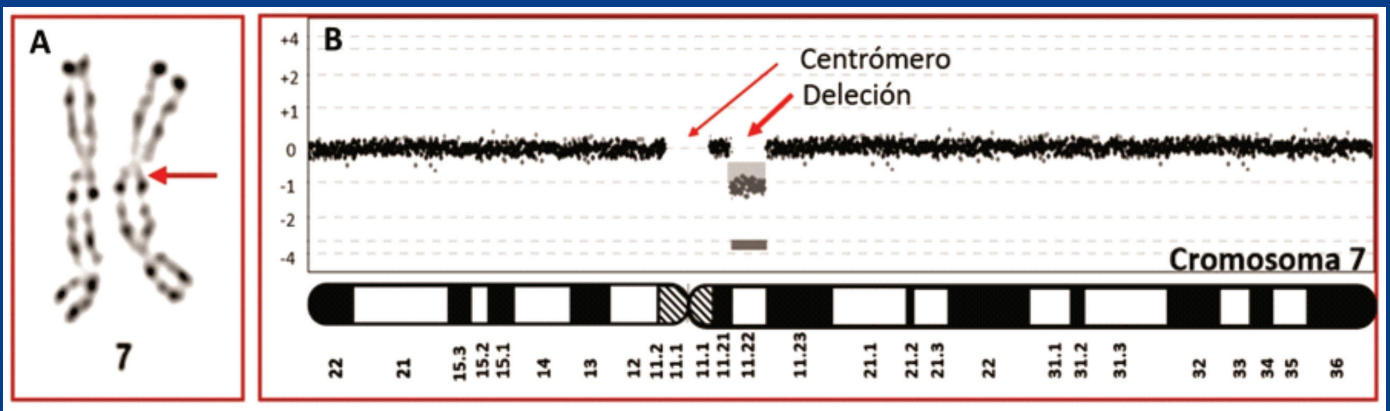
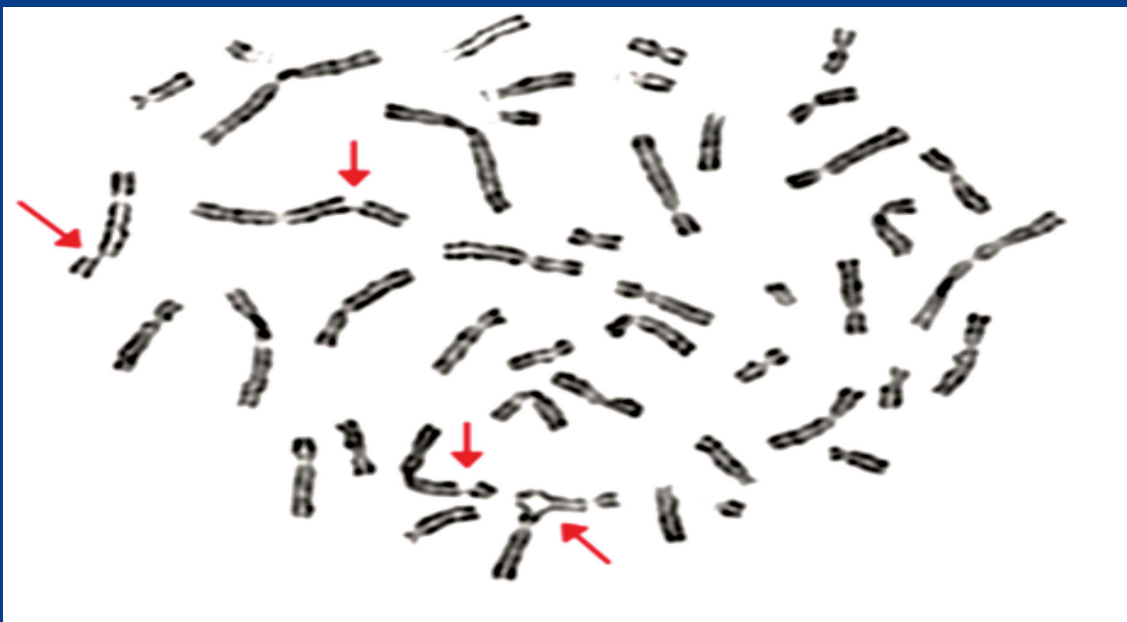


AGOSTO 2020

MicroArrays diagnósticos en pediatría y neonatología



Anemia de Fanconi revisitada



► Contenido

1. **MicroArrays Diagnósticos en Pediatría y Neonatología.**
2. **Anemia de Fanconi revisitada.**
3. **Guía Práctica para Interpretar las Sondas FISH en Translocaciones.**
4. **Autoevaluación.**



Autores:

- Mauricio Camargo (MSc, PhD, Univ.Minnesota)
- Olga Zea (Biol., Esp. Citog., U.de A.)
- Diana C. Sarrazola (Microb., MSc., U.de A.)

Imagen carátula:

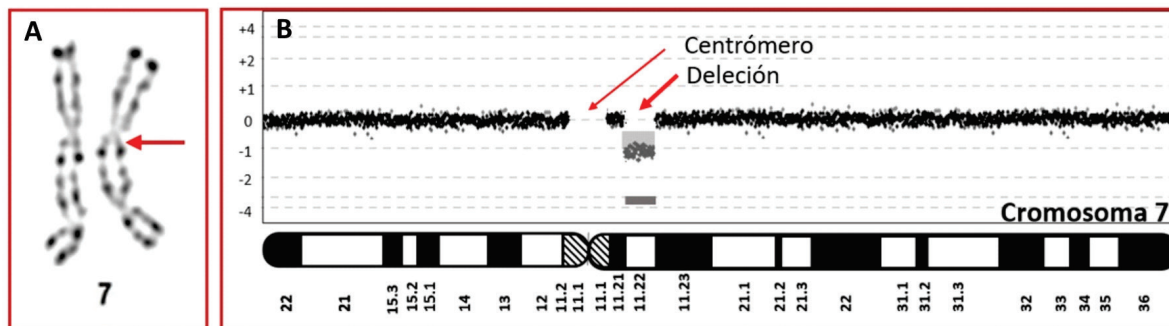
- Diagramación por Ana Lucía Zea
- Fotomicrografías por Diana C. Sarrazola

1. PEDIATRÍA y NEONATOLOGÍA

MicroArrays diagnósticos-genómicos en pediatría y neonatología

Resumen Gráfico: El siguiente recuadro **A** muestra un par de cromosomas 7 con una flecha señalando una aparente y dudosa microdelección en el cromosoma 7 de la derecha. El recuadro **B** es un microArray de ese mismo paciente, que revela una cantidad -1 del segmento 7q11.22. La nube de puntos de hibridación localizada a nivel -1 es clara evidencia de una microdelección de la banda 7q11.22, confirmando que el paciente tiene una delección heterocigota. Al perderse varios genes (que el software indicará) se espera o se confirma que el paciente debería tener trastornos en el neurodesarrollo, discapacidad intelectual y anomalías congénitas/rasgos dismórficos, como se explicará a continuación.

Nota: La otra brecha que se observa a nivel del centrómero se explica porque al construir el microArray, siempre se omiten las sondas centroméricas, ya que son regiones ricas en secuencias altamente repetidas carente de genes (heterocromatina centromérica). Todos los microArrays mostrarán esta brecha centromérica en todos los cromosomas.



Introducción: Los microarreglos genómicos se conocen con varios nombres, tales como microarrayCGH, CGH-arrays, aCGH, microarreglos citogenómicos, micromatrices genómicas, chips de ADN y cariotipo molecular. En el texto a continuación se utilizará el término **microArray**.

Desde el año 2010, y para los casos o presentaciones clínicas que se relatan a continuación, **el test de microArrays representa la prueba diagnóstica de primera opción** recomendada por varias asociaciones médicas, como el American College of Medical Genetics (ACMG), la American Academy of Neurology (AAN), la Child Neurology Society (CNS), la American Academy of Pediatrics (AAP), la European Cytogeneticists Association, y el International Standard Cytogenomic Array Consortium (ISCA).

QUE SON LOS MICROARRAYS

- Esta sección solo se referirá a los microArrays genómicos o de ADN, en los cuales el ADN del paciente cortado y convertido en cadenas sencillas, se marca con un fluorocromo y se hibrida a un chip de ADN que contiene sondas de ADN de cadena sencilla.
- Los microArrays comerciales de mayor difusión están basados en una micromatriz en sílica de 750.000 micropuntos (750K) en un área <2cm². En cada micropunto se pegan

robóticamente racimos de sondas sintéticas de oligonucleótidos de cadena sencilla de 25 nucleótidos c/u (25-mer) que eventualmente se hibridaran a los segmentos de ADN de cadena sencilla del paciente. Cada racimo contiene un tipo único de sonda o secuencia de ADN, que ha sido escogida de una región específica del genoma humano, rica en genes. La distancia promedio entre cada una de las secuencias escogidas es de 50-65kb (kilobases) a nivel del ADN genómico. Por tanto, el término 750K denota el nivel de resolución del microArray ya que a mayor número de sondas diferentes, mayor es el poder de resolución del microArray, y menor es la distancia entre ellas en el ADN genómico. Por ejemplo, un microArray 750K, puede detectar microdelecciones o microduplicaciones a nivel de genes, teniendo en cuenta que el tamaño promedio de un gen es de 60kb.

- En las versiones más recientes de microArrays 750K comerciales, se han adicionado oligonucleótidos con SNPs y sondas para detectar CNVs, aumentando la resolución a un total de 2.700.000 sondas que permiten detectar otras anomalías y variaciones genómicas tales como disomías uniparentales (UPD), regiones de homocigosidad (ROH), o pérdidas de heterocigosidad (LOH). [\[ver terminología al final de esta sección\]](#).
- Los nuevos microArrays-SNP también son particularmente útiles para revelar trastornos recesivos resultantes de mutaciones homocigotas. Con estas plataformas de mayor resolución, algunos autores han logrado aumentar el rendimiento diagnóstico, desde el convencional 15-20% hasta un 28% (D'Amours et al. 2014).

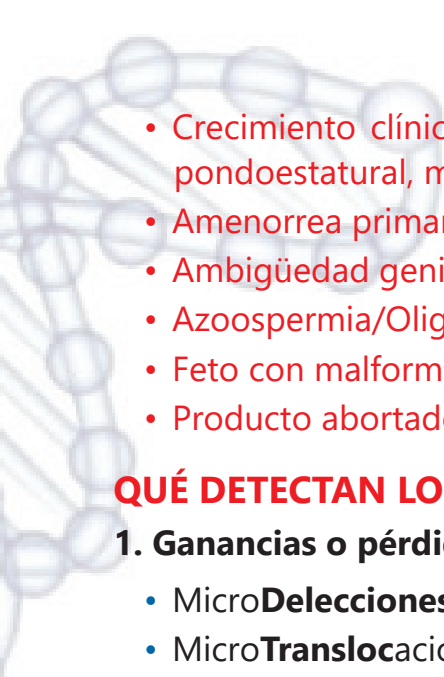
¿CUÁNDO SE APLICAN EN NEONATOLOGÍA, PEDIATRÍA Y FERTILIDAD?

Basados en la experiencia acumulada en los últimos 10 años, su alta resolución y el costo-efectivo de los micro-Arrays, las sociedades científicas arriba mencionadas recomiendan emplear los microArrays genómicos en pacientes que presenten **dos o más** de las siguientes características:

- Trastornos del neurodesarrollo
- Discapacidad intelectual
- Anomalías congénitas/Rasgos dismórficos
- Autismo y desórdenes del espectro autista
- Epilepsia y ADHD (déficit de atención e hiperactividad)

Lo anterior es especialmente útil, cuando: (1) el espectro clínico no encaja en un trastorno genético o síndrome conocido, y (2) cuando el **cariotipo es normal**, ya que con la citogenética convencional de 500 bandas se suelen escapar desbalances genómicos que estén por debajo del rango de 5-10 Mb (mega-pares de bases). De hecho, para los cuadros clínicos anteriores, la sensibilidad diagnóstica de los microArrays se ha estimado en un 15-20%, mientras que solo alcanza un ~3% a nivel de cariotipos.

Recientemente, con la disponibilidad comercial de microArrays de mayor resolución, la lista de aplicaciones diagnósticas se ha extendido a **nuevas** presentaciones clínicas **de etiología desconocida** o por definir (Silva et al. 2019), tales como:

- 
- Crecimiento clínicamente anormal: pronunciada baja estatura, excesivo crecimiento pondoestatural, microcefalia, macrocefalia.
 - Amenorrea primaria o secundaria, o insuficiencia ovárica.
 - Ambigüedad genital.
 - Azoospermia/Oligospermia severa.
 - Feto con malformaciones/mortinato.
 - Producto abortado (después de 2 abortos)

QUÉ DETECTAN LOS MICROARRAYS:

1. Ganancias o pérdidas sub-microscópicas de segmentos cromosómicos, como:

- Micro**D**elecciones y Micro**D**uplicaciones (< 5Mb)
- Micro**T**ranslocaciones no-balanceadas
- Cromosomas marcadores o en anillo (identifican su origen genómico)
- Mosaicismos sub-microscópicos (> 10%)
- CNVs o Variaciones en el número de copias, y su contenido génico

2. Todas las anteriores suelen estar ligadas a anomalías físicas y/o retardo psico-motor.

3. Los microArrays actualmente en uso también detectan:

- UPD: Disomías UniParentales, indicativas de trastornos de "imprinting".
- LOH: Pérdidas de Heterocigosidad
- ROH: Regiones de homocigosidad, sugestivas de riesgo incrementado para trastornos autosómicos recesivos.

QUÉ NO DETECTAN:

Alteraciones cromosómicas equilibradas tales como translocaciones balanceadas, inversiones, inserciones neutras, mosaicismos crípticos o menores del 10%, y translocaciones Robertsonianas (fusiones centroméricas entre acrocéntricos).

NOMENCLATURA en el REPORTE DE RESULTADOS

- Los reportes de anomalías incluyen los genes involucrados, el cromosoma y el tamaño de la anomalía en número de nucleótidos. Los hallazgos también incluyen un resumen empleando una nomenclatura internacional, siguiendo las recomendaciones de la ISCN-2016 (ver Ref), y que explicamos a continuación en un caso puntual.
- A modo de ejemplo sencillo y didáctico, veamos el caso de una micro**d**elección, y el significado de cada componente de la nomenclatura:

Ejemplo de un Resultado con nomenclatura resumida:

arr[GRCh38] 4q32.2q35.1(163146681_183022312)x1

Donde :

arr = array

[GRCh38] = [Genome Research Consortium human build 38]. Significa que el microarray empleado contiene sondas tomadas de un pool de ADNs humanos de referencia, versión 38. Las versiones han ido cambiando a medida que se han incorporado ADNs de diferentes orígenes poblacionales.

4q32.2q35.1 = Corresponde a las bandas del brazo largo (q) del cromosoma 4 involucradas en la alteración genómica, i.e., desde la banda q32.2 hasta la q35.1.

(163146681_183022312) = Corresponde al rango de nucleótidos involucrados en la alteración genómica, i.e., desde el nucleótido 163.146.681 hasta el 183.022.312 inclusive. En este caso la alteración abarcó ≈ 19.8 Mb ($183.022.312 - 163.146.681 = 19.875.631$). En cada cromosoma los nucleótidos se numeran de telómero a telómero, empezando en cero en el telómero del brazo corto. Se excluyen centrómeros, telómeros y regiones pericentroméricas ricas en secuencias altamente repetidas,

x1 = Significa que en el genoma del paciente hay una sola copia de ese segmento, lo cual corresponde a una **delección de 19.8 megabases**. En este ejemplo teórico, la delección sería detectable o corroborable a nivel de un cariotipo de alta resolución, ya que supera el rango límite de una pequeña banda cromosómica (5-10Mb).

Para el caso de una **microduplicación**, se escribiría **x3**, lo cual significa que hay una copia extra de un segmento cromosómico, partiendo de que lo normal es x2, ya que los microArray pediátricos o neonatales, se suele realizar en leucocitos diploides (2n).

TERMINOLOGIA y DEFINICIONES

CNV: Del inglés "copy number variation", se refiere a variaciones en el número de copias de segmentos genómicos (1, 3, 4 o más copias). Descubiertas en años posteriores a la publicación del genoma humano, sorprendentemente se encontró que abundan en el genoma humano, varían entre individuos/familias y la gran mayoría son benignas. Algunas contienen genes, y en los últimos años se han descubierto CNVs asociadas a patologías del neurodesarrollo (ej., Charcot-Marie-Tooth). También se han hallado asociadas a enfermedades crónicas del adulto y de genética multifactorial como diabetes, hipertensión y obesidad (Crawford et al. 2019). El tamaño de los CNVs varía desde unas pocas kilobases hasta megabases. Por convención se suele referir a un CNV cuando la alteración es menor de 5Mb.

SNP: Del inglés "single nucleotide polymorphism", son variaciones de un solo nucleótido que abundan en el genoma humano. Se ha calculado que hay un SNP cada 500 bases o menos en el pool de genomas humanos, para un total de $\sim 6 \times 10^6$, siendo así el polimorfismo genético más abundante en nuestra especie, y probablemente el tipo de variación genética de mayor importancia en las enfermedades comunes y en la farmacogenética. Para detectar ambos alelos en un microArray con oligo-SNPs, se requiere que cada punto de la micromatriz contenga los 2 tipos de oligonucleótidos para los 2 alelos. Ello hace factible detectar UPD, ROH y LOH.

UPD: La **disomía uniparental** ocurre cuando las dos copias que normalmente tiene cada cromosoma en una persona (una materna, otra paterna), provienen o se heredan de un solo progenitor, mientras que el otro progenitor no aporta ese cromosoma a la descendencia. Es un raro fenómeno de doble no-disyunción meiótica, cada una en un progenitor diferente. Entonces, si el cigoto recibe los dos cromosomas **homólogos** de un solo progenitor, se trata de una heterodisomía; mientras que si hereda las dos **cromátidas hermanas**, se denomina isodisomía. La frecuencia de UPDs en recién nacidos se ha estimado en 1/3500, siendo mayor en los síndromes de "imprinting" que se mencionan a continuación.

Un microArray que no tenga oligo-SNPs no detectaría ninguno de los dos tipos de UPD, ya que en las UPD no hay un cambio de dosis en el contenido cromosómico o génico. Las patologías se suelen dar cuando el cromosoma involucrado contiene genes improntados ("imprinting") como es el caso de los síndromes de Angelman, Russell-Silver, Beckwith-Wiedemann, Pseudohipoparatiroidismo tipo 1b, y Prader-Willi. En este último caso el síndrome se desarrolla si el paciente posee 2 copias maternas del cromosoma 15.

ROH: Las regiones de homocigosidad se definen como trechos ininterrumpidos de alelos en estado homocigoto (2x), cuya longitud promedio poblacional oscila entre 0.5 y 1 Mb, y 3-10 Mb en estudios clínicos (Kerney et al. 2011). Están distribuidos en todos los cromosomas del genoma humano (Wen et al. 2019). Las ROH pueden contener varios genes en estado homocigoto, permitiendo la expresión y el descubrimiento de genes recesivos (Sund et al. 2013). Ello se ha evidenciado en familias consanguíneas en las cuales se han detectado intervalos de homocigosidad de mayor tamaño y con mayor frecuencia, y que han permitido descubrir genes recesivos y regiones genómicas implicadas en fenotipos pediátricos complejos (Lin et al. 2013; Chávez et al. 2019). También se han encontrado ROHs en enfermedades crónicas del adulto como en casos de artritis reumatoide, Alzheimer y mieloma múltiple (Yang et al. 2012; Ghani et al. 2016; Went et al. 2019).

LOH: Traduce pérdida de heterocigosidad, y consiste en la delección de un gen y regiones circundantes, generando un estado de hemicigosidad. Las LOH son particularmente importantes en cáncer. De hecho, son frecuentes en los tumores sólidos más comunes en niños, como el tumor de Wilms (WT1) y los meduloblastomas (APC, SUFU) (Hawthorn et al. 2011; El Doussouki et al. 2019). También se han detectado LOHs en las formas sindrómicas de predisposición hereditaria como Li-Fraumeni (TP53), el feocromocitoma-paraganglioma hereditario (SDH), el blastoma pleuropulmonar sindrómico (DICER1), el tumor rabdoideo del riñón (SMARCB1) y la neoplasia endocrina múltiple (MEN1 y RET).

CÓMO SOLICITAR EL ESTUDIO

Se solicita como Diagnóstico molecular de Enfermedades (Cod. 32117) (**MicroArray de alta resolución, 750K**). Ver Manual Tarifario SOAT de Salud-2020 (Código 32117, pag.87); allí el precio aceptado para el "Diagnóstico molecular de Enfermedades" es genérico ya que solo estipula un solo precio para todas las enfermedades moleculares. Sin embargo, cubre cerca del 80% del costo de un microArray de DNA, y es claramente rentable debido a su mayor poder de resolución ($\geq 100X$ que el de un cariotipo convencional). Además, evita la realización de un número de pruebas clínicas complementarias que incrementan el coste final del diagnóstico.

ASPECTOS TÉCNICOS / METODOLÓGICOS: Ver ref. 1,2,5

BIBLIOGRAFÍA

1. Affymetrix. Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software-Support Materials. (2015). <https://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=chas>.
2. Aziz MM (2017). Application of DNA Microarrays in Cytogenetics. Int J Cell Sci Mol Biol 2(1):7-12.
3. Crawford K, et al. (2019). Medical consequences of pathogenic CNVs in adults: analysis of the UK Biobank. J Med Genet 56:131-138.
4. Chaves TF, et al. (2019). Long contiguous stretches of homozygosity detected by chromosomal microarrays (CMA) in patients with neurodevelopmental disorders in the South of Brazil BMC Med Genomics. 12: 50.

5. Dalma-Weiszhausz DD, et al. (2006). The Affymetrix GeneChip Platform: An Overview. *Methods Enzymol* 410:3-28.
6. D'Amours G, et al. (2014). SNP arrays: comparing diagnostic yields for four platforms in children with developmental delay. *BMC Med Genomics* 70(7):1-17.
7. El Doussouki M, et al. (2019). Molecular genetics of medulloblastoma in children: diagnostic, therapeutic and prognostic implications. *Future Neurol* 14(1):1-13.
8. Ghani M, et al. (2015). Association of Long Runs of Homozygosity With Alzheimer Disease Among African American Individuals. *JAMA Neurol* 72(11):1313-23.
9. Hawthorn L, et al. (2011). Analysis of Wilms Tumors Using SNP Mapping Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *PLoS One*. 2011; 6(4): e18941.
10. ISCN (2016): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (eds), (S Karger, Basel 2016). *Cytogenet Genome Res* 149:1-140.
11. Kearney HM, et al. (2011). Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med* 31(4):595-613.
12. Lin PI, et al. (2013). Runs of Homozygosity Associated with Speech Delay in Autism in a Taiwanese Han Population: Evidence for the Recessive Model. *PLoS One* 8(8): e72056.
13. Silva M, et al. (2019). European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet* 27: 1-16.
14. Sund KL, et al. (2013). Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genetics in Medicine* 15(1):70-78.
15. Wen J, et al. (2019). Analytical validation and chromosomal distribution of regions of homozygosity by oligonucleotide array comparative genomic hybridization from normal prenatal and postnatal case series. *Molec Cytogenet* 12(12):1-10.
16. Went M, et al. (2019). Regions of homozygosity as risk factors for multiple myeloma. *Ann Hum Genet* 83(4):231.
17. Yang HC, et al. (2012). A Genome-Wide Homozygosity Association Study Identifies Runs of Homozygosity Associated with Rheumatoid Arthritis in the Human Major Histocompatibility Complex. *PLoS One* 7(4): e34840.

2. PEDIATRÍA

ANEMIA de FANCONI revisitada

Puntos resumen

- La **Anemia de Fanconi (AF)** es un tipo de anemia aplásica de genética compleja, asociada a falla medular, defectos/malformaciones congénitas, susceptibilidad a cáncer, inestabilidad cromosómica, e inhabilidad para reparar daños en el ADN (daños tipo ligamiento cruzados entre cadenas del ADN) (ver revisión de Mehta & Tolar, 2018).
- La AF puede ser causada por mutaciones autosómicas homocigotas recesivas en cualquiera de los **22 genes** hasta ahora conocidos, que intervienen en la reparación daños específicos en el ADN. La única excepción no autosómica conocida a la fecha es el gen **FANCB** (~2% de los casos) de herencia recesiva ligada al X, en donde los afectados son varones hemocigotos. El prefijo FANC quiere decir "Fanconi Anemia Complementation group". Por ejemplo, el gen **FANCA** significa Fanconi Anemia Complementation group A. Mas adelante se explicará qué es un grupo de complementación y su equivalencia a un gen.

- La mayoría (~90%) de pacientes hasta ahora reportados son homocigotos para cualquiera de los siguientes 3 genes: **FANCA** (~65%), **FANCC** (15%), o **FANCG** (~10%).
- Estas mutaciones pueden ser de origen espontáneo (*de novo*: esporádicas no-germinales), o heredadas de padres heterocigotos (germinales); la frecuencia de heterocigotos varía entre poblaciones (ej. 1/181 en NorteAmérica y 1/93 en Israel).
- Cuando hay evidencia de herencia germinal de padres heterocigotos, los descendientes afectados son genéticamente homocigotos para el mismo gen en uno de los 22 genes conocidos a la fecha. Si los progenitores no son consanguíneos, las dos mutaciones recesivas en los hijos afectados pueden estar en diferentes loci dentro del mismo gen.
- El diagnóstico clínico de la AF puede ser un tanto complejo ya que la presentación clínica difiere entre pacientes (ver Tabla adjunta). Y cerca del 25% de los afectados tienen muy pocas o ninguna anomalía física. Además, otros síndromes genéticos de falla medular, en la niñez se asemejan a la AF, como la anemia Diamond-Blackfan (DBA), la dyskeratosis congénita (DC), entre otros (Auerbach et al., 2015, anexo). Por tanto, el diagnóstico preciso, citogenético o molecular, es esencial para optimizar el manejo clínico.

• El **diagnóstico definitivo** se consolida mediante:

a) El estrés-test de fragilidad cromosómica global inducida preferentemente con **DEB (diepoxibutano)**, u otros químicos que generan ligamientos cruzados entre las dos cadenas del ADN como la mitomicina-C o el cisplatino (ver foto contigua).

b) Un Panel Multigénico multiexómico para AF. **Ambos tests están disponibles en Genética Lab.**



Metafase de un cultivo celular tratado con (DEB) proveniente de un paciente con AF. Nótese el aumento en la fragilidad cromosómica: quiebres cromatídicos, deleciones y rearrreglos multirradiados.

- El **DEB** se recomienda como test diagnóstico de preferencia para AF, debido a que ha mostrado mayor sensibilidad y especificidad (Auerbach et al., 2015), al compararlo con otros agentes clastogénico tradicionales.
- El test con DEB se solicita como **test de fragilidad cromosómica con DEB.**
- El estrés-test con **DEB** funciona igual para cualquiera de las variantes Fanconi tales como las frecuentes **FANCA** (~65%), **FANCC** (~15%), o **FANCG** (~10%).
- En nuestro medio, ante la limitación financiera de acceder a un panel multigénico para pacientes con sospecha clínica de AF, el estándar de oro para cualquiera de las variantes génicas de la AF, es el estrés-test con **DEB** que precisa el diagnóstico, independiente del gen mutado involucrado. Además, descarta fenocopias y/o las confusiones clínicas traslapadas. (Nota: Las tarifas SOAT cubren el coste de un panel multigénico para AF).

Manifestaciones Clínicas en AF		
Sistema	%*	Anomalías congénitas comunes
Endocrino	79%	RCIU/Estatura baja, Hipotiroidismo, Diabetes, Déficit de hormona del crecimiento, Infertilidad.
Esquelético	50%	Anomalías de los pulgares, en dedos de M.I, costillas, anomalías en el radio, Hipoplasia de la eminencia tenar, Displasia ulnar, Sindactilia en M.I, Displasia de cadera, Microcefalia, Micrognatia, Cara triangular, Deformidad de Sprengel, Síndrome de Klippel-Feil, Escoliosis,
Piel	40%	Manchas café con leche, Hiper/hipopigmentación,
Renal	20%	Riñón ectópico, Riñón pélvico, Riñón en herradura, Hipoplasia/ aplasia/displasia renal, Hidronefrosis, Hidroureter.
Auditivo	11%	Hipoacusia (conductiva), Deformidad anatómica, Atresia, Anomalías en oído medio.
Gastrointestinal	7%	Atresia esofágica, duodenal o yeyunal, Ano imperforado, Fistula traqueoesofágica
Cardiopulmonar	6%	Anomalías estructurales congénitas.
Visión	20%	Ojos pequeños, Hipotelorismo, Estrabismo, Pliegue epicanto, Cataratas, Astigmatismo.
Gonadal	25%	Hipogenitales, Criptorquidia, Hipospadias, Micropene, Útero bicorne, Azoospermia.

- Todos los pacientes con AF poseen alta susceptibilidad neoplásica, particularmente a desarrollar leucemia mieloide aguda (LMA), carcinoma de células escamosas, síndrome mielodisplásico, y otras neoplasias (Savage & Walsh, 2018; Niraj et al., 2019). Por tal razón, se recomienda vigilancia médica especializada desde la niñez.
- Si el diagnóstico no se precisa mediante el estrés-test con DEB, los pacientes con cáncer pueden desarrollar mielosupresión letal durante la quimioterapia antineoplásica.
- Cerca del 10% de pacientes con AF solo se diagnostican hasta la adolescencia o la adultez, al punto que algunos han sido descubiertos y diagnosticados con azoospermia idiopática (Krausz et al., 2019).}

Índices de sospecha clínica: Según la Guía Diagnóstica y de Manejo de la AF (Edic. 4ª, 2014), los defectos congénitos más frecuentes, en orden descendiente de frecuencia (del 50 al 20%) incluyen: hematología anormal, hiperpigmentación en la piel, hipopigmentación con manchas café con leche, baja estatura, pulgares y radio anormales, anormalidades en cabeza, ojos, riñón y orejas. La **Tabla** superior, es un compendio de los hallazgos encontrados en casos reportados en la literatura, y que pueden servir de guía para evaluar a un paciente con sospecha de AF. Sin embargo, un 25% de AF confirmados, solo poseen una o ninguna de estas características.

Mosaicismo en AF: Con el tiempo, algunos pacientes muestran recuperación paulatina de la falla medular; y en varios reportes se ha logrado demostrar que poseen mosaicismo génico, producto de reversión génica (*gene conversión*) de unos de los dos loci de la AF, o entrecruzamiento somático, generando resistencia al DEB. Este último mecanismo es plausible en homocigotos compuestos en los cuales las dos mutaciones están distantes en los cromosomas homólogos, y el entrecruzamiento somático coloca los dos alelos no mutados en una misma cromátida que

luego genera un clón (+/+) resistentes a la fragilidad con DEB. Aun así, estos pacientes siguen siendo Fanconi, y tratados como tales, ya que en otros tejidos de menor proliferación celular que la médula ósea, las células permanecen con genotipo Fanconi (-/-) y sensibles a la fragilidad clastogénica (Nicoletti et al., 2020).

Asesoría genética: Una vez confirmado el diagnóstico mediante el estrés-test con DEB, es altamente recomendable que todo paciente con AF y sus familiares, reciban asesoría genética por un especialista que conozca los aspectos genéticos y moleculares de la enfermedad.

Función Canónica de las Proteínas AF: Bajo condiciones de no-mutación, la función canónica de las proteínas de la vía de señalización AF, es la de colaborar con otras proteínas de reparación para eliminar del ADN los efectos clastogénicos (quiebres cromosómicos). Se trata de una compleja vía bioquímica de alta eficiencia para reparar quiebres de doble cadena en el ADN a través de la recombinación homóloga. Esta vía de señalización funciona dentro de una crítica red de supresores tumorales que preservan la integridad genómica, estabilizando las horquillas de replicación del ADN, mitigando el estrés replicativo, y regulando la citoquinesis. Las proteínas de la vía AF hacen parte de los guardianes de la estabilidad genómica (Chen et al., 2018).

De otro lado, cuando hay mutación homocigota (-/-) en los pacientes con AF, se presentan dos características aparentemente antagónicas: (a) muerte celular masiva en el nicho hematopoyético de células madre y progenitoras (HSPC), generando falla medular (BMF), y (b) proliferación celular de células neoplásicas derivadas de la Anemia de Fanconi, y que escapan a la muerte celular y continúan propagando la inestabilidad genómica que genera propagación de mutaciones y cáncer (Naleppa & Clapp, 2018).

¿Qué es un Grupo de Complementación? En la genética moderna, un grupo de complementación (GC) es equivalente a un gen, y cada mutación en un GC es equivalente a los alelos de un gen. En la Anemia de Fanconi el término surgió hace años de experimentos en los cuales se fusionaban fibroblastos de un par de pacientes con AF, y las células híbridas se sometían al estrés-test con MMC. Si mostraban alteraciones citogenéticas elevadas, significaba no-complementación ya que ninguno de los dos genomas tenía genes que suplieran la función alterada. Por tanto, si los dos genomas no restituían la función normal, significaba que ambos tenían mutado el mismo gen. Por el contrario, si había complementación significaba que los dos genomas sustituían entre sí la función alterada. Y los fibroblastos originales se asignaban a GC diferentes. En la actualidad simplemente se extrae DNA del paciente y se somete a secuenciación exómica dirigida mediante un Panel Multigénico específico para AF. **Este método también lo ofrece GenéticaLab.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Auerbach AD, et al. (2015). Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis. *Curr Protoc Hum Genet* 2015; 85: 8.7.1–8.7.17.
2. Che R, et al. (2018). Multifaceted Fanconi Anemia Signaling. *Trends Genet* 34(3): 171–183.
3. Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Fourth Edition, 2014.

4. Krausz C, et al. (2019). From exome analysis in idiopathic azoospermia to the identification of a high-risk subgroup for occult Fanconi anemia. *Genetics in Medicine* 21:189–194.
5. Mehta PA & Tolar J. (2018). Fanconi Anemia - Gene Reviews. US National Library of Medicine.
7. Naleppa G & Clapp DW (2018). Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship. *Nat Rev Cancer* 18(3):168-185.
8. Nepal M, et al. (2017). Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends in Cancer* 3(12): 840-856.
9. Nicoletti E, et al. (2020). Mosaicism in Fanconi anemia: concise review and evaluation of published cases with focus on clinical course of blood count normalization. *Annals Hematol* 99:913–924.
10. Niraj J, et al. (2019). The Fanconi Anemia Pathway in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol* 3:457–78.
11. Savage SA & Walsh MF. (2018). Myelodysplastic Syndrome, Acute Myeloid Leukemia, and Cancer Surveillance in Fanconi Anemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 32: 657–668.

3. SECCIÓN DIDÁCTICA

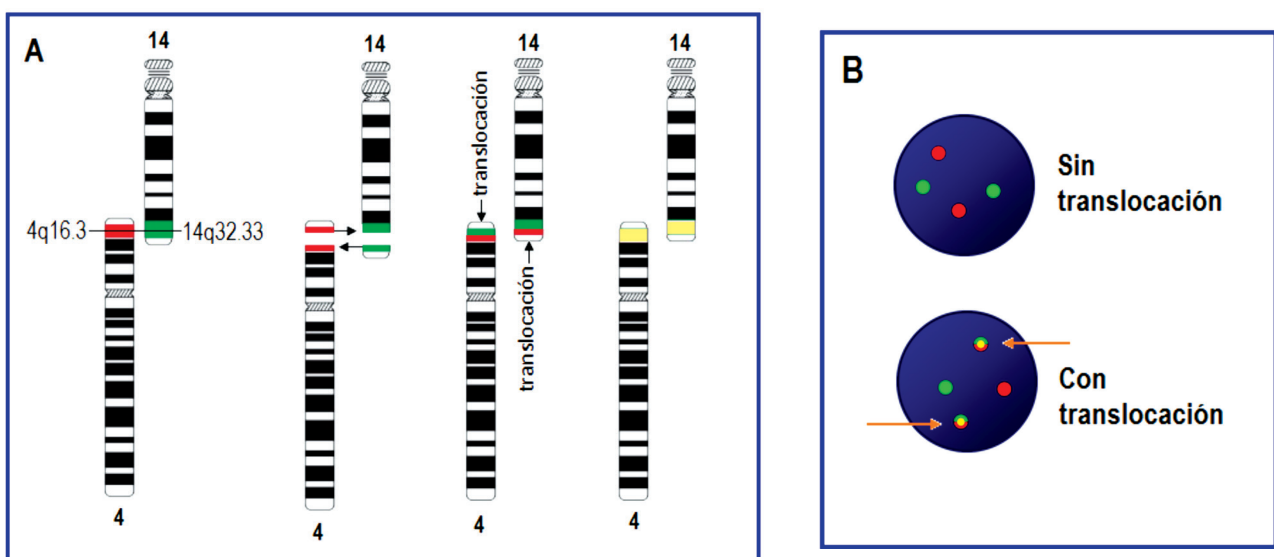
FISH: GUÍA PRÁCTICA PARA INTERPRETAR LOS CASOS MAS COMUNES DE TRANSLOCACIONES

Esta sección didáctica, en esta ocasión se referirá al uso de sondas de dos colores (**verde** y **rojo**) aplicadas al estudio de translocaciones recíprocas que constituyen la anomalía inter-cromosómica más común en neoplasias hematológicas y tumores sólidos.

Hay **dos tipos de sondas** para translocaciones recíprocas, que se explican a continuación.

A. Sondas DUAL FUSION

Se trata de 2 sondas de diferente color, que **en núcleos normales hibridan separadamente en 4 sitios diferentes**, i.e., en dos pares de cromosomas homólogos diferentes. Pero cuando ocurre la **translocación**, las sondas **verde** y **roja** quedan tan juntas (“**dual fusión**”) que tanto en núcleos interfásicos (G1, S, G2) como en cromosomas mitóticos, aparentan superposición o co-localización, generando señales fluorescentes amarillentas, como se esquematiza en los siguientes diagramas A y B.



El diagrama **A** muestra una secuencia didáctica que explica cómo se daría la translocación t(4;14), común en Mieloma Múltiple.

Primero se indican las bandas cromosómicas donde usualmente se quiebran los cromosomas 4 y 14 antes de la translocación. Nótese que cada banda ya está hibridada con su respectiva sonda de color rojo o verde. A continuación, se resaltan los segmentos que participarían en el intercambio. El tercer diagrama muestra la translocación consolidada; vale resaltar que los segmentos que se translocan son citogenéticamente muy pequeños, razón por la cual, esta translocación, en particular, pasó desapercibida varios años en los cariotipos convencionales, hasta que fue descubierta empleando FISH. Finalmente, el cuarto diagrama remeda lo que ocurriría cuando las sondas verde y rojo estrechamente co-localizadas, generan señales fluorescentes amarillosas, a veces con bordes verdes y/o rojos.

En resumen, con sonda **Dual Fusion**, la fusión de colores es sinónimo de translocación, como se esquematiza en el diagrama **B**: núcleos sin la translocación (arriba) o con la translocación (abajo).

En el ejemplo de arriba [t(4;14)], aunque se desconoce su génesis, hay evidencias de que al translocarse el gen *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*) al cromosoma 14, su expresión se altera al quedar bajo la influencia de potenciadores en el gen *IGH* localizado en el cromosoma receptor 14. De manera similar, el gen *NSD2* se sobre expresa al quedar translocado en el cromosoma 4.

Reporte de Resultados: Los reportes clínicos de cualquier alteración cromosómica molecular, deben llevar una descripción explícita del hallazgo, acompañada de la descripción técnica basada en la nomenclatura internacional vigente (ISCN, 2016). Veamos un ejemplo de esto último, usando como modelo de un resultado, la translocación t(4;14) del esquema **B** en un paciente con mieloma múltiple (médula ósea):

nuc ish(FGFR3x1),(IGHx1),(FGFR3 con IGHx2)[134]/(FGFR3x2),(IGHx2)[66]

Interpretación de la nomenclatura: **nuc:** núcleo. **ish:** hibridación in situ. **(FGFR3x1):** Significa que la sonda FGFR3 (**roja**) que cubre el respectivo gen, emitió 1 señal (x1) en [134] de los núcleos examinados, lo mismo que la sonda **IGHx1**). El tercer paréntesis indica que ambas sondas están contiguas o conectadas (**con**); son las que generan **dos** señales amarillentas, con algo de bordes rojos o verdes vistos al microscopio; estas señales amarillentas son una clara evidencia FISH de que ha ocurrido translocación recíproca. Luego el símbolo (/) se utiliza para separar dos poblaciones celulares. En este ejemplo, se detectaron 66 núcleos con dos señales verdes y dos rojas, i.e., sin evidencia de translocación.

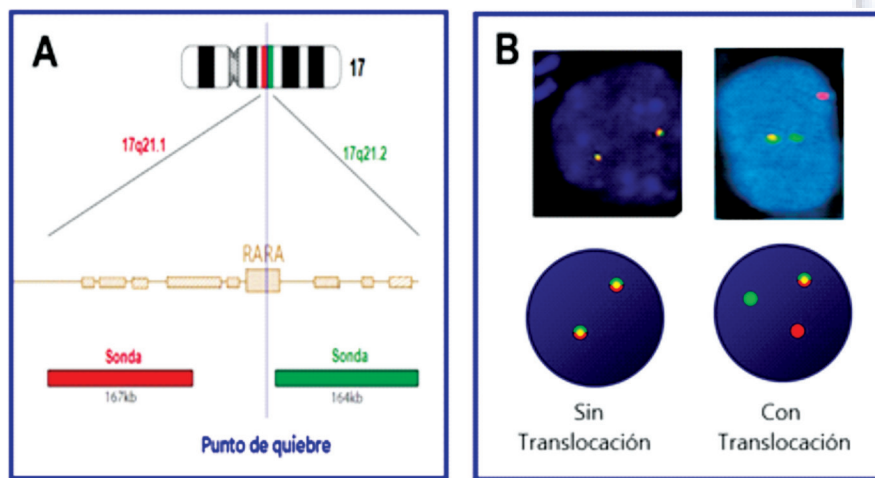
Finalmente, cabe anotar que la nomenclatura ISCC es algo flexible. Por ejemplo, permite, la opción de escribir como prefijo a la sonda, la banda cromosómica donde se localiza el gen. En el caso anterior sería nuc ish 4p16.3(FGFRx1),14q32.33(IGHx1)...etc.

En resumen, en la muestra de médula ósea examinada, se encontró evidencia de un clón numeroso (67%) con translocación t(4;14), usualmente asociada a la fase proliferativa de la enfermedad, mieloma múltiple.

B. Sondas BREAK APART

Se trata de 2 sondas de diferente color, que **hibridan muy juntas en cada cromosoma** homólogo normal (Fig.A) de manera que las sondas **verdes** y **rojas** quedan tan juntas que generan señales fluorescentes amarillosas en núcleos interfásicos (Fig B, izquierda).

Pero cuando ocurre la **translocación**, las sondas **verde** y **roja** se separan ("break apart"), como se esquematiza a continuación. Tomemos como ejemplo la translocación del gen *RARα* (*retinoic acid receptor alfa*) (cromosoma 17q21.1), que en el ~95% de los casos de Leucemia Promielocítica Aguda, se encuentra translocado al gen *PML* en el cromosoma 15 (banda 15q24.1) resultando en la bien conocida translocación t(15;17). En una minoría de casos *RARα* se fusiona a otros genes en otros cromosomas; pero la gran ventaja de la sonda *RARα* (break apart) es que detecta participación de *RARα* en otros rearrreglos o translocaciones, sin importar la identificación del cromosoma receptor.



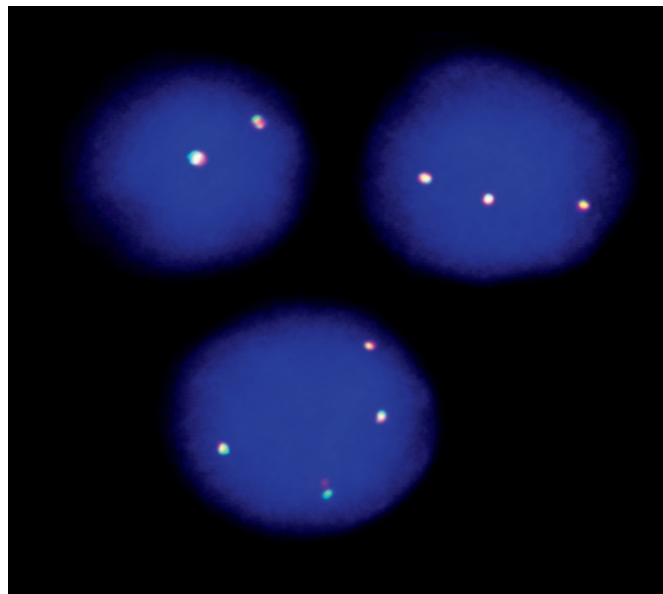
La figura **A** (catálogo CYTOCELL) muestra las dos sondas yuxtapuestas entre las bandas 17q21.1 y 17q21.2. También indica el punto de quiebre a nivel citogenético, que a nivel molecular suele darse en el intrón 2 de dicho gen *RARα*. La Figura **B** muestra un ejemplo de un núcleo con 2 señales amarillentas (cuadro izquierdo) indicativas de que el gen *RARα* no se ha partido, mientras que el núcleo de la derecha indica que una de las señales amarillentas se ha convertido en dos señales separadas, verde y roja, lo cual constituye una evidencia de que la sonda de fusión verde-roja se ha escindido en señales separadas: Un segmento queda en el cromosoma 17, y el otro se suele translocar al cromosoma 15 (~95% de los casos).

La proteína que transcribe *PML* es un factor de transcripción, mientras que el gen *RARα* codifica un receptor nuclear. Esta fusión génica genera una proteína de fusión PML-RARA que opera como factor de transcripción RARA dominante negativo, resultando en proliferación en un estado promielocítico inmaduro.

Nota: Esta Sección Didáctica, tiene como propósito proveer elementos de enseñanza para quienes se inician en este campo y/o para quienes desean recordar conceptos.

Se iniciará con ejemplos sencillos didácticos, los cuales podrán avanzar en complejidad dependiendo de las circunstancias. A través de nuestra página web www.geneticalab.com.co, nuestros lectores son bienvenidos a sugerir temas.

AUTOEVALUACIÓN



1. La foto de arriba muestra tres núcleos con coloración FISH, provenientes de una muestra de médula ósea de un paciente con un tipo de leucemia. Se utilizó la sonda MLL de Cytocell. Y de un total de 200 núcleos analizados, los resultados mostraron 45 núcleos con 2 señales, 80 con 3 señales y 75 con 4 señales. Cómo se escribiría el resumen de este resultado utilizando la nomenclatura internacional en nomenclatura ISSN?
2. ¿Qué tipo de sondas emplearon, "break apart" o "dual fusion"?
3. En muchas leucemias se utilizar la técnica FISH para apoyar el diagnóstico. Asumiendo que en niños con leucemia, hay un subtipo de ellas que en el ~85% de casos presentan translocación con este gen MLL ¿Cuál cree que sería la más probable sospecha diagnóstica? Y cómo se interpretaría el resultado de la foto?
4. En el núcleo abajo, ¿cómo se explica que la señal inferior aparece ligeramente separada en dos colores diferentes?
5. Porqué el diepoxibutano (**DEB**) induce quiebres cromosómicos en cultivos in vitro de linfocitos de sangre periférica de pacientes con Anemia de Fanconi homocigotos *FANCA*⁻/*FANCA*⁻, y no en linfocitos de personas sin esa mutación?
6. Porqué las personas heterocigotas *FANCA*⁺/*FANCA*⁻ son generalmente insensibles al test de fragilidad cromosómica con **DEB** ?
7. Explique la razón de esta frase: *Si el diagnóstico no se precisa mediante el estrés-test con **DEB**, los pacientes con una neoplasia hematológica pueden desarrollar mielosupresión letal durante la quimioterapia antineoplásica.*
8. Explique la razón de esta frase: *Si los progenitores no son consanguíneos, las dos mutaciones recesivas que recibe el descendiente afectado, pueden estar en diferentes loci.*

Nota: Ver respuestas al respaldo de esta página.

AUTOEVALUACIÓN: Respuestas

1. nuc ish(MLLx2)[45]/(MLLx3)[80]/(MLLx4)[75]

Si se conoce la ubicación citogenética del gen MLL, es opcional indicarlo. En ese caso la nomenclatura sería:

nuc ish(11q23.3)(MLLx2)[45]/(MLLx3)[80]/(MLLx4)[75]

2. Break-apart

3. LLA-B. Amplificación génica con o sin aneuploidía.

4. Cuando las células no están en mitosis sino en interfase, la cromatina nuclear se desempaca y extiende considerablemente, razón por la cual en los núcleos en interfase no se logran ver cromosomas. Ocasionalmente la técnica FISH logra detectar focos puntuales de extrema decondensación, como en este caso.

5. Las células de las personas homocigotas recesivas para el gen **FANCA** (o sea -/-), carecen de la proteína FANCA que hace parte fundamental de un complejo multiprotéico que participa en la reparación de daños en el ADN, en particular, el tipo de daño que producen sustancias químicas como el **DEB** (alquilante bifuncional) capaz de ligar hebras complementarias del ADN. En las células (-/-), incapaces de remover estos ligamientos cruzados, se generan quiebres en el ADN cuando la célula replica su ADN. En células normales (+/+) la remoción de daños es muy eficiente.

6. Las personas heterocigotas **FANCA+ /FANCA-** tienen un gen **FANCA** activo (+), que genera suficiente proteína FANCA para formar los complejos de reparación activos y reparar los daños que induce el **DEB**.

7. Entre los antineoplásicos, hay sustancias químicas que generan daños en el ADN, daños que son reparados en buena medida en las células no proliferativas del paciente, pero coadyuvan a eliminar células proliferativas del tumor. Pero si el paciente resulta tener AF no diagnosticada con el test del DEB, la letalidad celular con la quimioterapia se potencia generando letalidad masiva en células cancerosas y no cancerosas de la médula ósea.

8. Es más probable que dos personas heterocigotas para AF tomadas al azar, tengan la mutación en diferentes lugares (loci) del gen. Por el contrario, si pertenecen al mismo grupo familiar, es altamente probable que tengan la mutación en el mismo locus.



📍 Torre Intermédica Centro de Especialistas
Calle 7 No. 39-197
Consultorios 918 - 919

☎ (+574) 321 33 40 - 321 29 29

📠 315 506 5062

✉ geneticalabsas@gmail.com

🌐 www.geneticalab.com.co

Portafolio: ver página web

Medellín, Colombia