

00346 E

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**AISLAMIENTO DEL FACTOR DE CORRECCIÓN DE LAS ABERRACIONES
CROMOSÓMICAS EN ANEMIA DE FANCONI, POR MEDIO DE
FRACCIONAMIENTO DE PLASMA HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)**

P R E S E N T A

BERTHA MOLINA ALVAREZ

Director de Tesis: Dra. Sara Frias Vázquez
Cotutor: Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F.

265482₁₉₉₈



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE CITOGENETICA DEL
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN GENETICA HUMANA DEL
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, S.A, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA.
SARA FRIAS VAZQUEZ.

**ESTE TRABAJO SE DESARROLLO BAJO LA COTUTORIA DEL DR. ALFONSO
MIGUEL TORRE BLANCO, DEL LABORATORIO DE BIOQUIMICA, FACULTAD
DE CIENCIAS, UNAM.**

EL PRESENTE TRABAJO FUE PARCIALMENTE FINANCIADO POR LA
FUNDACION MEXICANA PARA LA SALUD.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Sara Frias, por la *dirección* de esta tesis y por su apoyo incondicional en mi formación académica. Sara, maestra y guía, te agradezco infinitamente tu paciencia, confianza y amistad.
- Al Dr Alfonso Torre Blanco por su asesoría y apoyo en el desarrollo de este trabajo.
- A los doctores: Alessandra Carnevale, Miguel Betancourt Rufe, Mario Altamirano, Patricia Ramos y Luisa Alba Lois, por la revisión, comentarios y sugerencias a este trabajo.
- A todas mis amigas y compañeras : Vicky del Castillo, Lau, Sandra, Marycarmen, Luz, Silvia, Angélica, Bety, Paty, Angy y Chelín por su amistad y agradable convivencia.

ABREVIATURAS

AF. Anemia de Fanconi

MMC. Mitomicina C

DEB. Diepoxibutano

DNA. Acido desoxirribonucleico

TNF α . Factor de necrosis tumoral α

UVA. Ultravioleta A

SOD. Superóxido dismutasa

BrdU. Bromodesoxiuridina

SIC. Síndromes de inestabilidad cromosómica

AT. Ataxia telangiectasia

SB. Síndrome de Bloom

XP. Xeroderma pigmentoso

VLDL. Lipoproteína de muy baja densidad

LDL. Lipoproteína de baja densidad

LHL. Lipoproteína de alta densidad

PBS. Amortiguador salino de fosfatos

SDS. Dodecilsulfato de sodio

EU. Electroforesis unicelular alcalina

SFT. Suero fetal de ternera

INTRODUCCION.....1

Generalidades..... 1

Aspectos clínicos 1

Aspectos citogenéticos.....3

Heterogeneidad Genética y Molecular..... 7

Antioxidantes y metabolismo del oxígeno..... 9

Factores difusibles en los Síndromes de Inestabilidad Cromosómica..... 12

Composición del plasma humano normal..... 14

Efecto del plasma humano normal sobre las células de anemia de Fanconi..... 15

OBJETIVOS.....17

MATERIAL Y MÉTODOS.....18

Muestras celulares..... 18

Obtención del plasma humano normal..... 19

Cultivos celulares..... 19

Técnicas de separación del plasma..... 20

Tratamientos..... 23-26

Fase I. Efecto de las fracciones de plasma obtenidas por ultrafiltración

Fase II. Efecto de las fracciones de plasma obtenidas por Cromatografía molecular en gel.

Fase III.Efecto de la Interleucina 6.

Fase IV.Efecto del plasma normal en los diferentes grupos de complementación con neutralización de la Interleucina 6.

Sistemas de detección del daño al ADN..... 26-29

a) Aberraciones cromosómicas.

Sistemas de detección del daño al ADN.....	26-29
a) Aberraciones cromosómicas.	
b) Síntesis no programada de ADN.	
c) Electroforesis unicelular.	
RESULTADOS.....	30-46
Fase I. Efecto de las fracciones de plasma obtenidas por ultrafiltración: fracción con moléculas menores y mayores de 50 kD.	
Fase II. Efecto de las fracciones de plasma obtenidas por Cromatografía molecular en gel.	
Fase III. Efecto de la Interleucina 6.	
Fase IV. Efecto del plasma normal en los diferentes grupos de complementación con neutralización de la Interleucina 6.	
DISCUSIÓN	47-55
CONCLUSIONES.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	57-63

INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Perfil cromatográfico de los marcadores de peso molecular.....	22
Figura 2. Efecto de la adición de las fracciones obtenidas por ultrafiltración, sobre la síntesis de DNA de linfocitos AF(RZ) tratados con MMC.....	33
Figura 3. Efecto de las fracciones de plasma normal obtenidas por ultrafiltración sobre las aberraciones cromosómicas en linfocitos AF tratados con MMC.....	35
Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS de las fracciones obtenidas por ultrafiltración.....	36
Figura 5. Perfil cromatográfico de la separación de plasma humano normal por medio de cromatografía molecular en gel.....	37
Figura 6. Distribución del porcentaje de linfocitos AF con respecto al nivel de daño al DNA.....	39
Figura 7. Efecto de la IL-6 y del plasma normal en células AF tratadas con MMC por medio de electroforesis unicelular alcalina.....	42
Figura 8. Efecto de la MMC sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas y porcentaje de células con daño, en líneas linfoblastoides AF y normales tratadas con IL-6 y plasma normal.....	44

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Detección de la actividad de plasma normal y fracciones mayor de 50 kD y menor de 50 kD en cultivos de linfocitos de 3 pacientes con AF.....	31
Tabla 2. Detección de la actividad correctora del plasma normal y fracciones mayor de 50 kD y menor de 50 kD en 50 metafases analizadas en cultivos de linfocitos de un paciente con AF (AM).....	31
Tabla 3. Efecto del plasma normal y de las fracciones menor y mayor de 50 kD sobre las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC en cultivos de linfocitos de un individuo control.....	32
Tabla 4. Naturaleza del factor de corrección del plasma normal sobre las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC en linfocitos de un paciente AF (AM).....	32
Tabla 5. Efecto de IL-6 en cultivos de linfocitos AF tratados con MMC.....	41
Tabla 6. Resistencia de linfoblastos AF y normal a la MMC.....	41
Tabla 7. Efecto del plasma normal en líneas linfoblastoides AF y normal tratadas con MMC.....	46

RESUMEN

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva que clínicamente se caracteriza por producir pancitopenia, hiperpigmentación de la piel, retraso en el crecimiento, alteraciones esqueléticas y otras malformaciones congénitas. A nivel celular, cursa con una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas y una hipersensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales significativamente mayor que la observada en células normales. En trabajos previos se encontró que el plasma normal es capaz de disminuir el número de aberraciones cromosómicas que induce la mitomicina C (MMC) en los linfocitos de anemia de Fanconi; estos resultados sugirieron la existencia de un factor difusible, presente en el plasma, capaz de realizar complementación.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue detectar una fracción de plasma humano normal con actividad de corrección de las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC en células AF.

El plasma humano normal se separó por ultrafiltración y cromatografía molecular en gel. Las fracciones obtenidas se probaron en cultivos de linfocitos AF tratados con 40ng de MMC/ml de cultivo y la corrección del daño se detectó por medio del análisis de aberraciones cromosómicas, síntesis de ADN y electroforesis unicelular. Los resultados indicaron que la actividad correctora de las aberraciones cromosómicas se encuentra en una fracción del plasma que contiene moléculas de un peso molecular menor a 60 kD y que es de naturaleza proteica.

Con la finalidad de conocer si la Interleucina 6 (IL-6), molécula de 29 kD, estaba involucrada en la corrección del daño, se probó su actividad en cultivos de linfocitos y de líneas linfoblastoides pertenecientes a los diferentes grupos de AF. La IL-6 corrigió las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC sólo en las células de los grupos de complementación A y D.

Cuando las células AF clasificadas se suplementaron con plasma normal, se demostró que la corrección parcial del daño inducido por la MMC era específica para los linfoblastos pertenecientes al grupo A.

Estos resultados sugirieron que la actividad correctora en de las aberraciones cromosómicas, presente en el plasma normal, está constituida por varios factores y no sólo por uno. Los elementos que podrían contribuir a esta corrección pueden ser factores de reparación, antioxidantes y aporte de nucleótidos y puede ser diferente para cada grupo de complementación, ya que cada uno de ellos tiene alterado un gen distinto.

INTRODUCCIÓN

Generalidades.

La anemia de Fanconi (AF) es un síndrome de inestabilidad cromosómica, autosómico recesivo, con una prevalencia de 1:26,000 a 1:476,000 en varias poblaciones (1); en poblaciones caucásicas se ha estimado que esta enfermedad tiene una frecuencia para homocigotos de 1 en 350,000 y para heterocigotos de 1 en 200 (1-5).

Clínicamente la AF está caracterizada por varios defectos tales como retraso en el crecimiento, pancitopenia progresiva, hiperpigmentación de la piel, diversas malformaciones congénitas, anomalías esqueléticas y predisposición a desarrollar algunas neoplasias (6,7).

Citogenéticamente presentan inestabilidad cromosómica espontánea expresada como rupturas cromatídicas y cromosómicas y figuras radiales (8), también tienen una elevada sensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales como la mitomicina C (MMC) y el diepoxibutano (DEB) que se traduce en muerte celular y en una inducción de aberraciones cromosómicas significativamente mayor que la observada en células normales (9-13).

Aspectos clínicos.

La anemia de Fanconi es una enfermedad autosómica recesiva, descrita inicialmente por el Dr. Guido Fanconi en 1927, que en general se caracteriza por presentar pancitopenia, hiperpigmentación de la piel, retraso en el crecimiento, malformaciones esqueléticas principalmente de radio y pulgares, anomalías cardíacas, renales, genitales y oculares, así como diversos grados de retraso mental (1,6,7,14). Los pacientes presentan además elevada predisposición para desarrollar neoplasias, generalmente leucemias o carcinomas (5,14,15).

Existe una gran variabilidad clínica en los pacientes con AF, se han observado diferencias en cuanto a la presencia y severidad de las malformaciones congénitas asociadas, así como en la edad de aparición y el desarrollo de la pancitopenia.

La AF cursa con una disminución progresiva de las células de la médula ósea, llamada pancitopenia, la cual generalmente se desarrolla entre los 5 y 10 años de edad. Esta pancitopenia puede presentarse gradualmente, de tal manera que al inicio el paciente parece tener una anemia aislada semejante a una leucopenia o trombocitopenia. Así mismo, en la serie de células blancas existe una reducción del número de granulocitos que puede dar lugar a una linfocitosis. Las células rojas también presentan alteraciones tales como eritrocitos macrocíticos, hiperocrómicos y con vida media corta (3,4,7,14,15).

Generalmente, la hemoglobina fetal está incrementada y en algunos casos tiene un número reducido de eritrocitos y leucocitos, así como una disminución en los niveles de hexocinasa plaquetaria (15-17).

En los pacientes con AF, la muerte se origina por las alteraciones de la médula ósea y generalmente se presenta entre la edad infantil y la adolescencia. El tiempo promedio de supervivencia a partir de la presencia de la pancitopenia, sin tratamiento es de 5 años aproximadamente, mientras que con tratamiento, va de 16 a 25 años (4,16,17).

Se ha observado que la población AF presenta una elevada frecuencia de leucemia, carcinoma hepatocelular y carcinoma de células escamosas y los heterocigotos tienen un riesgo 3 veces mayor que el de la población general para desarrollar neoplasias. Esta enfermedad se ha considerado como un estado preleucémico porque al menos el 10% de los individuos afectados desarrollan leucemia mieloide aguda. Sin embargo, también pueden presentar tumores de los sistemas gastrointestinales o ginecológicos. Los riesgos en AF para desarrollar neoplasias son: 10% para leucemia, 5% para tumores de hígado y 5% para otros cánceres (1, 17,18).

La hiperpigmentación de la piel es probablemente la característica clínica más consistente y aparece como una fina hipermelanosis generalizada, que se presenta antes que las manifestaciones hematológicas (3,14,16). En los pacientes AF, las pequeñas manchas café con leche se presentan más frecuentemente en el tronco, pero pueden involucrar la ingle, el cuello y las axilas (19). Las manchas café con leche tienen forma irregular y tamaño variable, aunque generalmente no miden más de 4 cm; también se presentan pequeñas manchas de despigmentación, principalmente en la espalda y en el tronco (7).

Ocasionalmente se han encontrado anomalías oculares tales como microftalmia, ptosis, estrabismo y nistagmus.

Existen también anomalías esqueléticas, siendo las alteraciones de radio y pulgar las más importantes. Los pulgares pueden ser hipoplásicos, rudimentarios o ausentes y presentarse de forma uní o bilateral. También se observa una hipoplasia o ausencia tanto del primer metacarpiano como del radio y aplanamiento del área tenar. Algunas otras características esqueléticas poco comunes en este síndrome son la sindactilia, la dislocación congénita de cadera, el torcimiento congénito de pies, la deformación de escápula, la osteoporosis y la microcefalia (6,7).

Aproximadamente la tercera parte de los pacientes presenta malformaciones en el tracto urinario que consiste principalmente en hipoplasia y agnesia de riñón, ectopia, duplicación del sistema colector y riñón en forma de herradura. También existen algunas alteraciones en los genitales; en el hombre, el pene y los testículos pueden ser pequeños, con o sin criptorquidea, mientras que en la mujer se ha observado hipoplasia de útero y vagina (6,7,14,19).

La mayoría de los pacientes AF tienen talla y peso bajos desde el nacimiento, debido a un retraso en el crecimiento intrauterino y al lento crecimiento postnatal provocado por deficiencia de la hormona de crecimiento (14,19).

En general, la inteligencia de estos pacientes es normal, sin embargo, aproximadamente el 20% de la población con AF puede presentar diferentes grados de retraso mental (19).

Aspectos Citogenéticos.

La AF es un desorden que pertenece al grupo de Síndromes de Inestabilidad Cromosómica formado por el Síndrome de Bloom (SB), Ataxia telangiectasia (AT), Xeroderma pigmentoso (XP) y Disqueratosis congénita, entre otras. Las características comunes que permiten integrarlos como síndromes de inestabilidad cromosómica son la forma de herencia autosómica recesiva, la elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas y/o inducidas, la hipersensibilidad a agentes mutagénicos específicos y la predisposición a desarrollar neoplasias (19).

Adicionalmente, las células AF presentan alteraciones en la cinética del ciclo celular, en la proliferación celular, hipersensibilidad al oxígeno y sobreproducción del factor de necrosis tumoral alfa .

Citogenéticamente, la AF cursa con una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas y una hipersensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales inductores de enlaces cruzados tales como MMC, DEB, mostaza nitrogenada, ciclofosfamida, cisplatino y 8-metoxipsoralen activado con luz ultravioleta (8-MOP-UVA). Cuando los linfocitos AF se cultivan en presencia de MMC o DEB, se induce una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas significativamente mayor que la observada con las células normales; esta respuesta celular se utiliza como prueba diagnóstica, pre y postnatalmente para identificar a los pacientes con AF aún antes de que se presente la anemia.

Estos agentes alquilantes forman enlaces cruzados intra e intercatenarios. Los enlaces intercatenarios bloquean la replicación y la transcripción con efectos potentes en la sobrevivencia y en la función celular. Las aberraciones cromosómicas son principalmente de tipo cromatídico y figuras de intercambio. Las rupturas y los rearrreglos cromosómicos retrasan el tránsito del ciclo celular y lo detienen en la fase G2 con la consecuente disminución de la síntesis del DNA y la muerte celular (8-13,16,20).

Las células AF también son sensibles al estrés oxidativo, presentan una capacidad de crecimiento baja, incremento en la muerte celular y anomalías en la frecuencia y en el patrón de mutaciones inducidas (hipomutabilidad) (18,19,21-26). La AF también se considera como un grupo heterogéneo, debido a que los pacientes tienen una respuesta celular distinta a la exposición de agentes clastogénicos y mutagénicos porque presentan grados variables de frecuencias de aberraciones cromosómicas y sensibilidad diferencial a dichos agentes (10-13,27).

La naturaleza del defecto básico en la AF no se ha establecido claramente, sin embargo, existen algunas evidencias que sugieren que la alteración puede deberse: a un defecto en la reparación del DNA, deficiencia de enzimas de reparación o de detoxificación de los radicales generados por el metabolismo del oxígeno, y alteración en la producción y respuesta a citocinas.

La deficiencia de la reparación del DNA propuesta como la responsable de la inestabilidad cromosómica en AF, puede estar en diferentes niveles. En primer lugar, el daño al DNA puede ser de diferentes tipos: formación de dímeros de pirimidinas, rupturas de hebra sencilla y doble, aductos, deleciones, cambios de base y enlaces cruzados; normalmente estas alteraciones son reconocidas y reparadas por grupos de enzimas que actúan directamente de manera reversa o bien por escisión de la región alterada, pero aún cuando el daño llegue a repararse es posible que exista daño adicional por el proceso mismo de reparación, como en el caso de la recombinación.

La sensibilidad de las células AF a agentes bifuncionales inductores de enlaces cruzados sugiere que la habilidad para reparar los enlaces cruzados en AF esta deteriorada. La reparación de estos enlaces cruzados incluye un reconocimiento del daño, incisión de la hebra de DNA dañada, escisión del sitio defectuoso y síntesis de la región implicada en la lesión y ligamiento para reemplazar la región alterada con nucleótidos normales. La fidelidad de la reparación en AF se ha estudiado por diferentes investigadores pero los resultados han sido controversiales y algunos no reproducibles.

En 1975 Sasaki (28) propuso que en AF existía una deficiencia en la reparación y remoción de los enlaces cruzados intracatenarios. Posteriormente otros autores encontraron que la reparación era deficiente sólo en la incisión de los enlaces cruzados intercatenarios (29). Moustacchi y cols (1987) estudiaron la eficiencia de la síntesis semiconservativa del DNA en células AF tratadas con 8-metoxypsoralen; al medir la tasa de recuperación de la síntesis semiconservativa del DNA encontraron que 3 líneas celulares del mismo grupo de complementación se recuperaron tan rápido como las células normales, mientras que las otras líneas pertenecientes a otros grupos de complementación, fallaron en la recuperación (30). Otro grupo de investigadores usando técnicas similares no pudo diferenciar entre las células normales y las AF cuando compararon la eficiencia de reparación de enlaces cruzados inducidos por MMC en un gen de RNA ribosomal (31).

En 1993, Zhen y colaboradores midieron los aductos inducidos por cis-platino en un gen específico de la reparación en células AF y encontraron que había del 50 al 60% de disminución en la eficiencia de reparación con respecto a la observada en células normales (32).

Otros defectos relacionados con la reparación reportados son las deficiencias de la actividad de enzimas como la DNA-ligasa (33) y defectos en la ribosiltransferasa adenosin difosfato (34). En AF, la actividad de la endonucleasa con un punto isoeléctrico 4.6 presentó disminución en la habilidad para realizar la incisión del DNA con enlaces cruzados intracatenarios inducidos por 8-metoxipsoralen + luz ultravioleta; además, al medir las actividades de los extractos de endonucleasas de DNA asociadas a la cromatina se encontró alteración en una proteína de unión al DNA con especificidad para los enlaces cruzados. Por lo tanto, el defecto en AF también puede deberse a la falta de esta proteína de reconocimiento así como a un defecto en la función de un complejo de endonucleasas involucradas en el proceso de incisión (35,36).

Otro tipo de reparación que pudiera estar involucrada en el defecto básico es la reparación postreplicativa por recombinación y la replicación translesión, sin embargo estos procesos no han sido completamente caracterizados en células eucariontes, pero el conocimiento que se tiene en bacterias puede ser de gran utilidad para el entendimiento de la alteración en AF (36).

Dado que se ha reportado que hay hipersensibilidad de las células AF al oxígeno, es probable que exista una alteración en la reparación del daño inducido por radicales de oxígeno. Los radicales de oxígeno pueden dañar al DNA en la base o en el azúcar de tal manera que forman productos complejos tales como enlaces cruzados o rupturas de doble hebra. En dos líneas celulares de AF-A tratadas con peróxido de hidrógeno se encontraron de dos a tres veces más productos derivados de la acción de radicales libres sobre el DNA (8-hidro-desoxi-guanosina) que en células normales (35); este hallazgo sugiere que en AF puede existir un defecto en las enzimas involucradas en la reparación del DNA dañado con radicales oxígeno.

Finalmente, se encontró que la AF tiene una producción anormal de citocinas que puede estar relacionada con las alteraciones de radicales libres en los leucocitos AF. Rosselli y cols (37) demostraron alteraciones de este tipo en los fibroblastos de un paciente con AF pero con resultados discordantes con otros pacientes relacionados, por lo que concluyeron que las anomalías de citocinas son una característica indirecta del defecto de AF.

A pesar de la existencia de varios reportes, actualmente no se ha establecido el defecto básico de la enfermedad ya que los hallazgos publicados en algunas ocasiones no han sido reproducibles. Es posible que la falta de reproducibilidad de los primeros hallazgos se deba a que se trabajaba con células de pacientes AF no clasificados por lo que la variabilidad en las respuestas era muy alta; actualmente se conoce que la AF es una enfermedad con heterogenidad genética, existen líneas celulares de todos los grupos y se puede trabajar específicamente con alguna o bien comparar las alteraciones en cada una de ellas.

Por otra parte, a nivel celular la AF presenta varias deficiencias a diferentes niveles, por lo cual no hay que descartar la posibilidad de la existencia de un defecto primario que desencadene una cascada de eventos intracelulares que estén involucrados en la comunicación intracelular para dar las señales al núcleo cuando la célula se encuentra en estrés por el efecto de otros agentes (37). Por ejemplo, se ha encontrado que las células AF son deficientes en la producción de IL-6 y tienen una sobreproducción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α); cuando se daña el DNA de las células AF con radiación gamma, MMC o se tratan con TNF- α se induce apoptosis pero la inducción de p53 está alterada. Debido a que el gen de p53 codifica para un activador transcripcional cuyos blancos incluyen genes que regulan la estabilidad genómica, la respuesta celular al daño del DNA y a la progresión del ciclo celular, se sugiere que la expresión alterada de p53 puede ser importante para el fenotipo de AF (38).

Heterogenidad Genética y Molecular.

El análisis de la herencia de un padecimiento sería más sencillo, si un genotipo dado se expresara siempre de la misma forma en todos los individuos. Sin embargo, el estudio de pacientes con una determinada enfermedad genética a menudo ha demostrado que tienen diferentes mutaciones que producen un cuadro clínico similar, lo cual significa que son genéticamente heterogéneos. Así, la heterogenidad ocurre cuando un fenotipo clínico o bioquímico particular puede ser producido por más de un genotipo.

En AF, diferentes estudios de complementación por hibridación celular somática han demostrado la existencia de heterogenidad genética: existen 5 grupos de complementación

clasificados como AF-A, B, C, D y E. Con respecto a la prevalencia, se estima que del total de la población AF, del 60 al 65% pertenecen al grupo AF-A, el 4.3% a AF-B, el 12.7 a AF-C, el 4.3% a AF-D y 12.7 a AF-E (39-43).

En 1980, Zawrzewski y Sperling, mediante el análisis de complementación por hibridación celular identificaron dos grupos de AF: fusionaron células somáticas de pacientes con diferentes formas fenotípicas de AF y detectaron complementación con el análisis de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas por MMC y DEB (39). cromosómicas en híbridos celulares de diferentes pacientes con AF, delinearon dos grupos de complementación designados grupo AF(A) y AF no-(A) con respecto a su capacidad de complementar el fenotipo AF de una línea celular AF(A). La complementación funcional fue determinada por medio del análisis de aberraciones cromosómicas espontáneas, inhibición del crecimiento y aberraciones inducidas por MMC (40).

Posteriormente, en 1987, Gok y Wunder, demostraron que la recuperación de la síntesis de DNA en células AF expuestas a 8-MOP y radiación ultravioleta A (UVA) fue mayor en un grupo de AF (B) que en otro (A) (41). Más recientemente, Strathdee y cols (1992), encontraron que entre los pacientes que se habían clasificado como AF(B) existían otros dos grupos de complementación: AF(C) y AF(D). En tres líneas celulares que no pertenecían al grupo de complementación A introdujeron marcadores de resistencia a drogas con pSV2 (resistencia a G481) o pSV2hph (resistencia a higromicina) que permitieron la selección de los híbridos que presentaban ambas características. Con el uso de este sistema, todas las posibles combinaciones de las 3 líneas AF no-A resultaron líneas híbridas resistentes a MMC, lo cual sugirió que cada línea celular representaba un grupo de complementación independiente, designados como AF-B, AF-C y AF-D (42).

Por último, en 1995, Joenje y cols. al clasificar a 13 pacientes a través de análisis de complementación y fusión celular con líneas celulares de los 4 grupos AF encontraron que un paciente complementó con las 4 líneas de referencia. Estos resultados indicaron la existencia de un quinto grupo de complementación, designado como AF-E y la presencia de al menos 5 genes responsables del fenotipo AF.

Los grupos de complementación de AF reflejan heterogeneidad en su fenotipo celular ya que la sensibilidad a los agentes mutagénicos, la recuperación de la síntesis de DNA

semiconservativa y los niveles de algunas enzimas involucradas en la reparación del DNA son diferentes en los 5 tipos.

Hasta el momento, sólo se han localizado 3 genes AF: por medio de estudios de ligamiento, el gen AF-A se mapeó en el cromosoma 16q21, por hibridación *in situ* y complementación funcional AF-C en 9q22.3 y por transferencia de cromosomas mediada por microcélulas AF-D en 3p22-p26 (44-48).

En lo que respecta al conocimiento de los genes AF, el gen AF-A codifica para una proteína de 1455 aminoácidos con señales de localización nuclear y sin homología con otras proteínas, razón por la cual se ha sugerido que puede representar una nueva clase de gen asociado con la prevención del daño al DNA (47, 48).

En AF-C, el gen ya se ha clonado, se denomina FACC y tiene mas de 100 kb de longitud; la secuencia primaria presenta 14 exones y codifica para 558 aminoácidos, sin embargo, no tiene homología con otras proteínas conocidas y no se conoce la función. Los análisis de mutación del gen FACC indican que aproximadamente el 15% de los pacientes AF son del grupo C. Se han encontrado varios tipos de mutaciones, pero no se agrupan en alguna región específica del gen. Yamashita y cols (1995) por estudios de fraccionamiento celular e inmunofluorescencia, demostraron que el polipéptido FACC se localiza en el citoplasma y por tanto es poco probable que tenga un papel directo en la reparación del DNA (49-50).

Antioxidantes y metabolismo del oxígeno.

Las células AF muestran una sensibilidad anormal al oxígeno que se traduce en elevación de las aberraciones cromosómicas, una tasa de proliferación muy baja y en detención de la fase G2 del ciclo celular. Esta susceptibilidad ha sugerido la existencia de un desbalance entre la generación de especies reactivas y los mecanismos de detoxificación en las células AF; normalmente existen ciertos niveles de atrapadores o "scavenger" de radicales que se encargan de proteger a la célula por remoción de dichos productos altamente reactivos, de tal manera que cuando una célula tiene niveles altos de radicales libres, estos son bloqueados por el sistema antioxidante. Este sistema protector además de prevenir la excesiva formación de intermediarios reactivos potencialmente dañinos protegen

a otros componentes que están involucrados en la reparación del daño. Está constituido por la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, vitamina E, C, selenio, etc. Dada su función, cualquier cambio en su concentración alteraría el metabolismo del oxígeno y la condición general de la célula (17-18).

Al respecto, varios autores han realizado determinaciones cuantitativas y cualitativas de estos agentes atrapadores de radicales libres con el objeto de conocer si tanto la susceptibilidad de las células AF a radicales oxígeno como las aberraciones cromosómicas pueden abatirse con la adición de atrapadores de radicales libres y así conocer el defecto básico.

En células AF, Nordenson (1980) y Joenje (1978) sugirieron que el defecto básico está relacionado con el metabolismo del oxígeno porque encontraron deficiencia en la SOD y una disminución en el nivel de aberraciones cromosómicas espontáneas en células AF cuando se adicionaba catalasa o SOD en cultivos celulares (51,52).

En estudios de cuantificación de SOD realizados en eritrocitos de AF se encontró una disminución del 20 al 40% comparados con los normales (53). Otros hallazgos indican que la cantidad no es indicativa de la función, ya que Gille y cols en 1987 observaron que los eritrocitos de un paciente con AF presentaba disminución de los niveles de SOD pero su actividad era mayor que la observada en los fibroblastos del mismo paciente (54).

También se ha encontrado que la L-cisteína, el ácido ascórbico y la desferrioxamina son moléculas que confieren protección a las células AF para la producción de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC (55-57). Así mismo, cuando las células AF se tratan con MMC, la SOD y la catalasa proporcionan protección para el desarrollo de aberraciones cromosómicas, ya que la frecuencia de aberraciones disminuye de manera significativa (17).

Liu y cols, 1993 (58) probaron el efecto *in vivo* de la SOD recombinante en 4 pacientes con AF sobre el crecimiento de las células progenitoras hematopoyéticas o sobre el fenotipo celular anormal; sólo encontraron disminución de aberraciones cromosómicas inducidas por DEB durante el tratamiento en dos pacientes y un aumento de las células progenitoras de médula en un paciente. Sin embargo, la SOD purificada de AF no tiene

cambios detectables, por lo que se ha sugerido que la disminución encontrada en eritrocitos es debida a una desregulación en el linaje celular. Por otra parte, se ha demostrado que los niveles de catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión son normales en células AF, por lo tanto no son significativamente más sensibles a superóxido intracelular, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo.

En lo que respecta a la susceptibilidad al oxígeno, se ha demostrado que las células proliferan muy poco cuando crecen en un ambiente con 20% de oxígeno mientras que cuando se reduce al 5% estudios de citometría de flujo con BrdU/Hoechst en fibroblastos sugieren que la sensibilidad refleja una tendencia a que las células se acumulen en la fase G2 del ciclo celular (59); este efecto se ha comprobado tanto en linfoblastos como en fibroblastos y también se ha demostrado que la fase G2 se prolonga de manera significativa (60). En cuanto al efecto sobre el daño al DNA, Joenje y Gille (61) obtuvieron evidencias de que el oxígeno y sus radicales contribuyen a la formación de aberraciones cromosómicas en AF porque la frecuencia de aberraciones disminuye cuando la concentración de oxígeno baja.

Esta sensibilidad al oxígeno es un sistema complejo que controla la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno o la habilidad para tolerar el daño inducido al oxígeno. Existen múltiples reportes, tanto de la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno como de la deficiente defensa antioxidante, que proponen estas alteraciones como la causa de la AF. Sin embargo, una comparación de la sensibilidad al oxígeno entre una línea celular primaria de fibroblastos y una transformada indicó que hay pérdida de la hipersensibilidad al oxígeno después de la transformación con el antígeno T SV40; este hallazgo es compatible con un efecto secundario de las mutaciones en los genes AF y no con un primario (62).

El mecanismo de bioactivación de la MMC sugiere otra relación potencial con el metabolismo del oxígeno, ya que las enzimas celulares activan el grupo quinona de la MMC y producen enlaces cruzados de DNA intra e intercatenarios y de DNA-proteína; además, la reducción de la MMC por su semiquinona intermediaria puede inducir rupturas de hebra sencilla. Bajo condiciones aeróbicas, la semiquinona puede reaccionar para formar oxígeno molecular, peróxido de hidrógeno y grupos hidroxilos. Joenje y Ostra en 1983 observaron

que los linfocitos AF en fase G₀ tratados con una dosis baja de MMC son más sensibles al oxígeno que los linfocitos sin tratamiento (17, 60).

De manera contraria a lo observado en las células normales, en AF hay hipomutabilidad cuando proliferan bajo condiciones normales de oxígeno (17, 61).

En cuanto a la cinética del ciclo celular, se sabe que las células AF tienen un defecto en la progresión, ya que presentan una fase G₂ más larga provocada por un arresto; cuando los linfocitos AF se tratan con cafeína se restaura el tiempo de la fase G₂ (63).

En relación a la sobreproducción de radicales libres, se ha demostrado que las células AF presentan sobreproducción de una citocina citotóxica y citostática denominada factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que en células normales y cancerosas potencia la producción de radicales libres y por lo tanto, puede causar daño al DNA y muerte celular; en presencia de agentes genotóxicos se incrementan los efectos inducidos por el TNF- α . En AF, la sobreproducción de este factor conduce a una hipersensibilidad celular a la MMC que no puede ser parcialmente corregida por la adición de la IL-6, pero cuando se agrega el anticuerpo anti-TNF- α existe una corrección tanto de la hipersensibilidad a MMC como de las aberraciones cromosómicas (64).

Todos estos hallazgos sugieren que las células AF tienen una hipersensibilidad al oxígeno y pueden ser deficientes en su sistema antioxidante. Es indudable que el daño inducido por el oxígeno en AF juega un papel importante e implica que es probable que una sobreproducción o bien una sensibilidad celular aumentada a un intermediario tóxico del oxígeno pueda contribuir al fenotipo celular de AF.

Factores difusibles en Síndromes de Inestabilidad Cromosómica (SIC)

En general, existen factores biológicos activos y de corrección cuya identificación y caracterización puede proporcionar claves importantes para descubrir los defectos producidos en los SIC. Los factores activos pueden inducir o mediar respuestas fisiológicas normales, como lo hacen los factores de crecimiento celular o bien dar respuestas patológicas que incluyan defectos en la síntesis y reparación del DNA. Los factores de corrección son capaces de restaurar la función normal o la integridad de la célula que manifiesta un defecto fenotípico particular; los factores que son capaces de permeabilizar en

las células se le denomina factores difusibles y pueden ser las moléculas responsables de la complementación en los síndromes genéticos. La purificación de estos factores permite la identificación directa de la actividad metabólica alterada y en algunas ocasiones, el defecto del gen (19).

En las células normales y en el plasma normal se puede inducir la formación de factores clastogénicos (que rompen cromosomas) ya sea por exposición a agentes promotores de tumor o por irradiación X. En los SIC se han encontrado algunos de estos factores difusibles y se ha tratado de correlacionar su acción al defecto en la enfermedad.

En Ataxia Telangiectasia (AT) se han reportado 3 factores clastogénicos que están presentes en el plasma o en medios condicionados. El primer factor se encontró cuando se cultivaron linfocitos normales en presencia de células blancas o de plasma de pacientes AT, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células normales se incrementó de 2 a 5 veces; la caracterización bioquímica indicó que el factor clastogénico es un péptido de 500 a 1000 daltones. El segundo factor se encontró en medios condicionados por células AT, tiene un peso molecular de 10,000 a 20,000 daltones y es capaz de estimular el crecimiento de células de aorta bovina *in vitro*; se ha propuesto que este factor es el responsable de la manifestación clínica de telangiectasia oculocutánea en AT. El tercer factor es una proteína con peso molecular de 20,000 a 30,000 daltones que confiere la radioresistencia a la síntesis del DNA (19,20)

En el Síndrome de Bloom (SB) se ha reportado la existencia tanto de factores inductores como correctores de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH); cuando se ha puesto en evidencia la presencia de los factores clastogénicos e inductores de ICH también se ha propuesto que pueden modularse por la adición de superóxido dismutasa, lo cual sugiere la intervención de radicales libres. Sin embargo, hay mucha controversia en los hallazgos de varios autores, por lo que es necesario realizar experimentos con condiciones bien controladas para que se obtengan resultados reproducibles que confirmen el tipo de factor producido por las células de SB (19).

En Xeroderma pigmentosa (XP) en la que ya se conocen las funciones y algunos genes alterados, las investigaciones son muy diferentes ya que el descubrimiento del defecto básico y de los diferentes grupos de complementación ha conducido a los investigadores a

estudiar la capacidad correctora de las enzimas en la reparación deficiente del daño inducido al DNA por luz ultravioleta. La microinyección de extractos crudos de proteína de células HeLa o de XP de diferentes grupos de complementación, restauró la actividad de reparación del DNA en líneas de los 9 grupos de complementación. El factor de corrección es diferente y específico de cada tipo de XP, por ejemplo, en XP-A la actividad correctora se encontró en dos fracciones, una de 90 y otra de 160 kD, esta actividad está mediada por una proteína de rápido transporte al núcleo (19,20).

En Anemia de Fanconi, existen algunas evidencias que indican que las aberraciones cromosómicas inducidas por MMC pueden ser corregidas por el cocultivo con células normales o por la adición de plasma normal; estos hallazgos ponen de manifiesto la acción de factores difusibles generados por las células normales capaces de complementar el daño en las células AF, sin embargo no existen trabajos que pongan de manifiesto la naturaleza de estos factores (65, 66).

Composición del plasma humano normal.

El plasma es un componente acuoso de la sangre, cuya composición química es muy compleja; en él se hallan disueltos o en suspensión una gran cantidad de proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabolitos, productos de desecho, iones inorgánicos y hormonas. Contiene diversos tipos de moléculas de pequeño tamaño y gran peso molecular tales como hidratos de carbono, electrolitos, carbonatos, fosfatos, cloruros, lípidos, hormonas, enzimas, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y proteínas. La presencia de todos estos factores son de vital importancia porque muchas funciones en el organismo dependen de estos componentes, de tal manera que la determinación de los niveles es importante para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades.

Físicamente, el plasma es un líquido amarillo con una densidad de 1.0237-1.0276 y pH 7.2-7.6. Está formado aproximadamente por un 10% en peso de sólido y 90% de agua; del peso sólido, 7-9% son proteínas, 1% sales y el resto lípidos y otras sustancias.

Más del 70% de la parte sólida del plasma está constituida por las proteínas plasmáticas seroalbúmina, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), inmunoglobulinas (centenares de

anticuerpos circulantes), fibrinógeno, protombina y muchas proteínas de transporte específico como la transferrina. El 10% está representado por compuestos orgánicos tales como NaCl, bicarbonato, fosfato, CaCl₂, MgCl₂, KCl y NaSO₄. El 20% restante está formado por los metabolitos orgánicos y los productos de desecho: glucosa, aminoácidos, lactato, piruvato, cuerpos cetónicos, citratos, urea y ácido úrico (67).

En el plasma normal también existen nucleótidos que son elementos importantes para la fisiología celular tanto de la generación de ATP como de la reparación de DNA (68).

El contenido enzimático del plasma es probablemente inferior al 0.1% del contenido protéico total, pero de suma importancia. Las enzimas que están presentes en plasma son: trombina, plasmina, colinesterasa, amilasa, lipasas y proteasas entre otras. Las funciones que realizan estas enzimas son variables, tales como intervención en la coagulación sanguínea tanto en la formación como en la degradación, destrucción de acetilcolina y regulación de los niveles de lípidos y proteínas, activación proteolítica de proteínas y enzimas. El funcionamiento coordinado de todos estos elementos es vital para los organismos ya que muchos de los eventos metabólicos forman parte de todo un proceso, razón por la cual cualquier alteración puede trastornar el sistema completo.

En el plasma también existen moléculas antioxidantes que se encargan de capturar los radicales libres generados por el metabolismo celular; en este grupo se incluyen al ácido ascórbico, alfa-tocoferol, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, otros componentes tales como carotenoides y ubiquinoles y productos finales de vías metabólicas, como bilirrubina y ácido úrico (67).

A pesar de toda esta información, la composición total del plasma humano normal no se conoce debido a que es muy compleja; en algunos casos, aún cuando se ha determinado la concentración de las moléculas que lo componen, se desconoce la función de éstas.

Efecto del plasma humano normal en las células AF.

En AF, por medio de experimentos de fusión celular o de cocultivo con células normales se ha encontrado una complementación completa o parcial que corrige la elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas (69-73). En 1980 Zakrzewski y Sperling

descubrieron que cuando las células AF se dañan con MMC, la cocultivación de estas con células normales corrige parcialmente el daño cromosómico producido por este agente (70). Más tarde, en experimentos realizados con linfocitos AF, Carnevale y Frias (72) encontraron que la corrección parcial se llevaba al cabo no sólo por medio de la cocultivación con células normales, sino también con la adición de plasma normal, de manera que estos resultados evidenciaron la presencia de un factor corrector difusible en el plasma.

En otro estudio, Frias y cols. (73) con el objeto de investigar heterogeneidad genética en AF, analizaron las aberraciones cromosómicas inducidas por MMC en cultivos de linfocitos AF suplementados con plasma autólogo, heterólogo de otros paciente con AF y con plasma normal; no se encontró heterogeneidad genética, pero nuevamente encontraron una disminución significativa de la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC en los cultivos suplementados con plasma humano normal.

Es evidente que la adición de plasma normal modifica la respuesta a la MMC disminuyendo significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células AF, lo cual está de acuerdo con la existencia de un factor difusible, presente en el plasma normal y capaz de realizar complementación. La complementación no es total, pero se ha observado en múltiples ocasiones y con distintos pacientes en porcentajes que van del 30 al 90%. Estos hallazgos sugirieron que en el plasma de las células normales pueden existir productos génicos que son indispensables para la reparación del DNA o para la división celular y que en el caso de las células AF, estos productos pueden estar inactivos o ausentes.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fué detectar una fracción de plasma humano normal con actividad correctora de las aberraciones inducidas por MMC en células AF, por medio del fraccionamiento del plasma.

OBJETIVO GENERAL

Detectar a partir de plasma humano normal, una fracción con actividad de corrección de las aberraciones cromosómicas inducidas por Mitomicina C en linfocitos AF.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de las fracciones de plasma normal, obtenidas por ultrafiltración, sobre las aberraciones cromosómicas inducidas por la mitomicina C en linfocitos AF.
- Determinar el efecto de las fracciones de plasma normal, obtenidas por ultrafiltración, sobre la síntesis del DNA inducida por la mitomicina C en linfocitos AF.
- Determinar el efecto de las fracciones, obtenidas por cromatografía molecular en gel, sobre el daño al DNA inducido por la mitomicina C en linfocitos AF, mediante electroforesis unicelular alcalina.
- Determinar el efecto de los posibles factores involucrados en la corrección del daño inducido por la MMC en células AF.

MATERIAL Y METODOS

MUESTRAS CELULARES.

A. Linfocitos de sangre periférica:

1. Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada de 5 pacientes con diagnóstico de anemia de Fanconi basado en las siguientes características:

a) Clínicas: por presentar pancitopenia e hiperpigmentación de la piel, asociados o no a alteraciones del eje radial u otras malformaciones.

b) Citogenético: por presentar una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas espontáneas y alta susceptibilidad a la MMC expresada como un daño cromosómico significativamente mayor que el observado en células normales.

2. Se tomaron muestras de sangre heparinizada de 2 sujetos sanos normales para la obtención de células y de plasma.

B. Líneas linfoblastoides:

Se utilizaron líneas celulares linfoblastoides de los grupos de complementación A, B, C y D de AF, donadas por el Dr. Manuel Buchwald, Department of Genetics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canadá; y una línea celular normal linfoblastoide establecida en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, por medio de la transformación de linfocitos con virus Epstein Barr.

Establecimiento de línea linfoblastoide normal:

Se obtuvo una muestra de sangre periférica heparinizada de 10 ml y se diluyó con solución de Hank's vol./vol.; la muestra se colocó sobre un gradiente discontinuo de Ficoll-Hypaque para separar los linfocitos y se centrifugaron a 1,800 r.p.m. durante 15 min. Se aspiró la capa de linfocitos y se sometió a dos lavados con solución de Hank's. El paquete celular se colocó en un pozo con 500ul de medio RPMI y 500ul de sobrenadante con virus Epstein Barr y se incubó durante 24 horas a 37°C con 5% CO₂; se aspiró el sobrenadante y se cambió el medio de manera periódica cada vez que viraba a amarillo. Cuando las células presentaron prolongaciones citoplasmáticas y se asociaron para conformar cúmulos

en suspensión, se colocaron en botella de cultivo para continuar con la propagación de la línea transformada.

OBTENCIÓN DE PLASMA HUMANO NORMAL.

Para realizar la separación del plasma por Ultrafiltración y Cromatografía molecular en gel se utilizó un paquete de plasma tipo A de un donador sano del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría. Los 300 ml de plasma se colocaron en alícuotas con el fin de descongelar una muestra cada vez que se realizaran los experimentos.

CULTIVOS CELULARES.

A. Linfocitos de sangre periférica.

1. Siembra.

De acuerdo a la técnica de Moorhead y cols (74), por cada paciente se sembraron 8 cultivos de linfocitos de sangre periférica, en tubos estériles de 11 ml; a cada cultivo se le agregaron 4.5 ml de medio McCoy's 5a modificado, 0.25 ml de fitohemaglutinina, 0.02 ml de antibiótico (penicilina-estreptomicina) y 0.4 ml de sangre. Se incubaron a 37°C durante 72 horas.

2. Cosecha.

A las 72 hs de cultivo se adicionó colchicina a una concentración de 8 μ /ml. Después de 30 min de incubación los cultivos se centrifugaron a 400g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se incubó el paquete celular durante 10 minutos a 37°C con 5 ml de solución hipotónica de KCl 0.075M; después se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se fijó el paquete celular con una solución Carnoy (3:1 de metanol: ácido acético). Se dejaron reposar por 10 minutos al cabo de los cuales se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en fijador; este último paso se repitió varias veces hasta que se obtuvo un paquete celular blanco y un sobrenadante transparente.

Las laminillas se prepararon por goteo del material celular en portaobjetos fríos y se secaron a la flama.

B. Líneas linfoblastoides:

1. Siembra.

Se sembraron 300,000 linfoblastos/ml en 5ml medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal de bovino, glutamina 200 mM, piruvato de sodio 100 mM, anti-PPLO 6 mg/ml, antibiótico-antimicótico (10,000 unidades de penicilina, 10 mg estreptomina y 25 µg ampotericina). Se incubaron a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5 % durante 72 hs.

2. Cosecha.

Para detener las células en metafase se agregaron 40 µg/ml de colchicina y se incubaron durante 40 min. Se centrifugaron a 400g durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en KCl 0.075M y se incubó por 10 minutos a 37°C; antes de volver a centrifugar se realizó prefijación con solución Carnoy, se centrifugó y el paquete celular se fijó con Carnoy frío; finalmente se realizaron 2 lavados con fijador nuevo.

Las laminillas se prepararon como se mencionó previamente.

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE PLASMA.

1. Ultrafiltración (75)

El plasma fresco, se separó por ultrafiltración a través de una membrana Amicon con un límite de exclusión de 50,000 daltones de tal manera que se obtuvieron dos fracciones: una con moléculas de un peso molecular mayor de 50 kD y otra con moléculas menores de 50 kD. Las muestras de las fracciones se colocaron en alícuotas y se congelaron a -20°C hasta su uso.

2. Cromatografía por filtración molecular en gel (75).

a) Montaje de columna y equilibrio de columna:

En un cuarto frío a 4°C, se montó una columna cromatográfica de 1.6 cm de diámetro y 91.7 cm de largo y se empacó con gel para filtración (Ultrogel AcA 44, mezcla de agarosa y poliacrilamida) de moléculas de 10,000 a 130,000 daltones. Posteriormente se equilibró durante 24 horas con PBS estéril, se calibró el flujo a 24 ml por hora y se conectó a un colector de fracciones automático.

b) Calibración de columna con marcadores de peso molecular:

Se preparó una mezcla de 5 ml de PBS con los siguientes marcadores moleculares: 3 mg/ml de azul dextran, 8 mg/ml de albúmina sérica bovina, 4 mg/ml de ovoalbúmina y 3.5 mg de citocromo C. Esta mezcla de marcadores moleculares se colocó en la columna evitando la entrada de burbujas a la columna y en el reservorio se colocaron 300 ml de PBS como fase móvil para separar cada marcador; se conectó una bomba peristáltica para que los marcadores fluyeran a lo largo de la columna con una velocidad de 24 ml/hs; se obtuvieron fracciones de 3ml durante 6 horas.

Toda la elución se midió en el espectrofotómetro a 280 nm para seleccionar las fracciones correspondientes a los picos de proteínas y además las fracciones del azul dextran se midieron a 610 nm y las del citocromo C a 529 nm. Todos los datos se graficaron para conocer el perfil cromatográfico y que posteriormente se utilizara como patrón para seleccionar las fracciones obtenidas del plasma (fig.1).

c) Separación del plasma normal:

La columna se lavó con 300 ml de PBS y después se pusieron 5 ml de plasma normal fresco; una vez que la muestra de plasma había entrado a la columna, se eluyó utilizando 300 ml de PBS en el reservorio y un flujo de 24 ml/h. Se colectaron fracciones de 3 ml y se midieron en el espectrofotómetro a 280 nm.

d) Control Electroforético de las fracciones del plasma:

Antes de realizar las electroforesis, se determinó la concentración de proteína tanto de las fracciones obtenidas por ultrafiltración como las de cromatografía en gel por medio del método de Bradford.

Las electroforesis se realizaron en minigeles de poliacrilamida-SDS (75) con un tiempo de corrida de 45 a 90 minutos; para las fracciones menores y mayores de 50 kD se usaron geles 12% y para las fracciones de la cromatografía (1A, 1B y 2) al 10%. Todos los geles se tiñeron con azul de Coumassie y se tomó un registro fotográfico de cada uno.

CROMATOGRAMA DE MARCADORES DE PESO MOLECULAR

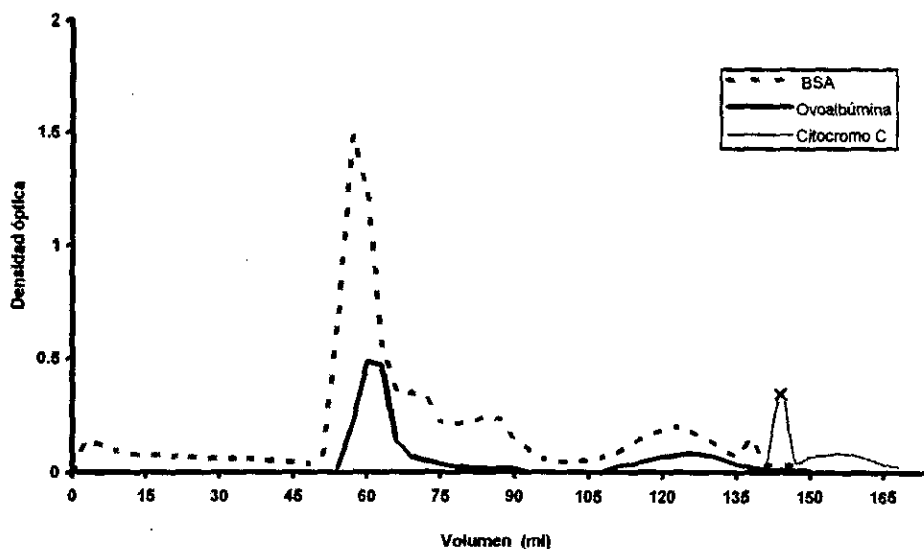


Fig. 1 Perfil cromatográfico de los marcadores de peso molecular. Los marcadores fueron los siguientes: albúmina sérica bovina (BSA) (62.2 kD), ovoalbúmina (42.7 kD) y citocromo C (12.2 kD). fracciones eluída se midieron en el espectrofotómetro a la longitud de onda correspondiente para cada marcador.

TRATAMIENTOS.

FASE I. Efecto de las fracciones de plasma normal obtenidas por ultrafiltración.

A) Aberraciones cromosómicas .

Todos los cultivos celulares de linfocitos de 4 pacientes AF y de un control (paciente anémico pero no del tipo AF) , se trataron con 40 ng de MMC/ml de las 30 a las 54 hs de incubación; posteriormente se lavaron 2 veces con solución isotónica (NaCl 0.9%) y se reincubaron por 24 hs más en las siguientes condiciones:

1. Sólo medio McCoy's.
2. Medio más 1 ml de plasma humano normal.
3. Medio más 1 ml de fracción < de 50 kD.
4. Medio más 1 ml de fracción > de 50 kD.
5. Medio más 1 ml de suero normal.

Para determinar la síntesis de DNA, 2 horas antes de cada cosecha se dió un pulso de 1 μ Ci/ml de timidina tritiada ($6\text{-}^3\text{H}$ timidina), 6.70 Ci/mmol, (Amersham) ; las cosechas celulares se hicieron cada 6 horas a partir del momento en que se retiró la MMC y hasta las 78 horas de cultivo, para hacer un total de 4 cosechas por paciente, por tratamiento y por repetición . Ci/mmol).

B) Autorradiografía (76)

Las laminillas se prepararon por goteo del material celular en portaobjetos fríos, se secaron al aire y en un cuarto oscuro con luz roja (filtro Kodak Wratten No.2 con bombilla de 15 volts) se sumergieron en un recipiente que contenía la emulsión fotográfica NTB2 durante 2 o 3 segundos, se sacaron y se dejaron secar al aire de 30 a 90 minutos, se guardaron a 4°C en la oscuridad por 8 días.

Transcurrido este tiempo, todas las laminillas se revelaron, fijaron y tiñeron con Giemsa al 10% en buffer fosfatos durante 3 minutos.

FASE II. Efecto de las fracciones de plasma normal obtenidas por Cromatografía molecular en gel.

Los cultivos de linfocitos de un paciente AF se trataron de la misma manera que los de la fase I y se suplementaron durante las últimas 24 horas en las siguientes condiciones:

1. Sólo con medio McCoy's.
2. Con medio más 1 ml de plasma humano normal fresco.
3. Con medio más 1.12 ml de fracción 1A.
4. Con medio más 0.86 ml de fracción 1B.
5. Con medio más 1.26 ml de fracción 2.

La cantidad de cada fracción se calculó utilizando como referencia la cantidad de plasma con la que normalmente se había encontrado la corrección y el volumen de plasma que se separó en la cromatografía.

A las 78 hs de cultivo, las células de cada experimento se congelaron para procesarlas posteriormente por medio de electroforesis unicelular y poder cuantificar el daño al DNA.

FASE III. Efecto de la Interleucina 6 (IL-6)

A) Linfocitos de sangre periférica.

1.1 Aberraciones cromosómicas.

Para probar la actividad correctora de la IL-6, se prepararon 6 tipos de cultivos de linfocitos de sangre periférica de 2 pacientes con AF por duplicado; un cultivo sin tratamiento se mantuvo con plasma autólogo desde el inicio y cinco cultivos se trataron con 40 ng /ml de MMC de las 30 a las 54 hs de incubación; posteriormente se lavaron 2 veces con solución isotónica y se reincubaron por 24 horas más en las siguientes condiciones:

1. Medio McCoy + plasma autólogo desde el inicio.
2. Medio McCoy: control negativo.
3. Medio McCoy's + plasma humano normal
4. Medio McCoy's + Interleucina-6.
5. Medio McCoy's + plasma y Ab anti-IL-6.
6. Medio McCoy's + IL-6 y Ab anti-IL-6.

A las 78 horas de cultivo, se realizó la cosecha de todos los cultivos para obtener células en metafase.

1.2 Electroforesis Unicelular Alcalina (EU) (77)

Se prepararon cultivos de linfocitos de un paciente con AF de la misma manera que en 1.1, pero a las 78 horas de cultivo, las células de cada experimento se colocaron en minigeles para ser procesados por electroforesis unicelular y cuantificar el daño al DNA.

B) Líneas linfoblastoides AF pertenecientes a los 4 grupos de complementación.

Para probar la resistencia de las células AF de diferentes grupos de complementación al efecto citotóxico de la MMC, se sembraron cultivos de cada línea celular con 300,000 cel/ml en presencia de:

1. Sólo medio (control)
2. Medio + 500 U IL-6
3. Medio + 1 ml de plasma humano normal

A las 24 hs, todos los cultivos se lavaron y se incubaron por 24 hs más en medio y MMC (10ng/ml); transcurrido este tiempo, todos los cultivos se cosecharon de la manera habitual.

Por cada tipo de cultivo y por cada repetición se analizaron las aberraciones cromosómicas de 100 metafases.

FASE IV. Efecto del plasma normal y de la IL-6 en los diferentes grupos de complementación.

Con el objeto de conocer el efecto del plasma normal y de la IL-6 en los diferentes grupos de complementación de la AF, se prepararon cultivos celulares de 72 hs de la siguiente manera:

Por cada línea celular se sembraron 10 cultivos con 300,000 cel/ml; de las 24 a las 48 hs se trataron con 40ng/ml de MMC, posteriormente se lavaron y se incubaron por 24 hs más en presencia de:

1. Sólo medio suplementado al 10% de SFT (control negativo)
2. Medio + medio suplementado+ 1 ml de plasma humano normal.
3. Medio + 1 ml de plasma humano normal + anticuerpo anti IL-6.
4. Medio + 500U IL-6
5. Medio + 500U IL-6 + anticuerpo anti-IL-6.

A las 78 hs, todos los cultivos se cosecharon de la manera habitual. Debido a que fue muy difícil obtener células en metafase en los linfoblastos después del tratamiento con MMC sólo se analizaron 25 metafases por cada tipo de cultivo y por cada repetición .

SISTEMAS DE DETECCIÓN DEL DAÑO AL DNA.

Las fracciones de plasma obtenidas por ultrafiltración y cromatografía molecular en gel se probaron en cultivos de linfocitos AF utilizando como método de detección el análisis de aberraciones cromosómicas, la síntesis de DNA y la electroforesis unicelular alcalina.

1. Aberraciones cromosómicas.

Las laminillas elaboradas por cada tipo de cultivo se tiñeron con Wright al 50% y Giemsa al 5% en buffer fosfatos pH 6.8 durante 5 minutos respectivamente.

Todas las preparaciones fueron codificadas por una persona ajena al estudio con el objeto de realizar un análisis libre de sesgo. Dependiendo del experimento, se analizaron de 25 a 100 metafases por repetición y por experimento y se cuantificaron las aberraciones cromosómicas agrupándolas en 4 categorías: fracturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos céntricos y acéntricos, anillos y dicéntricos, y figuras radiales y otras alteraciones.

2. Síntesis de DNA.

De todos los cultivos celulares tratados con timidina y N-hidroxiurea, se hicieron laminillas y se procesaron por autorradiografía (ver explicación en la Fase I).

Para analizar los núcleos marcados de los diferentes experimentos, las laminillas se codificaron por una persona ajena al estudio; se analizaron 2000 núcleos por cada tipo de tratamiento, por repetición y por tiempo de cosecha y se cuantificaron los núcleos marcados y no marcados con granos de plata; la presencia de granos de plata indicó que hubo incorporación de $6\text{-}^3\text{H}$ timidina y por lo tanto hubo síntesis de DNA. Se graficó el número de núcleos marcados contra el tiempo de cosecha para cada tratamiento.

3. Electroforesis unicelular alcalina (77)

Esta técnica se desarrolló para evaluar directamente en células individuales, la frecuencia de rupturas de DNA de hebra sencilla y/o sitios lábiles a álcali. La prueba de EU combina las técnicas bioquímicas para detectar el daño al DNA y la reparación en células proliferantes y no-proliferantes y determina la distribución de daño en una población celular con las siguientes ventajas:

- a) se requiere de una muestra de células muy pequeña (5 μl de sangre completa)
- b) se obtienen datos de células individuales
- c) tiene gran sensibilidad
- d) se puede hacer en diversos tipos celulares y al parecer en cualquier célula eucarionte.
- e) es muy rápido y simple.

a) Preparación de minigeles y electroforesis unicelular.

Las células de cada experimento (de 5000 a 10,000) se mezclaron con 75 μl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.75% en PBS a 37°C y se colocaron en un portaobjetos totalmente esmerinado al que previamente se le había puesto una capa de agarosa regular (0.75%), se cubrió con un cubreobjetos y se mantuvieron a 4°C durante 3 min. Por último se quitó el cubreobjetos y se adicionó una tercera capa de 75 μl de agarosa de bajo punto de fusión. Nuevamente los minigeles se mantuvieron a 4°C durante 3 min. Se removió el cubreobjetos y el portaobjetos con el gel se sumergió en solución de lisis fría y recién preparada (solución stock: NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Laurilsarcosinato 1%, pH 10; con 1% de tritón X-100 y 10% de DMSO, en la solución de trabajo fresca). Se guardó a 4° C al menos por una hora.

b) Desnaturalización y electroforesis.

Para permitir el desenrollamiento del DNA y la expresión de diferentes tipos de daño lábil a álcali, las laminillas se colocaron en una caja de electroforesis horizontal con buffer alcalino (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH 13) durante 20 minutos; posteriormente se agregó buffer a la cámara de electroforesis hasta que el nivel cubrió perfectamente los minigeles y se realizó la corrida durante 20 min a 25 volts y 300 miliamperes. Estos pasos se realizaron en la oscuridad para evitar daño adicional.

Finalmente, todas las laminillas se lavaron 3 veces con buffer neutralizante (Tris 0.4 M, pH 7.5), se tiñeron con 50 μ l de bromuro de etidio (2 μ g/ml) y se cubrieron con un cubreobjetos limpio.

c) Análisis del daño de DNA.

Para visualizar el daño del DNA, se realizaron observaciones del DNA teñido con bromuro de etidio en 25x usando un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro excitador de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Cuando existen rupturas del DNA o daño sensible al álcali, al realizar la electroforesis los fragmentos resultantes del DNA dañado migran rápidamente alejándose del núcleo por lo que las células dañadas semejan cometas. El largo de la cola del cometa es proporcional al daño cromosómico.

Para cuantificar el daño al DNA en los experimentos de la fase II, se estableció la siguiente escala con diferentes niveles de daño utilizando el diámetro del núcleo como unidad de medida para la migración del DNA (cola del cometa):

Nivel 1: células sin cola y con menos de 1 diámetro de cola.

Nivel 2: células con cola de 2 a 4 diámetros de longitud.

Nivel 3: células con cola de 5 a 7 diámetros de longitud.

Nivel 4: células con cola de 7 ó más diámetros de longitud.

Por cada tipo de experimento se analizaron 100 células con el fin de conocer el porcentaje de células con los diferentes niveles de daño.

Con los resultados obtenidos en cada tratamiento, se graficó el porcentaje de células contra el nivel de daño.

Para cuantificar el daño en los experimentos de la fase III, se midió la longitud de la cola del cometa con un ocular micrométrico calibrado; se analizaron 100 células y se obtuvo el promedio de migración de DNA dañado.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron las siguientes pruebas estadísticas: Xi cuadrada, t de Student y Steel Dwass (78).

RESULTADOS

Fase I. Efecto de las fracciones obtenidas por ultrafiltración: fracción con moléculas de un peso menor de 50 kD y fracción con moléculas de un peso mayor de 50 kD.

En la tabla 1 se presentan los resultados de los experimentos realizados en 3 pacientes AF. Se puede observar que la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por la MMC fue similar en los 3 pacientes (2.2., 2.2 y 2.6 ab/cel), con la adición de plasma completo esta frecuencia disminuyó de manera significativa a 1.38, 1.86 y 1.66 respectivamente ($p < 0.01$). Cuando se agregó la fracción menor de 50 kD no se encontró complementación de las aberraciones en ninguno de los casos, mientras que con la fracción mayor de 50 kD la complementación observada fue muy parecida a la encontrada con el plasma normal. Se hizo evidente que la fracción menor de 50 kD en general no corrige mientras que la mayor de 50 kD tiene una tendencia a corregir la frecuencia de aberraciones cromosómicas desde el 17% hasta el 51%.

Los resultados de los cultivos del cuarto paciente (tabla 2) se presentan por separado debido a que la actividad de la MMC utilizada fue diferente, sin embargo se encontró el mismo comportamiento. En esta tabla se puede observar que tanto el plasma completo como la fracción mayor de 50 kD disminuyeron la frecuencia de aberraciones cromosómicas en un 48.2% y 34.6% respectivamente.

En los cultivos del sujeto control (tabla 3) la respuesta a la MMC fue muy diferente al de los AF ya que no presentan la hipersensibilidad ya mencionada.

Con el objeto de obtener información sobre la naturaleza del factor de corrección, se investigó la sensibilidad del factor presente en el plasma normal a la temperatura y a la tripsina. Las frecuencias de aberraciones cromosómicas encontradas (tabla 4) indicaron que el factor de corrección es resistente a -20°C , sensible a 56°C y a la tripsina, por lo que es probable que el factor o los factores de corrección sean de naturaleza protéica.

En lo que respecta a la síntesis de DNA, en la figura 2 se puede observar que tanto la adición de plasma normal como la de suero normal incrementaron la síntesis de DNA. Cuando se adicionó la fracción menor no existió aumento en la síntesis mientras que con la fracción mayor sólo hubo incremento a las 12 horas.

T A B L A 1

Detección de la actividad correctora del plasma normal y fracciones mayor de 50kD y menor 50kD en cultivos de linfocitos de 3 pacientes con AF

Tratamiento:	Frecuencia de aberraciones cromosómicas		
	AF(ML)	AF(RZ)	AF(CL)
MMC	2.2 ± 0.8	2.2 ± 0.9	2.6 ± 0.3
MMC+plasma normal	1.38 (37.2)•*	1.86 (16.2)•*	1.66 ± 0.1 (36.1)*
MMC+Fracción < 50 kD	2.3 ± 0.3	2.7 ± 1.2	4.08 ± 0.08
MMC+Fracción > 50 kD	1.68 ± 0.4 (27.2)*	1.27 ± 0.2(42.8)*	2.02 ± 0.9(22.3)*

Los valores representan las aberraciones cromosómicas por célula, en experimentos realizados por duplicado en 3 pacientes con AF. Los datos que aparecen entre paréntesis corresponden al porcentaje de corrección de las aberraciones cromosómicas con respecto al cultivo con MMC. La concentración de MMC utilizada fue de 40ng/ml de cultivo.

• Sólo se realizó el análisis en un cultivo de cada experimento.

* Diferencia significativa comparada con el cultivo control (sólo con MMC), $p < 0.01$, t de Student y Xi cuadrada.

T A B L A 2

Detección de la actividad correctora del plasma normal y fracciones mayor de 50kD y menor de 50kD en 50 metafases analizadas en cultivos de linfocitos de un paciente con AF(AM)

Tratamiento:	Frecuencia de aberraciones cromosómicas	%Corrección
MMC	11.44	
MMC+plasma normal	5.92	48.2
MMC+Fracción < 50kD	10.87	4.9
MMC+Fracción > 50kD	7.48	34.6

Los datos representan la frecuencia de aberraciones por célula y el porcentaje de corrección de las aberraciones con respecto al cultivo tratado solamente con MMC, en 50 metafases analizadas. No se realizó análisis estadístico debido a que no fue posible hacer repeticiones de estos experimentos.

La MMC utilizada para estos experimentos fue de diferente lote, la actividad es distinta a la observada en los experimentos anteriores.

T A B L A 3

Efecto del plasma normal y de las fracciones menor y mayor de 50 kD sobre las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC en cultivos de linfocitos de un individuo control

Tratamiento:	Frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula
MMC	0.38
MMC+plasma normal	0.34
MMC+Fracción < 50kD	0.38
MMC+Fracción >50kD	0.26

Las aberraciones inducidas por MMC en células normales oscilan entre 0.20-0.50 ab/cel.

La concentración de MMC utilizada fue 40ng/ml de cultivo.

No se realizó análisis estadístico debido a que no fue posible hacer repeticiones de estos experimentos.

T A B L A 4

Naturaleza del factor de corrección del plasma normal sobre las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC en linfocitos de un paciente AF (AM)

Tratamiento:	Frecuencia de aberraciones	%Corrección
MMC	5.34	
MMC+Plasma normal	3.96	27.7
MMC+Plasma congelado (-20°C)	2.78	47.9
MMC+Plasma 56°C,30 min	5.22	2.2
MMC+Plasma con tripsina	7.74	0

Los valores representan las aberraciones cromosómicas por célula, en experimentos realizados en linfocitos de un paciente con AF(AM). La concentración de MMC y de plasma utilizadas en todos los cultivos fueron de 40ng/ml y al 10% respectivamente. No se realizó análisis estadístico debido a que no fue posible hacer repeticiones de estos experimentos.

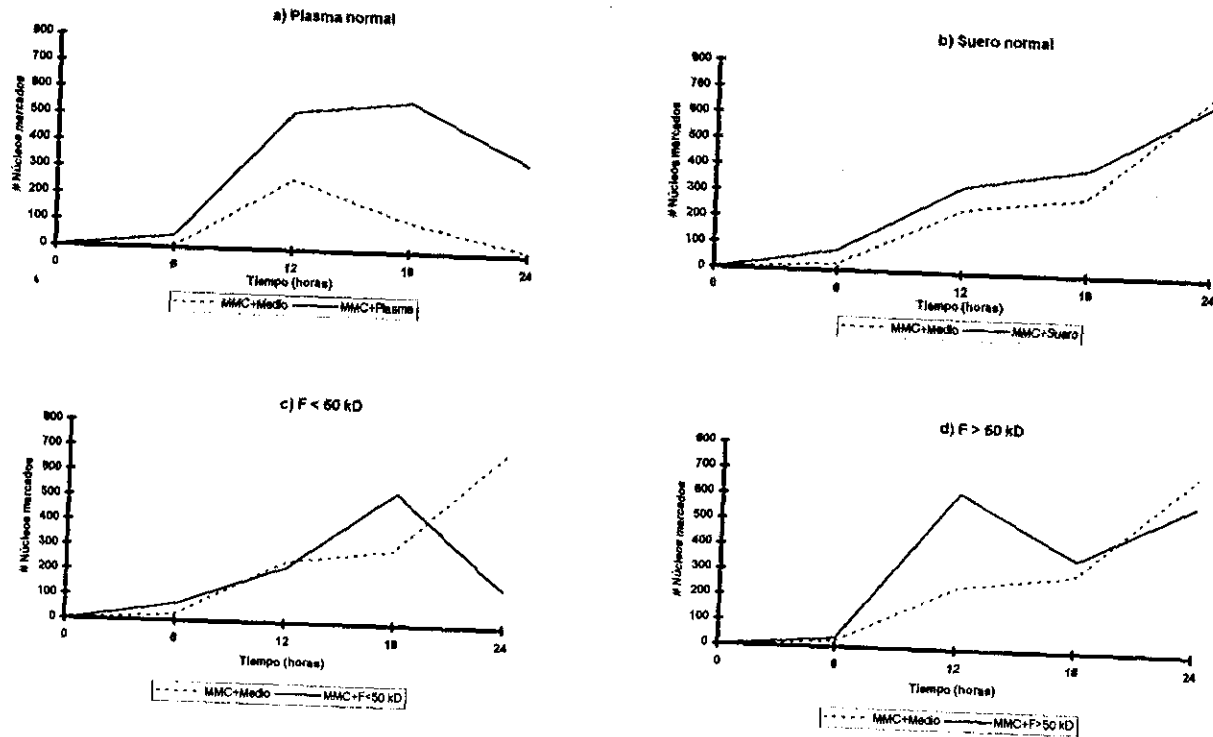


Fig. 2. Efecto de la adición de las fracciones obtenidas por ultrafiltración, sobre la síntesis de DNA de linfocitos AF(RZ) tratados con MMC. cultivos se incubaron con 40 ng/ml de MMC durante 24 hs, se lavaron y se reincubaron durante 24 hs más en presencia de plasma normal (a), suero normal (b), fracción de plasma normal con moléculas menores de 50 kD (c), fracción de plasma normal con moléculas mayores de 50 kD (d). En las gráficas se presenta el número de núcleos marcados (de síntesis) durante 24 hs de cultivo. Estos resultados indican que solamente la adición del plasma normal incrementó significativamente ($p < 0.05$, Xi cuadrada) la síntesis de DNA de las 12 a las 24 hs.

Los resultados de aberraciones cromosómicas (fig.3) y de síntesis de DNA (fig 2) sugieren que la fracción mayor de 50 kD es la que contiene la actividad correctora del daño inducido por MMC en cultivos de linfocitos AF.

Al determinar la concentración de proteína por el método de Bradford, en las fracciones obtenidas por ultrafiltración, se encontró que en la fracción menor de 50 kD había una concentración de proteína baja que iba de 20 a 130 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en la mayor de 50 kD existía 12 a 15 mg/ml ; por lo anterior se decidió concentrar la fracción menor de 50 kD y diluir la fracción mayor de 50 kD y hacer electroforesis para conocer la composición de cada una.

Al correr estas muestras en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, como se puede observar en la figura 4, no se encontraron bandas en las fracciones menor de 50 kD y en la mayor de 50 kD había tanto bandas de más de 50 kD como de menos de 50 kD.

Ahora bien, los resultados de aberraciones cromosómicas indicaron que el factor de corrección se encontró en la fracción mayor y los de síntesis del DNA no fueron concluyentes ya que la fracción mayor sólo aumento la síntesis a las 12 horas. Dado que las electroforesis de las fracciones revelaron que la fracción mayor contenía tanto péptidos grandes como pequeños podría pensarse que la actividad correctora estaría también en una molécula de menos de 50 kD. La presencia de péptidos pequeños en la fracción mayor de 50 kD pudo deberse a dos posibilidades: a) las electroforesis se realizaron bajo condiciones desnaturalizantes y las muestras se trataron con calor por lo que algunas proteínas poliméricas pudieron separarse y migrar como moléculas pequeñas y b) durante la ultrafiltración las moléculas pequeñas se hubieran asociado a otras moléculas más grandes o bien que hubieran quedado atrapadas entre ellas sin tener oportunidad de percolar a través de la membrana.

Fase II. Efecto de las fracciones obtenidas por cromatografía molecular en gel.

El perfil cromatográfico de 2 separaciones de 5 ml de plasma fue similar y sólo se observaban 2 picos, uno muy ancho y otro pequeño (fig. 5); utilizando el perfil de los marcadores de peso molecular, se decidió dividir la fracción grande en 2 y finalmente probar 3 fracciones en los cultivos celulares de AF: la fracción 1A con moléculas de más

**EFFECTO CORRECTOR DEL PLASMA Y DE LA FRACCION MAYOR DE 50 kD SOBRE
LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS INDUCIDAS CON MMC EN
LINFOCITOS DE CUATRO PACIENTES CON AF**

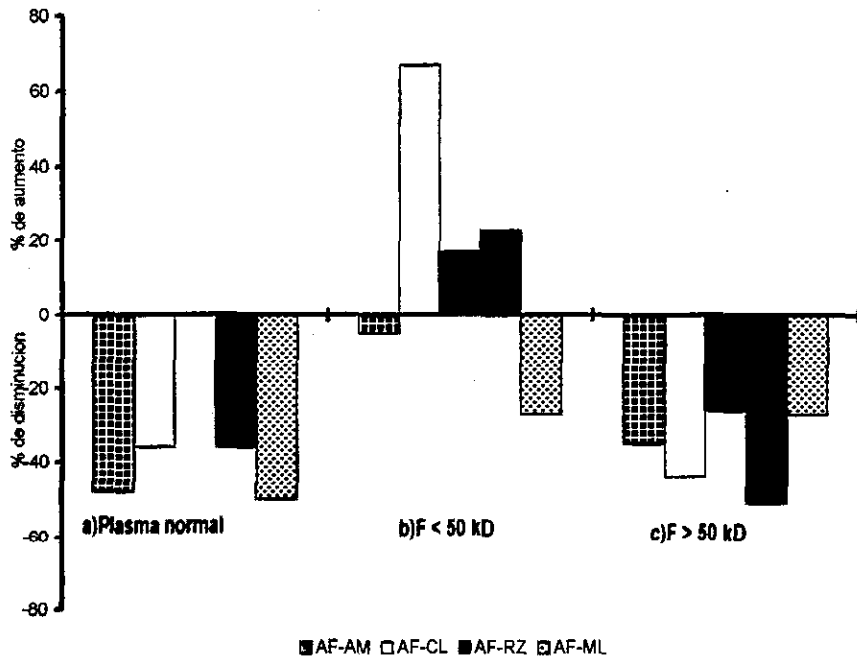


Fig. 3 Efecto de las fracciones de plasma normal obtenidas por ultrafiltración sobre las aberraciones cromosómicas en linfocitos AF tratados con MMC. Los linfocitos AF se trataron 24 hs con 40 ng de MMC, se lavaron y se reincubaron por 24 hs más en presencia de plasma normal (a), fracción menor de 50 kD (b) ó fracción mayor de 50 kD. Los tres tratamientos se realizaron con células de cuatro pacientes con AF y para obtener la frecuencia de aberraciones cromosómicas se analizaron 50 metafases por tratamiento, repetición y por paciente. Para calcular los porcentajes de aumento y disminución de las aberraciones proporcionados por la la adición del plasma o de las fracciones, se consideró como 100% a las presentes en los controles negativos (sólo con MMC) de cada paciente. Las barras con la misma simbología indican repetición de cultivos en las células de un mismo paciente.

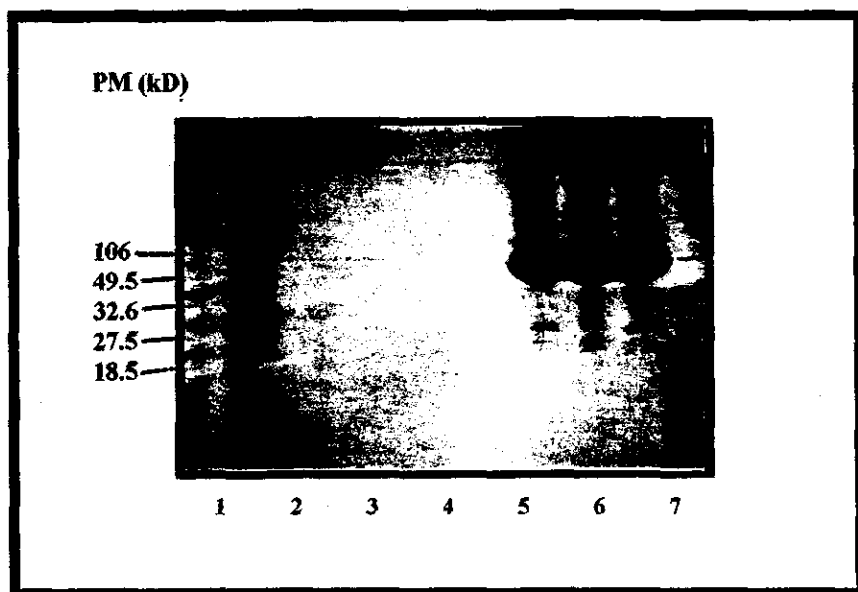


Fig. 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % con SDS de las fracciones obtenidas por ultrafiltración . Carril 1: marcadores de peso molecular que incluyen Fosforilasa B (106kD), Ovoalbúmina (49.5 kD), Anhidrasa carbónica (32.5 kD), inhibidor de tripsina (27.5 kD) y lisozima (18.5 kD); los carriles 2-4 corresponden a la fracción del plasma normal con moléculas menores de 50 kD y los carriles 5-7 a la fracción con moléculas menores de 50kD.

CROMATOGRAMA DE PLASMA HUMANO NORMAL

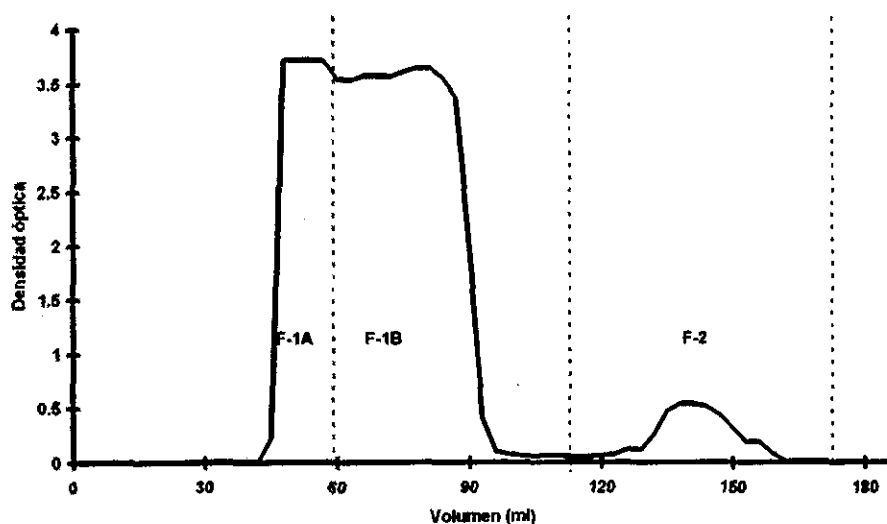


Fig. 5 Perfil cromatográfico de la separación de plasma humano normal por medio de cromatografía molecular en gel. Como se puede observar, sólo se encontraron dos picos, utilizando el cromatograma de los marcadores de peso molecular, las fracciones eluidas se dividieron en tres: la F-1-A con moléculas de un peso mayor a 60 kD, la F-1-B con moléculas de peso menor a 60 kD y la F-2 con moléculas de alrededor de 12 kD.

de 60 kD, la fracción 1B con moléculas menores de 60 kD y la fracción 2 con moléculas de peso pequeño de alrededor de 12 kD. Las 3 fracciones se probaron en cultivos de linfocitos AF, se analizaron por electroforesis unicelular y se encontró lo siguiente :

- a) Sin ningún tratamiento, el 100% de las células normales se encontraban en el nivel 1 de daño. En las células AF, el 96% se encontraron en nivel 1 y el 4% restante en los niveles 2 y 3.
- b) Cuando se trataron con MMC y se suplementaron con medio McCoy's durante las últimas 24 hs, se encontró gran cantidad de daño al DNA, pocas células y la mayoría presentaban daño del nivel 4 (fig.6).
- c) Cuando se le adicionó al medio plasma normal, desaparecieron las células de nivel 4, la mayor parte se encontraron sin daño (nivel 1) y había una menor proporción de nivel 2. La complementación no fue total, pero la diferencia con las células tratadas sólo con MMC fue significativa (fig.6).
- d) Con las fracciones 1A y 2 hubo modificación en el número de células dañadas, pero prácticamente fue el mismo para ambas fracciones; no hubo una complementación importante, ya que existió una disminución del daño del nivel 4 pero a expensas de un aumento del nivel 2 y 3 y el porcentaje de células sin daño (nivel 1) fue muy bajo comparado con el observado cuando se suplementaron con plasma completo (fig.6).
- e) Con la adición de la fracción 1B se observó que la situación era muy parecida a la complementación encontrada por la adición del plasma, sin embargo, se seguían presentando las células de nivel 4 (fig.6).

Estos hallazgos indicaron que la actividad correctora del daño inducido por la MMC en linfocitos se encontraba en la fracción 1B que contenía predominantemente moléculas con un peso menor de 60 kD.

Fase III. Efecto de la Interleucina 6.

Debido a que nuestros datos sugerían que el factor de corrección podría ser una molécula de menos de 60 kD y a que en ese tiempo apareció en la literatura la información de que la IL-6 era capaz de incrementar la resistencia de las células AF a la citotoxicidad

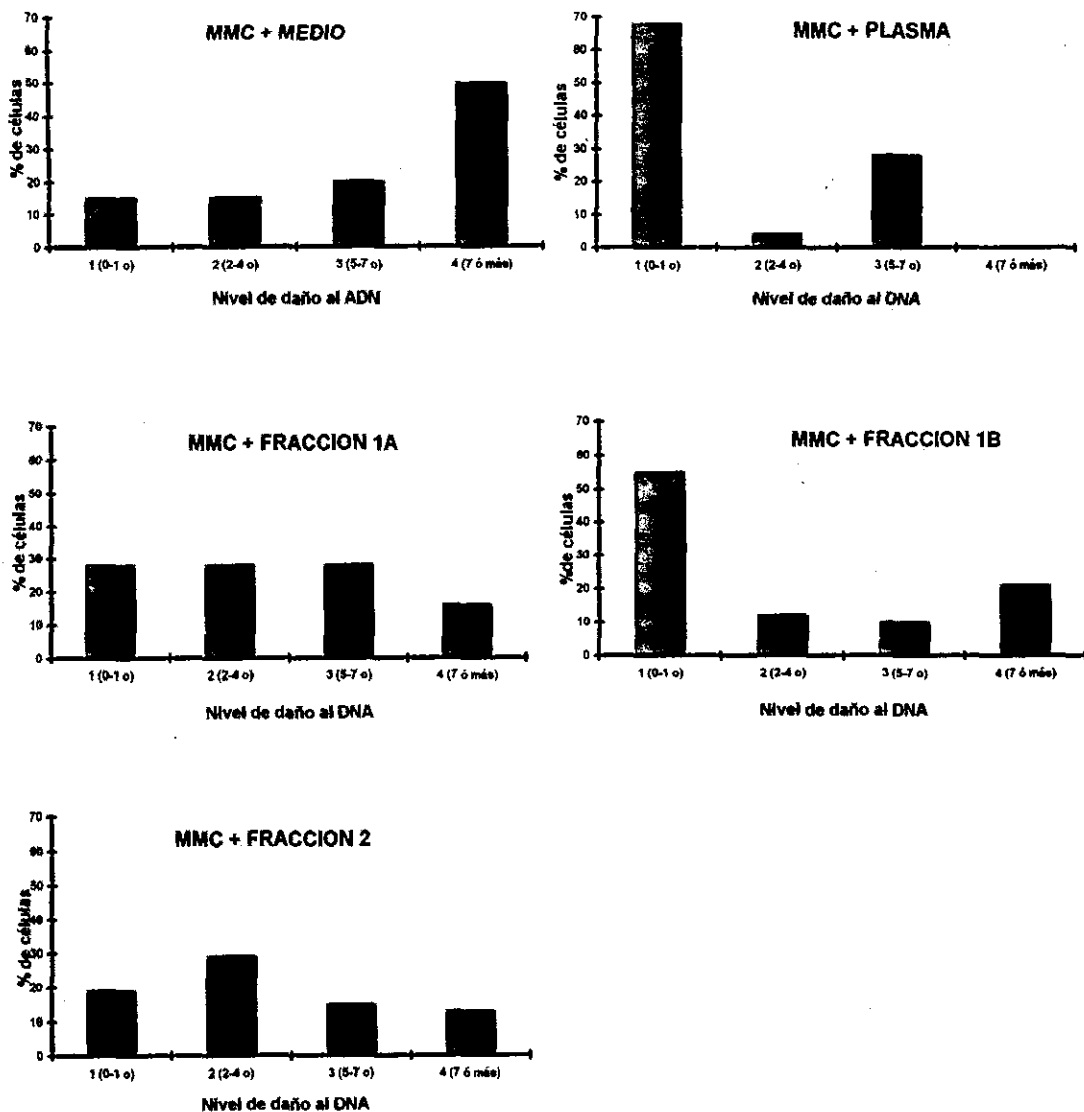


Fig. 6 Distribución del porcentaje de linfocitos AF con respecto al nivel de daño al ADN.

Las gráficas muestran el efecto del plasma normal y de las fracciones de plasma 1A, 1B y 2, obtenidas en la cromatografía molecular en gel y probadas en cultivos de linfocitos AF tratados con MMC. Los niveles de daño al DNA se determinaron utilizando el diámetro del núcleo como unidad de medida para conocer la migración del DNA dañado (cola del cometa). Tanto el plasma como la fracción 1B corrigieron el daño inducido por la MMC, ya que en ambos casos, se observaron más células con nivel de daño 1 y menos con nivel 4.

inducida por la MMC y tiene un peso molecular de 29 kD, decidimos continuar los experimentos encaminados a probar si la IL-6 era la molécula que estábamos buscando.

1. Linfocitos de sangre periférica.

Aberraciones cromosómicas.

En la tabla 5 se presentan los datos obtenidos en los linfocitos de 2 pacientes con AF. Se puede observar que los dos pacientes tienen la respuesta a la MMC característica en AF, es decir, la frecuencia de aberraciones cromosómicas se eleva de manera significativa con respecto a la encontrada en las células sin tratamiento.

Cuando los cultivos de linfocitos AF tratados con MMC se suplementaron con IL-6, la frecuencia de aberraciones disminuyó con respecto a los tratados sólo con MMC en un 31 y un 22%, sin diferencia significativa. Pero cuando se neutralizó la IL-6, en los dos pacientes la frecuencia de aberraciones fue similar a la observada en los cultivos tratados sólo con MMC.

Electroforesis unicelular.

En la figura 7 se presenta la distribución de las células AF con respecto al daño del DNA y el promedio de migración del DNA en cada tratamiento; se puede observar que las células AF sin tratamiento presentaron una migración de 45.4 μm en promedio, cuando se adicionó la MMC hubo un incremento del número de células con mayor daño y el promedio de migración del DNA aumentó a 100.52 μm . Este daño disminuyó cuando se agregó el plasma normal, el promedio de la migración descendió a 65.7 μm . Pero cuando se adicionó la IL-6, se encontró que el promedio de migración fue de 25.8 μm y la distribución de las células con respecto al daño estaba desplazada hacia la izquierda, lo cual indicó que la mayoría de las células presentaron poco o ningún daño al DNA y de hecho menos daño que en las células sin tratamiento; este efecto se revertió cuando las células AF se trataron con IL-6 y el anticuerpo anti-IL-6, el promedio de migración del DNA fue de 95.48 μm , similar al tratado sólo con MMC. Por otra parte, cuando se aplicó el anticuerpo anti-IL-6 para neutralizar a la IL-6 del plasma, tanto las células con daño como el promedio de migración aumentaron de manera muy similar a las células dañadas

T A B L A 5

Efecto de IL-6 en cultivos de linfocitos AF tratados con MMC

TRATAMIENTO :	Frecuencia promedio de aberraciones cromosómicas	
	Paciente AF(GR)	Paciente AF(RZ)
Sin tratamiento	0.11 ± 0.04	0.18 ± 0.02
MMC	5.32 ± 0.96	4.63 ± 0.60
MMC+ IL-6	3.64 ± 0.33	3.57 ± 0.84
MMC+ IL-6 + Ab-anti-IL-6	4.54 ± 1.4	4.17 ± 2.27

La concentración de MMC utilizada fue de 40ng/ml de cultivo y los datos de frecuencia de aberraciones cromosómicas son el promedio de dos repeticiones. No se encontraron diferencias significativas.

T A B L A 6

Resistencia de linfoblastos AF y normal a la MMC

TRATAMIENTO:	Frecuencia promedio de aberraciones cromosómicas				
	Normal	AF-A	AF-B	AF-C	AF-D
Medio +10ng MMC	0.05±0.01	0.75 ±0.04	3.73±0.57	0.29±0	0.76±0.04
IL-6 + 10ng MMC	0.025±0.07	0.52±0.12*	3.6 ±0.36	0.26±0.05	0.54±0.11*
Plasma+10ng MMC	0.035±0.07	0.23±0.01*	3.4±1.33	0.31±0.13	0.79±0.03

En estos experimentos, las células AF proliferaron en presencia de IL-6 o plasma durante 24 hs para conocer si les conferían resistencia a la genotoxicidad inducida por la MMC; los datos representan el promedio de dos repeticiones.

* Diferencia significativa, $p < 0.05$ con respecto al control (medio+ MMC), Xi cuadrada.

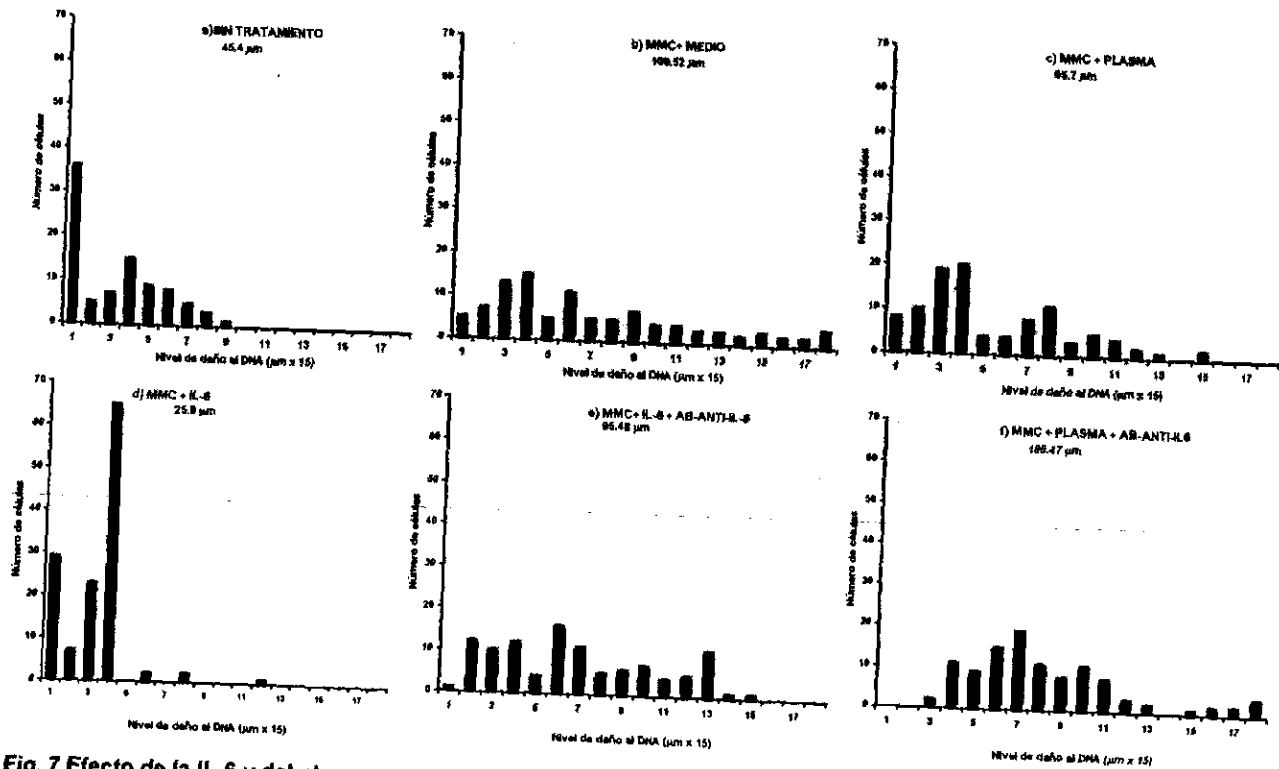


Fig. 7 Efecto de la IL-6 y del plasma normal en células AF tratadas con MMC por medio de electroforesis uncelular alcalina. En las gráficas se presenta la distribución de las células con respecto al nivel de daño al DNA en cada tratamiento. a) Daño al DNA en células sin tratamiento b) Daño al DNA inducido por la MMC c) Efecto del plasma normal en células tratadas con MMC d) Efecto de la IL-6 en células tratadas con MMC e) Efecto de la neutralización de la IL-6 f) Efecto de la neutralización de IL-6 en el plasma normal adicionado a las células dañadas con MMC. La distribución observada en las células sin tratamiento (a) y cuando se adicionó la IL-6 (d) fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$, Steel Dwass) a la encontrada cuando las células se mantuvieron sólo en presencia de medio (b). Los promedios de migración de daño al DNA (cola del cometa, en μm) encontrados en cada tratamiento se presentan en cada gráfica.

con MMC y sin postratamiento; esta respuesta fue similar a la obtenida cuando se agregó el anticuerpo a los cultivos con IL-6 pero sin plasma .

Al analizar la distribución de las células con respecto al nivel de daño al DNA, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la población celular sin tratamiento y las expuestas a MMC ($p < 0.05$, Steel-Dwass), ya que hubo incremento de células con mayor cantidad de daño y disminución de las menos dañadas (fig. 7 a y b). Cuando las células dañadas con MMC se suplementaron con IL-6 se observó un cambio significativo en la distribución, todas las células analizadas tenían un nivel de daño menor o igual a 4, mientras que en el tratamiento con MMC había células con niveles de daño hasta de 16 ($p < 0.01$, Steel Dwass) (fig. 7 b y d).

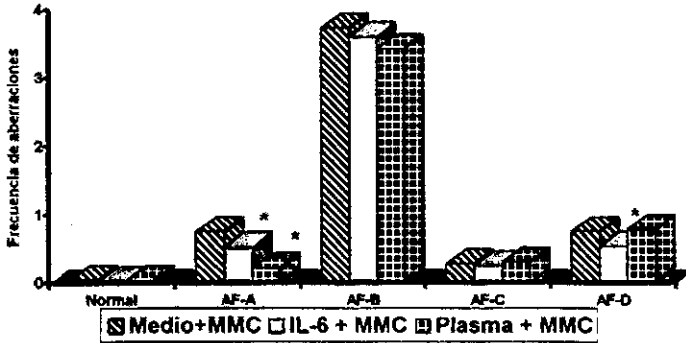
2. Líneas linfoblastoides AF pertenecientes a los cuatro grupos de complementación: AF-A, B, C y D.

Una vez que se tenía la respuesta a la IL-6 en linfocitos de pacientes no clasificados, se procedió a probar si este comportamiento era general a todos los grupos de complementación AF. Esto se pudo realizar gracias a la donación del Dr. Manuel Buchwald, del Hospital for Sick Children, de líneas linfoblastoides AF clasificadas.

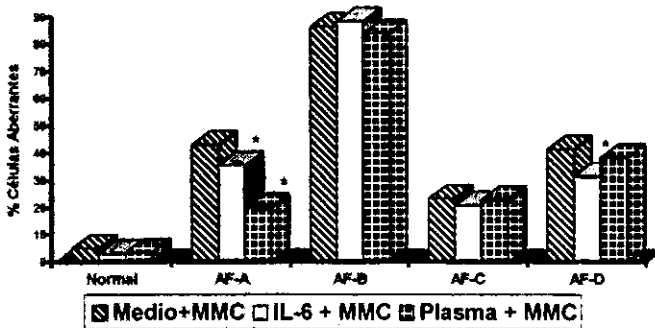
Los experimentos se realizaron sembrando las células de los diferentes grupos de complementación primero en presencia de solo medio, IL-6 o del plasma para probar si les conferían resistencia al tratamiento posterior de 10 ng/ml de MMC. Los resultados indicaron que en los linfoblastos AF-A, la frecuencia de aberraciones cromosómicas observada en el control suplementado sólo con medio fue de 0.75 ab/cel, mientras que cuando las células se trataron con IL-6 o plasma disminuyó de manera significativa a 0.52 ab/cel ($p < 0.05$) y 0.23 ab/cel ($p < 0.001$) respectivamente. La línea normal tuvo un comportamiento similar al observado en las células AF, sin embargo, las diferencias no fueron significativas (tabla 6 y fig 8a).

En las células AF-B y AF-C los resultados indican que ni el plasma ni la IL-6 tienen un efecto corrector sobre el daño inducido por MMC, ya que la frecuencia de aberraciones cromosómicas en ambos casos es similar a la del control (tabla 6).

a) Frecuencia de aberraciones cromosómicas en líneas linfoblásticas AF y normal



b) Porcentaje de células con daño en líneas linfoblásticas AF y normal



* Diferencia significativa, $p < 0.05$, Xi cuadrada.

Fig.8 Efecto de la MMC sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas y porcentaje de células con daño, en líneas linfoblásticas AF y normal tratadas con IL-6 y plasma normal. Los linfoblastos pertenecientes a los grupos de complementación A, B, C, D y normal se cultivaron durante 24 hs en presencia de sólo medio, IL-6 o plasma normal, después se trataron con MMC (10ng/ml) y se cosecharon a las 48 hs. Para determinar la frecuencia de aberraciones y el porcentaje de células con daño, se analizaron 100 metafases por tratamiento y por línea.

Cuando se analizó el porcentaje de células con daño en las cuatro líneas AF y en la normal se encontró la misma respuesta que con el análisis de aberraciones cromosómicas (fig. 8 b).

Fase IV. Efecto del plasma normal en los grupos de complementación AF.

En la tabla 7 se presenta el efecto del plasma humano normal en los 4 grupos de complementación AF y una línea normal tratadas con 40 ng de MMC/ml. Se puede apreciar que en la línea normal no existe complementación con la adición del plasma, ya que las frecuencias son muy similares en las 3 repeticiones cuando se tratan sólo con MMC y con plasma normal.

En las líneas AF solamente en la línea del grupo de complementación A hubo un efecto de corrección. La frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC en dos repeticiones fue de 20.7 y 9.48, cuando se suplementaron con plasma normal las frecuencias disminuyeron significativamente ($p < 0.01$) a 5.76 y 5.08 respectivamente; la adición del plasma normal corrigió las aberraciones cromosómicas en un 72.2% y 46.4% con respecto al control tratado sólo con MMC.

En las demás líneas celulares AF no se encontró corrección de las aberraciones cuando los cultivos se suplementaron con 20% de plasma normal, en algunos casos, la frecuencia de aberraciones excedió la observada en el control tratado sólo con MMC.

T A B L A 7

Efecto del plasma normal en líneas linfoblastoides AF y normal tratadas con MMC

LINEAS CELULARES:	Frecuencia de aberraciones cromosómicas		
	MMC	MMC+plasma	%Corrección
Normal	0.44	0.4	9
	0.2	0.28	0
	0.32	0.32	0
AF-A	20.7	5.76 *	72.2
	9.48	5.08 *	46.4
AF-B	8.76	11.04	0
	3.6	4.72	0
	3.88	4.0	0
AF-C	1.16	1.16	0
	2.24	2.0	0
	0.88	1.28	0
AF-D	2.4	3.52	0
	2.12	2.16	0
	1.48	1.96	0
	1.2	1.92	0

La concentración de MMC en las líneas normal, AF-A, AF-D, fue de 40 ng/ml de cultivo y en AF-B y AF-C de 10 ng/ml de cultivo. La concentración de plasma humano normal fue del 20 %. El número de repeticiones para cada línea varió de 2 a 4 repeticiones.

* Diferencia significativa, $p < 0.001$ comparada con el cultivo con MMC, Xi cuadrada.

DISCUSIÓN

Fase I. Efecto de las fracciones obtenidas por ultrafiltración: fracción con moléculas de un peso menor de 50 kD y fracción con moléculas de un peso mayor de 50 kD.

Se corroboró que el plasma humano normal corrige de manera parcial la elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por la MMC en linfocitos de diferentes pacientes con AF (72, 73). En todos los pacientes que se incluyeron en este estudio se encontró la complementación parcial, pero la respuesta no fue homogénea entre ellos, ya que en algunas ocasiones el porcentaje de corrección es muy alto, mientras que en otros, se corrige de manera muy discreta ; este comportamiento se observa tanto entre los diferentes pacientes, como entre las repeticiones de cada uno.

Aunque actualmente se conocen 5 diferentes grupos de complementación con un fenotipo celular diferente, la variabilidad que encontramos no se puede atribuir a heterogeneidad genética, ya que a lo largo de este estudio el comportamiento de los pacientes sugiere que pertenecen a un mismo grupo de complementación, como se discute posteriormente (ver pág. 41,43). En esta variabilidad de la respuesta podrían intervenir factores tales como el plasma normal y la respuesta de cada individuo y aunque el plasma que se utilizó siempre se obtuvo de la misma persona, bajo condiciones muy similares de dieta y siempre en estado libre de enfermedad y medicación, no se puede asegurar que su composición fuera siempre la misma porque existen factores, por ejemplo, las hormonas o el contenido de agentes antioxidantes en la dieta, que modifican de manera importante la concentración o presencia de algunos compuestos que pueden tener un papel relevante en la corrección del daño y que por lo tanto contribuyen a la variabilidad de la respuesta en los diferentes pacientes.

Por lo anterior, es probable que la variabilidad en la respuesta intra e interpaciente se podría reducir al aumentar el número de células analizadas y de repeticiones para cada experimento; sin embargo, para la mayoría de los estudios de este trabajo se utilizaron linfocitos de diferentes pacientes con AF, por lo que dada su condición de anémicos no fue posible hacerlo.

A pesar de la variabilidad, es muy importante hacer notar que todas las células AF que se incluyeron en este estudio provinieron de pacientes en los que siempre se encontró una corrección de las aberraciones cromosómicas cuando las células se suplementaron con plasma normal.

Los resultados del fraccionamiento del plasma normal por medio de ultrafiltración revelaron que la actividad correctora de las aberraciones se encontraba en la fracción con moléculas de un peso molecular mayor a 50 kD; el porcentaje de complementación varió del 17 al 51%, muy similar al observado con el plasma completo. Una respuesta parecida se obtuvo al cuantificar la síntesis de DNA de los linfocitos AF, el plasma completo, el suero y la fracción mayor de 50 kD incrementaron la síntesis de DNA después del daño inducido por MMC mientras que la fracción menor no la modificó.

Todos estos resultados indicaron que la actividad correctora se presentaba en la fracción mayor de 50 kD, pero la electroforesis mostró que en la fracción menor de 50 kD no había proteínas mientras que en la mayor de 50 kD existía una gran cantidad de proteínas tanto de alto como de bajo peso molecular. Esto pudo deberse a que las moléculas grandes y muy abundantes no hayan permitido que todas las proteínas pequeñas fluyeran a través de los poros de la membrana Amicon, o bien porque lo que se encontró en la electroforesis como péptidos de bajo peso molecular sea el producto de la desnaturalización de algunas proteínas poliméricas cuando las muestras se trataron con SDS y calor antes de colocarlas en los geles.

En lo que respecta a la naturaleza del factor de corrección, se encontró que es muy probable que se trate de una proteína ya que su actividad se abolió totalmente cuando el plasma se trato con tripsina y cuando se desnaturalizó con calor (a 56°C, 30 min.).

Fase II. Efecto de las fracciones obtenidas por cromatografía molecular en gel.

Los resultados del fraccionamiento por cromatografía molecular en gel indicaron que la actividad correctora se encontraba en la fracción que contiene moléculas de menos de 60 kD; al medir la migración del DNA dañado por medio de la técnica de electroforesis unicelular se observó una disminución importante de las células que tenían un nivel de daño mayor cuando los linfocitos se suplementaron con la fracción 1B.

Frias y cols (1992), al analizar electroforéticamente los medios condicionados por células AF y normales, encontraron una diferencia en la presencia de péptidos: los medios condicionados de los cultivos AF comparados con los normales carecían de un péptido de 35 kD y otro de 15 kD. Al probar su efecto corrector, se observó que la corrección de las aberraciones cromosómicas tenía tendencia a aumentar cuando el tiempo de condicionamiento por las células normales era mayor (79).

Los hallazgos obtenidos en este trabajo, al fraccionar el plasma, están de acuerdo con los encontrados por Frias y cols (1992), ya que el tamaño de los péptidos ausentes en los medios condicionados por las células AF corresponde al intervalo de la fracción del plasma que contiene la actividad correctora. Todos estos hallazgos apoyan la existencia de un factor difusible de bajo peso molecular producido por células normales que es capaz de disminuir significativamente tanto la elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas como el daño directo al DNA de los linfocitos de los pacientes con AF.

Fase III. Efecto de la interleucina 6.

De manera paralela a la realización de este trabajo, Rosselli y cols (1992) determinaron una nueva característica en la AF que al parecer contribuía a explicar el defecto en la diferenciación del sistema hematopoyético: encontraron que la producción de (IL-6) estaba disminuída en la células AF y que la adición de IL-6 incrementaba la resistencia de los linfoblastos AF a la citotoxicidad de la MMC, medida como aumento en la supervivencia celular (37).

Tomando en cuenta los hallazgos de Rosselli y cols (1992) y considerando que el peso molecular de la IL-6, 29kD, coincidía con el intervalo de pesos moleculares encontrado en el presente trabajo (de menos de 60 kD) en la fracción del plasma con actividad correctora del daño al DNA inducido por la MMC , se consideró que la IL-6 podría ser el factor corrector. Estos autores, sólo experimentaron con células del grupo de complementación AF-A y el sistema de detección de la corrección y el diseño experimental fue diferente al utilizado en este trabajo, ya que ellos adicionaron la IL-6 antes de la MMC mientras que aquí primero se dañó a las células y luego se les suplementó con el plasma. Por consiguiente, se decidió probar el efecto de la IL-6 con linfocitos AF y líneas linfoblastoides

de los 4 grupos de complementación utilizando nuestro sistema experimental con aberraciones cromosómicas. Adicionalmente, se probó la respuesta a IL-6 en linfocitos AF, con EU como método de detección de daño al DNA.

Los resultados del análisis de aberraciones cromosómicas en linfocitos AF indicaron que la IL-6 fue capaz de disminuir parcialmente la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por la MMC, pero cuando su actividad fue bloqueada con el anticuerpo anti-IL-6, el nivel de daño no regresó al mismo porcentaje que el del cultivo tratado sólo con MMC; esto puede deberse a la misma variabilidad de resultados con la que nos hemos encontrado a lo largo de este trabajo, pero, también se puede pensar que la IL-6 no es el único factor involucrado en la actividad correctora., de manera que si a pesar de la neutralización de IL-6 por anticuerpos, existió un porcentaje de corrección de las aberraciones cromosómicas, probablemente es realizado por la participación de alguna otra molécula diferente a la IL-6.

Con EU se observó que en los linfocitos AF, tanto el plasma normal como la IL-6, de manera independiente, corregían el daño inducido por la MMC mientras que cuando se adicionaba al plasma o a la IL-6 anticuerpo anti-IL-6 no existía efecto de corrección y la respuesta era muy similar a la observada en el cultivo dañado sólo con MMC. Al parecer el plasma y la IL-6 son capaces de disminuir eficientemente el daño inducido por la MMC, de hecho ya que el anticuerpo anti IL-6 suprime este efecto del plasma, parece que tal respuesta es producida principalmente por la IL-6; es importante señalar que el grado de corrección realizado por la IL-6 es total ya que el promedio de migración del daño del DNA es menor que el observado en las células sin ningún tratamiento y la mayoría de las células presentaron un daño mínimo.

Por otra parte, en este trabajo se demostró que la IL-6 confiere resistencia a los linfoblastos AF-A y D: cuando se cultivaron en presencia de IL-6 y luego se dañaron con MMC, la frecuencia de aberraciones cromosómicas fue significativamente menor que la observada en las células que no tenían IL-6. Estos hallazgos están de acuerdo con lo reportado por Rosselli y cols (37) para el grupo de complementación AF-A pero la resistencia que ellos estudiaron fue en función de la supervivencia celular, mientras que en este trabajo se evaluaron aberraciones cromosómicas. Nuestros datos indican además, que la deficiencia de IL-6 en AF, no es una característica generalizada en los 4 grupos de

complementación, sólo se encontró en dos de ellos. Adicionalmente, el plasma sólo proporcionó resistencia a las células del grupo de complementación AF-A, lo cual significa que el defecto celular en los distintos grupos de complementación varía, ya que si la IL-6 corrige parcialmente el daño y en el plasma hay interleucina debería existir corrección en las células AF-D con la adición del plasma; sin embargo no es así, el nivel de daño con plasma es el mismo que el control, por lo tanto, en AF-D deben existir otras alteraciones celulares que impiden la complementación.

Es claro que la IL-6 tiene un papel importante en la corrección del daño en las células AF-A y D, sin embargo, el mecanismo de acción se desconoce ya que su deficiencia en AF puede explicar la anemia pero su relación con la fragilidad cromosómica debe estar vinculada a otros factores intracelulares que a su vez causan daño directo al DNA. La IL-6 es una citocina de bajo peso molecular (29 kD) producida por diversos tipos celulares tales como linfocitos T y B, monocitos, fibroblastos, células endoteliales y varias células tumorales; su producción está regulada positiva o negativamente por una gran variedad de señales: acción mitogénica, por lipopolisacáridos y diversas citocinas tales como IL-1, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento derivado de plaquetas, interferón beta, ésteres de forbol y algunos virus. Es una proteína multifuncional, se sabe que tiene una función dual en cuanto al crecimiento celular: de acuerdo a las condiciones fisiológicas, puede participar en la estimulación o inhibición del crecimiento celular, en la inducción de la diferenciación (hematopoyesis), en la regulación de la expresión génica específica, por interacción con un receptor que puede mandar mensajes intracelulares a través de cambios alostericos que inducen la producción de otros factores que envían señales al núcleo (80,81).

Considerando estos resultados y los de otros autores, se propone que es muy probable que la actividad correctora de las aberraciones cromosómicas en AF está dada por varios componentes, ya que se han encontrado alteraciones celulares aisladas como responsables de la inestabilidad cromosómica, por ejemplo, baja producción de IL-6, sobreproducción del factor TNF- α , alteraciones en la inducción de p53, falla en la remoción de radicales libres del oxígeno, alteración en la reserva de nucleótidos, (37, 38, 61, 62, 64, 68, 82, 83)

La deficiencia de IL-6 en AF está relacionada con una sobreproducción del factor de necrosis tumoral (TNF- α) (83). Este factor es una citocina citotóxica y citostática que en células normales y cancerosas potencia la producción intracelular de radicales oxígeno que pueden producir daño al DNA y muerte celular. Se sabe que *in vitro*, en linfocitos normales, induce intercambios de cromátidas hermanas y en el ciclo celular actúa arrojando a las células preferencialmente durante la fase G2. *In vivo*, se ha visto que la expresión alterada de TNF- α conduce a condiciones patológicas tales como anemia y bajos niveles de hemoglobina, que pueden relacionarse con respuestas *in vitro* a TNF- α como alteraciones en la producción de p53 y del fenómeno de apoptosis (84, 85, 86).

Ahora bien, recientemente se ha visto que en AF la sobreproducción del TNF- α conduce a una hipersensibilidad celular a la MMC que no puede ser totalmente corregida por la adición de IL-6, pero cuando se agrega anticuerpo anti-TNF- α existe una corrección total de la hipersensibilidad a la MMC y de aberraciones cromosómicas (85). Así, la deficiencia de IL-6 se asocia a la sobreproducción de TNF- α y por lo tanto de manera indirecta a una elevación de los radicales libres que produce daño al DNA y alteración en la regulación de la división celular y la apoptosis.

Fase IV. Efecto del plasma normal en los grupos de complementación AF.

Al probar el efecto del plasma humano normal en los diferentes grupos de complementación se encontró que la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC sólo disminuyó de manera significativa en los linfoblastos AF-A. Al parecer, el plasma normal tiene componentes que proporcionan tanto resistencia a la citotoxicidad como capacidad de corrección de las aberraciones cromosómicas al grupo de complementación A. Rossellí y cols (37), observaron un comportamiento similar al estudiar la presencia de medios condicionados por células normales en AF-A y AF-B, sólo el grupo A fue respondió a los medios condicionados, sin embargo ellos no estudiaron el resto de los grupos AF, por lo que en este trabajo se puede agregar que AF-C y AF-D tampoco responden a plasma normal, aunque como ya se mencionó, en AF-D se encontró respuesta a IL-6, lo cual requiere de mayor investigación para determinar porqué no respondió al plasma normal.

En AF-A el plasma promueve la división celular ya que aumentó el porcentaje de células sintetizadoras de DNA y también aumentó el porcentaje de células sin daño en mayor grado que la adición de la IL-6; en AF-D, sólo con IL-6 se redujo el porcentaje de células aberrantes y la frecuencia de aberraciones. Tanto en la línea normal como en AF-B y C no hubo modificación ni con el plasma ni con la IL-6, esto seguramente se debe a que el defecto es distinto en cada grupo.

Dado que el plasma normal sólo corrigió las aberraciones cromosómicas en AF-A es posible que los pacientes estudiados pertenezcan a este grupo de complementación, ya que todos tienen una respuesta positiva a la adición del plasma normal.

Funcionalidad del factor de corrección.

El factor difusible que se ha estudiado aquí, es capaz de corregir parcialmente las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC, esta actividad podría realizarse a través de dos procesos celulares: a) Por estimulación de la división celular, ya que cuando una célula está severamente dañada a nivel cromosómico, la división celular puede filtrar las células menos dañadas, porque las que están severamente dañadas se mueren al tratar de reproducirse por una falla en la repartición equitativa del material genético. b) La corrección podría deberse a una disminución directa del daño al DNA, si se mejora la reparación o bien se previene a las células de ser altamente dañadas a nivel de su DNA, las aberraciones cromosómicas podrían disminuir.

Para intentar explicar el mecanismo de acción del factor de corrección, los estudios de síntesis de DNA y de electroforesis unicelular pueden dar información al respecto, ya que la síntesis de DNA es una indicación de división celular casi obligada, sólo se podría mencionar como excepción a las células que entran a G0 a través del punto de restricción de G2 y no del de G1 y éstas son la minoría. Por otra parte, los estudios de EU demuestran que el factor presente en el plasma normal directamente disminuyó el daño al DNA, aunque este diseño no indica si lo hace a través de reparación del DNA o por modificar las condiciones dañinas para el material genético (por ejemplo concentración de radicales libres), y esto será motivo de posteriores experimentos.

Los estudios de síntesis de DNA mostraron que el plasma incrementó de manera significativa el porcentaje de células AF que realizan síntesis después del tratamiento con MMC. Estos resultados se apoyan también en los datos obtenidos por Frias y cols (68), en los que se observa que el plasma normal ayuda a la recuperación de la población de células AF sintetizadoras de DNA, después del tratamiento con agentes genotóxicos. Así, es evidente que el factor presente en el plasma puede actuar a través de división celular, ya que incrementa la síntesis de DNA y es capaz de disminuir la frecuencia de aberraciones cromosómicas, muy probablemente por un proceso de selección en el que se mueren las células con mayor daño durante las divisiones celulares y proliferan las menos dañadas. Es probable que como otros factores de crecimiento, este factor de corrección también actúe regulando la proliferación de las células a través de una cascada de eventos que puede involucrar varios factores de crecimiento así como proteínas de señalización y regulación de la división y muerte celular. En general, se sabe que en el plasma normal se encuentran diversos tipos de citocinas como por ejemplo interleucinas (de la 1 a la 12), interferones y otros factores de crecimiento. Estos resultados son compatibles con una de las más importantes características de la AF: la falla en la médula ósea de la producción de células hemáticas, las cuales se dividen por la interacción armónica de estos factores de crecimiento; los resultados indican que existe una falla en las células AF que impide que se realice una síntesis normal de DNA y ésta puede ser parcialmente corregida por la adición de plasma normal o bien de una fracción de él y todos estos datos son compatibles con una falla en IL-6.

Por otra parte, los estudios de electroforesis unicelular, en las células AF tratadas con MMC y posteriormente con plasma o fracciones de él, mostraron que el factor reduce el daño directo al DNA, al revisar la literatura, pensamos que esta disminución del daño se puede explicar por 2 mecanismos:

- 1) El plasma contiene factores de crecimiento, como la IL-6, que pueden formar parte de señales transduccionales que permitan reconocer o reparar el DNA dañado (82). Originalmente, la AF se consideró una enfermedad con alteración de la reparación del DNA, específicamente de uniones cruzadas de la doble hélice (9,28), sin embargo es poco probable que el factor de corrección esté directamente relacionado con una proteína de este

tipo, ya que las moléculas de reparación del DNA se encuentran principalmente en el núcleo.

2) La segunda opción para disminuir el daño directo al material genético, es que el factor modifique las condiciones bajo las cuales se daña el DNA, por ejemplo, si existe un nivel bajo de IL-6, se encuentra una elevación de TNF- α y este factor potencia la producción de radicales libres que dañan directamente al DNA (83). Por lo tanto, la función del factor de corrección podría ser recuperar aunque sea parcialmente los niveles de IL-6 y de esta manera no permitir la elevación de radicales libres a través de TNF- α .

Otra forma en la que el plasma podría modificar las condiciones para evitar daño al DNA es por moléculas antioxidantes, se sabe que entre los más importantes productores de aberraciones cromosómicas están los radicales libres producidos por el metabolismo del oxígeno, por lo que existe una defensa natural de moléculas antioxidantes y muchas de ellas se han detectado en el plasma normal: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, vitamina E, selenio, ácido ascórbico y cítrico, etc. Específicamente en AF se han hecho varios estudios para detectar diferencias por lo menos de enzimas antioxidantes entre AF y normales. Los resultados han sido controversiales, ya que sólo algunos autores han encontrado niveles bajos de superóxido dismutasa (52-58), sin embargo no se puede descartar esta posibilidad y para conocer el papel del factor de corrección, es necesario diseñar otros experimentos, ya que en esta fase, no estuvieron encaminados a contestar esta pregunta.

Por lo anterior, creemos que es muy probable que la actividad correctora de las aberraciones cromosómicas en AF esté constituida por varios componentes y puede actuar tanto a nivel de división celular como a nivel de disminución de daño al DNA.

Finalmente, como información obtenida colateralmente, por los experimentos realizados en linfocitos de pacientes y por los resultados en las líneas celulares clasificadas, se puede sugerir que los pacientes pertenecen al grupo de complementación AF-A; esto no es raro porque aproximadamente el 60% de todos los pacientes AF pertenecen a este grupo de complementación, actualmente, se está trabajando en la identificación del grupo de complementación al que pertenecen los pacientes AF mediante fusión celular, esto permitirá conocer si realmente los pacientes incluidos en este trabajo corresponden al grupo A.

CONCLUSIONES

De los estudios realizados en este trabajo se colcluye lo siguiente:

1. Las actividades correctora de las aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC en células AF se encuentra en una fracción de plasma que está constituida por moléculas predominantemente de un peso molecular menor a 60 kD.
2. Las moléculas del plasma normal, involucradas en la corrección, son de naturaleza protéica.
3. La actividad correctora se observó en diferentes pacientes, sin embargo siempre se realizó de manera parcial.
4. Con los estudios realizados con las líneas celulares clasificadas, se demostró que la actividad correctora del plasma es específica para el grupo de complementación A. Por esta razón, es muy probable que la mayoría de las células de los pacientes utilizadas en este trabajo pertenezcan al grupo A, ya que en todos se observó complementación.
5. En la actividad correctora del plasma está formada por varios factores. La IL-6 es uno de estos, sin embargo sólo complementa parcialmente el daño en las células que pertenecen al grupo A y D. Además se observó que no es el único, ya que en el grupo A la complementación realizada por el plasma fue mayor que la proporcionada sólo por la IL-6.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Joenje H, Mathew C y Gluckman E. Fanconi anaemia research: Current status and prospects. *European Journal of Cancer* . 2 :268-272, 1995.
- 2) Macdougall LG, Greef MC, Rosendorff J y Bernstein R. Fanconi anaemia in black African children. *Am J Med Genet* . 36 :408-413,1994.
- 3) Alter B.P. Fanconi's anaemia and its variability. *British J of Haematology* . 85:9-14, 1993.
- 4) Alter BP, Knobloch ME y Weinberg RS. Erythropoiesis in Fanconi's Anemia. *Blood* . 78 :602-608, 1991.
- 5) Heim R, Lench N y Swiff M. Heterozygous manifestations in four autosomal recessive human cancer-prone syndromes: Ataxia telangiectasia, Xeroderma pigmentosum, Fanconi anemia, and Bloom syndrome. *Mutat. Res.* 284:25-36, 1992.
- 6) Nyhan WL y Sasaki NO. (1991) Genetic and malformation syndromes in clinical medicine. Year Book Medical Publisher, Inc, Chicago
- 7) Goodman RM y Gorlin RJ.(1983) Fanconi pancytopenia syndrome. En: Goodman R.M. and Gorlin R.J: *The malformed infant and child*. Oxford University Press, New York pp. 258-259.
- 8) Schroeder TM, Anschutz F y Knopp A. Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy. *Hum.Genet.* 1:194, 1964.
- 9) Sasaki MS y Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA crosslinking agents. *Cancer Res* . 33:1829- 1836, 1973.
- 10) Auerbach A.D. y Wolman S.R. Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature* . 261: 494-496, 1976.
- 11) Novotná B, Goetz P y Surkova NI. Effects of alkylating agents on lymphocytes from controls and from patients with Fanconi's anemia. *Hum.Genet.* . 49:41, 1979.
- 12) Cervenka Y, Arthur D y Yasis C. Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic anemia and Fanconi anemia. *Pediatrics* . 67:119, 1981.
- 13) Frias S, Carnevale A y Del Castillo V. Utilidad de la prueba de exposición de linfocitos a mitomicina C en el diagnóstico de anemia de Fanconi. *Rev.Invest.Clin.(Méx)*. 36:219, 1986.

- 14) Gordon-Smith EC y Rutherford TR. Fanconi anaemia-constitutional, familial aplastic anaemia. *Baillière's Clinical Haematology* . 2:139-152, 1989.
- 15) Auerbach AD y Allen RG. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. *Cancer Genet Cytogenet* .51:1, 1991.
- 16) Schroeder TM, Auerbach A y Obe G.(1989) Fanconi anemia , clinical cytogenetic and experimental aspects. Heidelberg, Springer-Verlag, Berlin.
- 17) Liu J, Buchwald M, Walsh C y Young N. Fanconi anemia and novel strategies for therapy. *Blood*; 84 : 3995-4007, 1994
- 18) Strathdee C y Buchwald M. Molecular and Cellular Biology of Fanconi anemia. *The Am. J of Pediatric Hematology/Oncology* .14:177-185, 1992.
- 19) Cohen M y Levy H. (1989) Chromosome Instability Syndromes. En: Harris H y Hirschhorn K(Eds): *Advances in Human Genetics*. Plenum Press, New York. pp.43-145.
- 20) Lambert W.C. Genetic diseases associated with DNA and chromosomal instability. *Dermatol Clinics* . 5 : 85-108, 1987.
- 21) Nordenson I. Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia. *Hereditas* . 86 : 147-150, 1977.
- 22) Joenje H. y Oostra AB. Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi anaemia. *Hum Genet*. 65: 99-101, 1983.
- 23) Dallapiccola B. Porfirio B. Mokini V. Alimena G. Isacchi G. y Gandini E. Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi anemia lymphocytes. *Hum. Genet*. 69: 62-65, 1985.
- 24) Gille J, Wortelboer H y Joenje H. Antioxidant status of Fanconi anemia fibroblasts. *Hum Genet*. 77:28-31, 1987.
- 25) Schindler D y Hoehn H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Hum Genet*. 43:429-435, 1988.
- 26) Nocetini S. Cellular responses to hematoporphyrin-induced photooxidative damage in Fanconi anemia, Xeroderma pigmentosum and normal human fibroblasts. *Mutat Res*. 284: 275-285, 1992.
- 27) Arwert F y Kwee L. (1989) Chromosomal breakage in response to cross-linking agents in the diagnosis of Fanconi anemia. En: Schroeder TM, Auerbach A y Obe G (Eds.) *Fanconi anemia , clinical cytogenetic and experimental aspects*. Heidelberg, Springer-Verlag, Berlin.

28) Sasaki MS. Is Fanconi's anaemia defective in a process essential to the repair of DNA cross-links? *Nature* . 257:501, 1975.

29) Papadopoulo D, Averbek D, y Moustacchi E. The fate of 8-methoxy-psoralen-photoinduced DNA interstrand cross-links in Fanconi's anemia cells of defined complementation groups. *Mutat.Res* .184:271, 1987.

30) Moustacchi E y Diatloff-Zito C. DNA semi-conservative synthesis in normal and Fanconi anemia fibroblasts following treatment with 8 methoxypsoralen and near ultraviolet light or with X-rays. *Hum Genet*. 70:236-242, 1985.

31) Rey JP, Scott R y Muller H. Induction and removal of interstrand crosslinks in the ribosomal RNA gens of lymphoblastoid cell lines from patients with Fanconi anemia. *Mutat Res*. 289:171, 1993.

32) ZhenW, Evans MK, Haggerty CM y Bohr VA. Deficient gen specific repair of cisplatin-induced lesions in xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia cells. *Carcinogen* 14:919, 1993.

33) Hirsch-Kauffman M, Schweiger M, Wagner EF y Sperling K. Deficiency of DNA ligase activity in Fanconi's anemia. *Hum. Genet*. 45:25-32, 1978.

34) Lambert MW, Tsongalis GJ, Lambert WC, Hang B y Parrish D. Defective DNA endonuclease activities in Fanconi's anemia cells, complementation groups A and B. *Mutat Res*. 273: 57-71, 1992.

35) Hang B, Yeung AT y Lambert MW. A damage-recognition protein which binds to DNA containing interstrand cross-links is absent or defective in Fanconi anemia, complementation group A, cells. *Nucleic Acids Res*. 21:4187, 1993.

36) Defais M, Lesca C, Monserrat B y Hanawalt P. Translesion synthesis is the main component of SOS repair in bacteriophage lambda DNA. *J Bacteriol*. 171: 4938, 1989.

37) Roselli F, Sanceau J, Wietzerbin J y Moustacchi E. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6. *Hum Genet*. 89:42-48, 1992.

38) Rosselli F, Ridet A, Soussi T, Duchaud E, Alapetite C y Moustacchi E. p53-dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. *Oncogen*. 10:9-17, 1995.

39) Zakrzewski S y Sperling K. Genetic heterogeneity of fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum Genet*. 56:81-87, 1980.

40) Duckwoth-Rysiecki G, Cornish K, Clake C y Buchwald M. Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. *Somatic Cell Mol Genet*. 11: 35-41, 1985.

- 41) Gök M y Wunder E. Microinjection of normal cell extracts into Fanconi anemia fibroblast corrects their scheduled DNA synthesis rate after 8-methoxypsoralen plus UVA treatment. *Hum Genet.* 75:350-355, 1987.
- 42) Strathdee CA, Duncan AMV y Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nature Genet.* 1: 196-198, 1992.
- 43) Wegner R-D, Henrichs Y, Joenje H y Schroeder-Kurth T. Fanconi anemia complementation group E: clinical and cytogenetic data of the first patient. *Clin. Genet.* 50: 479-482, 1996.
- 44) Whitney M. y cols. Microcell mediated chromosome transfer maps the Fanconi anaemia group D gene to chromosome 3p. *Nature Genet.* 11:341-343, 1995.
- 45) Pronk J. y cols. Localization of the Fanconi anaemia complementation group A gene to chromosome 16q24.3. *Nature Genet.* 11:338-340, 1995.
- 46) Joenje H, Mathew C y Gluckman E. Fanconi anemia research: current status and prospects. *Europ. J. Cancer.* 3:268-272, 1995.
- 47) Lo Ten Foe J. y cols. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nature Genet.* 14:320-323, 1996.
- 48) The Fanconi anemia/Breast cancer Consortium. Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nature Genet.* 14:324-328, 1996.
- 49) Gibson R y cols. Novel mutations and polymorphisms in the Fanconi anemia group C gene. *Hum. Mutat* 8:140-148, 1996.
- 50) Yamashita T, Wu N, Kupfer G, Corless C, Joenje H, Grompe M y Andrea A. Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood.* 87: 424-4432, 1996.
- 51) Nordenson I, Bjorksten B y Lundh B. Prevention of chromosomal breakage in Fanconi's anemia by cocultivation with normal cells. *Hum Genet.* 56:169-172, 1980.
- 52) Joenje H, Eriksson AW y Frants R. Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in Fanconi's anaemia. *Lancet.* 1:204, 1978.
- 53) Okahata S, Kobayashi y Usui T. Erythrocyte superoxide dismutase activity in Fanconi's anaemia. *Clinical Science.* 58:173-175, 1980.
- 54) Gille JJP, Wortelboer HM y Joenje H. Antioxidant status of Fanconi anemia fibroblasts. *Hum Genet.* 77:28-31, 1987.

- 55) Nagasawa M y Little JB. Suppression of cytotoxic effect of mitomycin-C by superoxide dismutase in Fanconi's anaemia and Dyskeratosis congenita fibroblasts. *Carcinogenesis* 4: 795-798, 1983.
- 56) Porfirio B, Ambroso G, Giannella G, Isacchi G y Dallapiccola B. Partial correction of chromosome instability in Fanconi anemia by desferrioxamine. *Hum Genet.* 83:49-51, 1989.
- 57) Raj AS y Heddle JA. The effect of superoxide dismutase, catalasa and L-cysteine on spontaneous and mitomycin C induced chromosomal breakage in Fanconi's anemia and normal fibroblasts as measured by the micronucleus method. *Mutat.Res.* 78:59-66, 1980.
- 58) Liu J, Auerbach A, Anderson S, Green S y Young N. A trial of recombinant human superoxide dismutase in patients with Fanconi anaemia. *British J. Haematology.* 85:406-408, 1993.
- 59) Schindler D y Hoehne H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J Hum Genet.* 43:429-435, 1988.
- 60) Joenje H y Oostra AB. Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi anaemia. *Hum Genet.* 65:99, 1983.
- 61) Joenje H y Gille JJP. (1989) Oxygen metabolism and chromosomal breakage in Fanconi anemia en Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD y Obe G (Eds) *Fanconi Anemia Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 134.
- 62) Saito H. Hammond AT y Moses RE. Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells. *Mutat Res.* 294: 255, 1993.
- 63) Sabatier L y Dutrillaux B. Effect of caffeine in Fanconi anemia. I. Restoration of a normal duration of G2 phase. *Hum.Genet.* 79: 242-244, 1988.
- 64) Roselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J y Moustacchi E. Abnormal Lymphokine production: A novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor α . *Blood.* 83: 1216-1225, 1994.
- 65) Carnevale A y Frias S. Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la mitomicina C de los linfocitos de anemia de Fanconi. *Rev.Invest.Clin.(Méx).*37: 31-34, 1985.
- 66) Frias S, Carnevale A, Molina A y Del Castillo V. Estudio de heterogenidad genética en anemia de Fanconi por medio de la adición de plasma. *Rev. Invest.Clin. (Méx)* 38: 269-271, 1986.

67) Lenhinger A. (1994) *Bioquímica*. Omega, Barcelona, pp. 887

68) Frias S, Gómez L, Molina B, Rojas E, Ostrosky-Wegman P y Carnevale A. Effect of hydroxyurea and normal plasma on DNA synthesis in lymphocytes from Fanconi anemia patients. *Mutat Res.* 357: 115-121, 1996.

69) Yoshida M.C. Suppression of spontaneous and mitomycin C induced chromosome aberrations in Fanconi's anemia by fusion with normal human fibroblasts. *Hum Genet.* 55: 223-229, 1980.

70) Zakrzewsky S y Sperling K. Antagonistic effect of cocultivation on mitomycin C-induced aberration rate in cells of a patient with Fanconi's anemia and in Chinese hamster ovary cells. *Hum Genet.* 56: 85-88, 1980.

71) Roselli F y Moustacchi E. Cocultivation of Fanconi anemia cells and of mouse lymphoma mutants leads to interspecies complementation of chromosomal hypersensitivity to DNA cross-linking agents. *Hum Genet.* 84: 517-521, 1990.

72) Carnevale A y Frias S. Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la mitomicina C de los linfocitos de anemia de Fanconi. *Rev. Invest. Clin (Méx).* 37: 31-34, 1985.

73) Frias S, Carnevale A, Molina B, y del Castillo V. Estudio de heterogenidad genética en anemia de Fanconi por medio de la adición de plasma. *Rev Invest Clin (Méx).* 38: 269-271, 1986.

74) Moorhead J, Nowell P, Melman W, Battips D y Hungerford D. Chromosomes preparation of leukocytes cultures from peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20: 630, 1960.

75) Deutscher M (1990) *Methods in Enzymology. Guide to protein purification*. San Diego, Academic Press, 889 pp.

76) Claassen E, Kortbeek H y Arwert F. Effects of mitomycin C on the rate of DNA synthesis in normal and Fanconi anaemia cells. *Mutat. Res.* 165: 15-19, 1986.

77) Singh NP, McCoy MT, Tice RR y Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191, 1988.

78) Castilla SL y Cravioto J (1991) *Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud*. México, Ed. Trillas, 350 pp.

79) Frias S, Molina B, Gómez L y Carnevale A. Efecto de la adición de medios condicionados sobre la respuesta de los linfocitos de anemia de Fanconi a la mitomicina C. *Rev. Invest. Clin. (Méx)* 44: 519-524, 1992.

- 80) Dower SK, Smith CA y Park LS. Human cytokine receptors. *J.Clin. Immunology*. 10(6):289-299,1990.
- 81) Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 74(1):1-10, 1989.
- 82) Blattner Ch. Knebel A, Radler-Pohl A, Sachsenmaier Ch, Herrlich P y Rahmsdorf. DNA damaging agents and growth factors induce changes in the program of expressed gene products through common routes. *Env. Molec. Mut.* 24: 3-10, 1994.
- 83) Shultz J y Shahidi N. Tumor necrosis factor α overproduction in Fanconi anemia. *Am. J. Hematol.* 42: 196-201, 1993.
- 84) Pincheira J y Bravo M. Fanconi's anemia lymphocytes: Effect of caffeine, adenosine y niacinamide during G2 prophase. *Mutat Res.* 199: 159-165, 1988.
- 85) Sato M, Sasaki M y Hojo H. Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor α and interleukin-6. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 738-744, 1995.
- 86) Kruyt F, Dijkmans L, Van den Berg T y Joenje H. Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood*. 87 : 938-948, 1996.