



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**EFFECTO DE MITOMICINA C SOBRE EL ÍNDICE
MITÓTICO Y EL ÍNDICE DE REPLICACIÓN
EN CÉLULAS DE ANEMIA DE FANCONI A**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA

BENILDE GARCÍA DE TERESA

TUTOR DE TESIS

DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ



MÉXICO DF

2010

**EFFECTO DE MITOMICINA C SOBRE EL ÍNDICE MITÓTICO
Y EL ÍNDICE DE REPLICACIÓN EN CÉLULAS DE ANEMIA
DE FANCONI A**



DR. JOSÉ N. REYNÉS MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DRA. MIRELLA VÁZQUEZ RIVERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA



DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
TUTOR DE TESIS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría y recibió financiamiento parcial de CONACYT-SEP 84259.

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del Laboratorio de Citogenética del INP por su hospitalidad, y su disponibilidad para aclarar dudas metodológicas y comentar resultados. En particular a Bertha Molina, Sandra Ramos, Luz Velasco, Silvia Sánchez, Laura Gómez y Emiy Yokoyama.

A Alfredo Rodríguez por las desmañadas, las trasnochadas, los encuentros y los desencuentros pero sobre todo porque sin él esta tesis no hubiera sucedido.

A Sara Frías por agarrarme bajo su ala y tomar el riesgo (sin fallar en el intento) de dirigir a un médico en una tesis tan experimental. Para mí fue un verdadero placer.

A la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman, a la Dra. Ana María Salazar y a la QFB Monserrat Sordo por acogerme en su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y compartir conmigo sus conocimientos y experiencia para montar e interpretar los experimentos de índices nucleares.

A la Dra. Ruth Fuentes García del Departamento de Matemáticas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por su ayuda a la hora de darle sentido a los números.

A mis compañeros de residencia: Astrid y Berna; Mariana y Paola; Alma, David, Karla y Rosa; Liliana, Vianney y Ximena por ser mis cómplices.

A todos mis maestros de la especialidad por su entusiasmo al compartir y transmitir su conocimiento.

A los miembros del Laboratorio de Biología Molecular del INP por su paciente espera mientras concluía este trabajo.

A Astrid, Berna y Marcos que escribieron su tesis al mismo tiempo que yo.

A RHF por incondicional y por su capacidad para sonsacarme.

A mis papás, que me dieron la enorme responsabilidad de poder hacer lo que se me pega la gana.

A AGK quien además de hacer una lectura rigurosa del sujeto-verbo-complemento, lo disfrutó.

Contenido

A. INTRODUCCIÓN	1
I. ASPECTOS CLÍNICOS.....	1
1) <i>Datos históricos</i>	1
2) <i>Epidemiología</i>	2
3) <i>Características clínicas</i>	3
4) <i>Diagnóstico</i>	7
5) <i>Tratamiento</i>	10
II. TIPOS DE HERENCIA.....	12
III. CARACTERÍSTICAS A NIVEL CELULAR	13
1) <i>Citogenética</i>	14
2) <i>Hipersensibilidad a agentes alquilantes</i>	16
3) <i>Alteraciones en el ciclo celular</i>	18
4) <i>Hipersensibilidad al oxígeno</i>	19
IV. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES.....	20
1) <i>Genes</i>	21
2) <i>Enlaces covalentes cruzados y su reparación por la vía AF/BRCA</i>	30
3) <i>Regulación de la vía AF/BRCA</i>	39
V. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	43
B. ANTECEDENTES DIRECTOS	45
C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	50
D. DISEÑO DEL ESTUDIO	51
E. OBJETIVOS	51
I. GENERAL.....	51
II. ESPECÍFICOS	51
F. HIPÓTESIS	52
G. JUSTIFICACIÓN	52
H. MATERIALES Y MÉTODOS	53
I. MATERIALES.....	53
II. MÉTODOS.....	54
1) <i>Diseño Experimental</i>	54
2) <i>Preparación para Índice Mitótico</i>	55
3) <i>Preparación para Índice Nuclear</i>	57
I. RESULTADOS	59
I. ANÁLISIS DESCRIPTIVO	63
1) <i>Índice Mitótico</i>	63
2) <i>Índice Nuclear</i>	64
3) <i>Cantidad de células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas</i>	65
II. ANÁLISIS COMPARATIVO.....	66
1) <i>Diferencias dentro de la misma línea celular</i>	67
2) <i>Diferencias entre las líneas celulares</i>	71
J. DISCUSIÓN	86
I. REVISIÓN DE LOS ANTECEDENTES DIRECTOS.....	87
II. COMPARACIONES DENTRO DE LA MISMA LÍNEA CELULAR	89
III. COMPARACIONES ENTRE LÍNEAS CELULARES	90
1) <i>Experimentos sin tratamiento</i>	90
2) <i>Experimentos con tratamiento con Mitomicina C</i>	95
K. CONCLUSIONES	100
L. ANEXO DE RESULTADOS	102
M. BIBLIOGRAFÍA	104

A. INTRODUCCIÓN

I. ASPECTOS CLÍNICOS

1) Datos históricos

La anemia de Fanconi es una enfermedad rara, de origen genético, que tiene como características clínicas falla en la hematopoyesis, malformaciones congénitas y predisposición a desarrollar ciertos tipos de leucemia y tumores sólidos.

Esta enfermedad fue identificada en 1927 por el pediatra suizo Guido Fanconi, quien describió una familia en la que tres individuos presentaban varias anormalidades físicas (microcefalia, hiperpigmentación de la piel, hipoplasia testicular e hiperreflexia) y un cuadro similar a la anemia perniciosa: anemia macrocítica, hemólisis y niveles séricos bajos de vitamina B12. La descripción de casos similares permitió detectar que la alteración hematológica afectaba a todas las líneas celulares de la médula ósea (pancitopenia) y no sólo a los eritrocitos, así como que la falla medular era la principal causa de muerte de estos pacientes. Fanconi supuso que todas estas manifestaciones estaban dadas por una etiología común y propuso que se trataba de una translocación cromosómica.

En la búsqueda de esta translocación entre 1964 y 1965, distintos grupos científicos notaron que los pacientes con anemia de Fanconi presentaban inestabilidad cromosómica espontánea, y que ésta también podía ser inducida por sustancias que producen aductos en el ADN (Lobitz and Velleur 2006). Aunque nunca se identificó la translocación augurada por Fanconi, más tarde se descubrió que se trataba de una enfermedad monogénica con heterogeneidad de locus.

2) Epidemiología

Se ha reportado una prevalencia de AF que va de 1 a 5 afectados por millón y se estima que la frecuencia de portadores es de 1/300 en Europa y Estados Unidos. Algunos grupos poblacionales presentan mayor prevalencia de la enfermedad debido a mutaciones fundadoras. Ejemplos de esto son las altas frecuencias de portadores que se observan en grupos como los judíos Asquenazí (1/89), los Afrikaans (1/83), o los gitanos españoles (1/70) (Tishkowitz and Hodgson 2003) (Tamary and Alter 2007) (Callén, Casado, et al. 2005)

3) Características clínicas.

a) Hematología

La anemia de Fanconi pertenece a un grupo de enfermedades conocido como síndromes de falla medular. Estos, representan de 10 a 20 por ciento de los pacientes con falla de la médula ósea por causa constitucional o heredada. Las principales causas de morbi-mortalidad están relacionadas con alteraciones hematológicas como anemia aplásica (AA), síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mieloide aguda (LAM).

La característica hematológica primordial que presentan estos pacientes es la anemia aplásica, la cual se observa en más de 90 por ciento de los afectados (Dokal 2006). Al nacimiento y durante los primeros años de vida, en general, no se detectan alteraciones hematológicas. La pancitopenia se desarrolla entre los 5 y 10 años de edad con un promedio de inicio a los 7 años. Habitualmente, la primera manifestación es macrocitosis, seguida de trombocitopenia y neutropenia (Dokal 2006). Clínicamente, los pacientes presentan palidez, sangrado e infecciones de repetición. El SMD se presenta en cerca de 7 por ciento de los pacientes con AF. En éstos, las células precursoras de la médula ósea no se diferencian correctamente, teniendo como consecuencia una pobre cantidad de células maduras en el torrente sanguíneo. Se ha demostrado que el desarrollo del SMD en pacientes con AF afecta

negativamente su esperanza de vida. Asimismo, llama la atención que la progresión del SMD hacia leucemia en pacientes con AF es menos frecuente que en pacientes sin este padecimiento, lo que sugiere un curso clínico diferente del SMD en los pacientes con AF (Neveling, Kalb and Schindler 2007).

b) Neoplasias

La AF también se considera un síndrome de predisposición a cáncer. Llama la atención que los pacientes con AF desarrollan neoplasias a edades tempranas, generalmente en la adolescencia, aunque pueden ocurrir desde la infancia. La neoplasia más frecuente en estos pacientes es la leucemia, su incidencia acumulada es de 37 por ciento y la edad media de inicio es de 14 años. Es importante resaltar que, contrariamente al resto de los pacientes, la leucemia mieloide aguda (LMA) se presenta en 94 por ciento de los pacientes con AF, mientras que la leucemia linfoblástica aguda (LLA) sólo se observa en 6 por ciento. El resto de las neoplasias hematológicas son raras.

Se ha visto que el riesgo de desarrollar un tumor sólido es 50 veces mayor para pacientes con AF que para la población general. La edad promedio en que se presentan es de 16 años. Los tumores sólidos más frecuentes son los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y del

tracto genital femenino. Para este tipo de tumores, el riesgo de desarrollarlos es 700 veces mayor que para la población general. La evidencia que existe sobre el papel de la infección por virus del papiloma humano (VPH) en estas neoplasias es poco concluyente, a diferencia de lo que se ha demostrado acerca de la participación de este virus en el desarrollo de neoplasias en pacientes sin AF.

Otra neoplasia frecuente en los pacientes con AF son los tumores hepáticos, con una incidencia acumulada de 46 por ciento a los 50 años y una edad de aparición promedio de 13 años. Se distinguen dos tipos de tumores hepáticos: la mayoría son adenomas benignos y raramente se presentan hepatocarcinomas. El desarrollo de ambos tipos de tumor está asociado al uso de andrógenos como parte del tratamiento para la anemia aplásica.

Además de los antes descritos, se ha reportado una vasta gama de neoplasias que incluye tumores renales y del sistema nervioso central, carcinoma de mama, carcinoma de células basales, neuroblastoma, tumores desmoides, gonadoblastoma, melanoma y sarcoma osteogénico (Neveling, Kalb and Schindler 2007).

c) Malformaciones

Una amplia variedad de malformaciones congénitas pueden presentarse hasta en 70 por ciento de los pacientes con AF. Las malformaciones más frecuentes son las que afectan al sistema esquelético, en particular los defectos radiales. También pueden afectarse otros aparatos o sistemas como el genitourinario, el gastrointestinal y el sistema nervioso. A continuación se presenta una tabla de las frecuencias de las malformaciones en pacientes con AF según lo descrito por Dokal (Dokal 2006).

Tabla 1. Frecuencia de malformaciones en pacientes con AF

Alteración	Frecuencia (%)
Esquelético (radial, cadera, escoliosis, costilla)	71
Pigmentación de la piel (manchas café c/leche, hipo, hiper)	64
Talla baja	63
Oftalmológico (microftalmia)	38
Tracto urinario y renal (aplasia renal, riñón en herradura)	34
Genitales masculinos (criptorquidia, hipospadias)	20
Retraso mental	16
Gastrointestinal (malformación ano-rectal, atresia duodenal)	14
Cardiológico (PCA, CIV, atresia pulmonar, coartación ao.)	13
Audición	11
Sistema nervioso central (hidrocefalia, septum pellucidum)	8
Sin malformaciones	30

d) Endocrinología

Como lo muestra la Tabla 1, cerca de dos terceras partes de los afectados presentan talla baja. En general, los pacientes con AF tienen parámetros somatométricos que se encuentran cerca de la porcentila cinco.

Además de la alteración del crecimiento prenatal y postnatal característica de este padecimiento, la concurrencia de ciertas endocrinopatías agravan la alteración en el crecimiento. Las manifestaciones endocrinológicas más frecuentes en estos pacientes son alteraciones en la homeostasis de la glucosa/insulina, insuficiencia de hormona de crecimiento e hipotiroidismo y, recientemente, también se han descrito osteopenia/osteoporosis y anomalías de los lípidos. De la misma forma, se ha observado que la infertilidad es una condición frecuente en los pacientes con AF. Si bien casi la totalidad de los hombres son infértiles debido a malformaciones del tracto genitourinario e hipoplasia testicular, casi la mitad de las pacientes femeninas son fértiles, aunque la gestación favorece numerosas complicaciones, como falla medular y preeclampsia (Auerbach 2009).

4) Diagnóstico

Ante la sospecha de AF por presencia de alteraciones hematológicas, malformaciones características, neoplasias específicas a edad temprana o antecedentes familiares, el médico debe confirmar el diagnóstico.

Se han desarrollado numerosos métodos para hacer el diagnóstico de Anemia de Fanconi. Todos encuentran su fundamento en evidenciar alguna

de las características celulares de estos pacientes, las cuales serán tratadas en detalle más adelante.

La característica celular que con mayor frecuencia se utiliza como prueba diagnóstica es la fragilidad cromosómica que se exagera al exponer a las células a agentes que producen aductos en el ADN. Los fármacos que con mayor frecuencia se utilizan son diepoxibutano (DEB) y mitomicina C (MMC). Históricamente, también se han utilizado mostaza nitrogenada y ácido isonicotínico hidrazido (INH). La hipersensibilidad a agentes alquilantes puede manifestarse por rupturas cromosómicas que pueden observarse directamente en las metafases al microscopio, o bien por ensayos de co-cultivo con células normales donde se evidencia una disminución drástica en el número de mitosis esperadas cuando el cultivo se expone a MMC (German, et al. 1987).

La otra característica que es utilizada comúnmente para hacer el diagnóstico de AF, es la alteración en la duración de la fase G2/M del ciclo celular. La citometría de flujo permite identificar a pacientes con AF al mostrar que sus células tienen una fase G2/M prolongada (Moreira, Brito-Junior and Lemor 2008).

Ante el reconocimiento de que la respuesta a agentes alquilantes de las células AF no es exclusiva —debido a que otros síndromes de inestabilidad cromosómica pueden presentarlas— algunos investigadores se han dado a la tarea de diseñar nuevas estrategias de diagnóstico. Recientemente, Leskovac *et al.*, describieron el uso de citometría de flujo para medir la cinética de reparación de rupturas de doble cadena (DSB por sus siglas en inglés) provocadas por radiación ionizante. Las células AF reparan las DSB más lentamente que las células normales y las células de otros síndromes de inestabilidad cromosómica, haciendo de la aplicación de esta metodología confiable, rápida y específica para el diagnóstico de AF (Leskovac, et al. 2010).

Todas las metodologías mencionadas se basan en características del fenotipo celular y son únicamente un reflejo del genotipo de los pacientes. Por lo tanto, de ser posible, la determinación del grupo de complementación así como la caracterización de las mutaciones en el paciente también debe realizarse. Para algunos casos, esta información puede relacionarse con el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, es necesario considerar que esto puede resultar una labor difícil, debido a la heterogeneidad genética de este padecimiento, tanto de locus como alélica (Auerbach 2009).

Es importante resaltar que si bien todas las células AF presentan hipersensibilidad a agentes alquilantes, ésta no es una característica exclusiva de esta entidad. Otras patologías para las que esto se ha reportado son el síndrome de Seckel, el síndrome de Cornelia de Lange y el síndrome de Nijmegen. Las primeras dos presentan fenotipos clínicos suficientemente distintos a AF lo que permite hacer un diagnóstico diferencial. En cuanto al último, la distinción se basa en la hipersensibilidad a radiación ionizante que presentan las células de pacientes AF de manera concomitante (Neveling, Endt, et al. 2009).

5) Tratamiento

Desafortunadamente, hasta la fecha no existe ningún procedimiento que permita corregir efectiva y definitivamente el defecto genético que causa la AF. Por ello, los tratamientos que se utilizan hoy en día tienen como propósito evitar las manifestaciones que conducen a la muerte de los pacientes.

Tradicionalmente, para mejorar la pancitopenia, se ha utilizado la transfusión de derivados hematológicos. Por otro lado, con el fin de estimular directamente la hematopoyesis, está indicado utilizar andrógenos, en combinación o no con corticoesteroides, siempre y cuando todavía exista algo

de función hematopoyética autóloga. Cerca de tres cuartas partes de los pacientes responden al tratamiento con andrógenos, además de que se ha observado una mejor sobrevida en pacientes que reciben este tratamiento. Como todos los regímenes terapéuticos, éste se acompaña de una vasta gama de efectos secundarios que pueden ir desde masculinización hasta carcinomas hepatocelulares.

Hasta ahora, el único tratamiento que puede reinstaurar la hematopoyesis a largo plazo es el trasplante de células troncales hematopoyéticas. Es por esto que, el tratamiento de elección más usual en la actualidad es el trasplante alogénico de médula ósea, preferentemente de un donador relacionado no afectado y antes de que la falla medular sea dependiente de transfusiones. La aparición persistente de clonas con alteraciones de los cromosomas 1, 3 y 7, así como el diagnóstico de SMD o LAM también son criterios para realizar el trasplante. Debe tenerse en mente que los fármacos utilizados comúnmente para el condicionamiento previo al trasplante suelen generar lesiones en el ADN que pudieran inducir segundas neoplasias en estos pacientes. Sin embargo, la falta de condicionamiento puede resultar en una grave complicación de enfermedad de injerto contra huésped. Por estas razones, existen varios grupos diseñando esquemas de

tratamiento que excluyan este tipo de fármacos (Green and Kupfer 2009) (Eyrick, Winkler and Schlegel 2007).

Desde la década de los noventa, se iniciaron programas de terapia génica para pacientes con AF. Desafortunadamente, los resultados no han sido muy alentadores. Se registró una baja eficiencia en la transfección de las células blanco, debido tanto a la escasez de células troncales como a los vectores virales utilizados. Por esta razón, ninguno de los pacientes sometidos a este tratamiento recuperó la función hematopoyética a largo plazo. Actualmente se están haciendo esfuerzos por mejorar los vectores virales. Otra estrategia novedosa que está siendo probada es la inhibición de citocinas proinflamatorias con el afán de limitar el efecto apoptótico que tienen sobre las células de la médula ósea (Dufour and Svahn 2008).

II. TIPOS DE HERENCIA

Hasta la fecha, se han identificado 13 grupos de complementación (A-N), que corresponden a defectos en 13 genes diferentes, cuyos productos están involucrados en una misma vía de respuesta a daño al ADN: la vía AF/BRCA. Esta vía participa en la reparación de DSB provocadas por agentes que causan aductos en la doble hélice. En la mayoría de los individuos con AF, se han identificado mutaciones en estado homocigoto en estos genes, lo que

corresponde a un patrón de herencia autosómico recesivo, a excepción de los pacientes que pertenecen al grupo de complementación B en quienes se ha identificado un patrón de herencia ligado al X causado por mutaciones en FANCB (Xp22.31).

La distribución de los pacientes en estos 13 grupos es desigual. Se han descrito mutaciones en el gen FANCA (16q24.3) en 65 por ciento de los afectados, mutaciones en FANCC (9q22.3) en 15 por ciento y mutaciones de FANCG (9p13) y FANCE (6p21.3) en 10 y 5 por ciento de los afectados respectivamente. El resto de los pacientes se distribuye entre los 8 grupos de complementación restantes y su incidencia se considera rara (Tamary and Alter 2007). Existen algunos pacientes con diagnóstico confirmado de AF a los que no ha sido posible asociar a alguno de los grupos de complementación conocidos. Se supone que estos pacientes portan mutaciones en otros genes de la vía AF que aún no han sido identificados.

III. CARACTERÍSTICAS A NIVEL CELULAR

Una de las características de los pacientes con AF es que presentan expresividad variable en su fenotipo clínico. Las manifestaciones de los pacientes son tan diversas que pueden ir desde el individuo de aspecto normal hasta el cuadro florido que involucra todas las manifestaciones descritas

previamente. Esto también es reflejo de la variabilidad genética extrema de esta patología.

Contrariamente a lo que ocurre clínica y molecularmente, el fenotipo de las células AF es extremadamente constante. A tal punto, que es la base de muchas de las pruebas diagnósticas descritas hasta ahora. En esta sección se describirán las características más prominentes del fenotipo celular AF.

1) Citogenética

a) Rupturas cromosómicas

Casi 40 años después de la primera descripción clínica del Dr. Fanconi, se identificó la primera característica de las células de estos pacientes: las rupturas cromosómicas espontáneas. Este hallazgo y su confirmación datan de 1964 y 1965 y sus reportes describen principalmente aberraciones cromosómicas de tipo cromatídico y en particular figuras cromosómicas conocidas como figuras radiadas (Digweed, Hoehn and Sperling 2007).

Dichas lesiones son la consecuencia microscópicamente visible de la reparación incorrecta de DSB que ocurren durante la fase S. Las rupturas representan intermediarios de la reparación de enlaces covalentes cruzados (ICL por sus siglas en inglés) que se encuentra comprometida. Los puntos de ruptura ocurren exclusivamente en cromosomas no homólogos y se

distribuyen en toda su extensión. Existen algunas regiones que parecen ser más susceptibles de participar en las figuras radiadas, ya sea por su estructura cromatínica (sitios frágiles) o por la presencia de alguna secuencia específica (secuencias cortas de homología dispersas) que lo favorezcan. (Hanlon Newell, et al. 2004)

b) Acortamiento telomérico

La estructura cromosómica de las células AF también afecta a los telómeros; en estos casos se ha documentado acortamiento. No hay consenso que explique el porqué de este hallazgo, y se han sugerido varias explicaciones, como el acortamiento intrínseco que sufren los telómeros en el proceso de la replicación y un exceso de ruptura de estas estructuras.

Sin embargo, la conocida correlación entre alteraciones hematopoyéticas y acortamiento telomérico, sugiere que este último puede ser el reflejo del fenotipo de envejecimiento prematuro de estas células, que conduce a la pérdida precoz de las células madres hematopoyéticas y la subsecuente falla medular (Callén and Surrallés 2004).

c) Aberraciones en Médula Ósea

Otra característica citogenética de extrema importancia, debido a su aplicación clínica, es el desarrollo de aberraciones cromosómicas clonales en

la médula ósea. Las aberraciones adquiridas que ocurren con mayor frecuencia son, entre otras, la ganancia de material del brazo largo del cromosoma 3, la pérdida del brazo largo del cromosoma 7 o la pérdida completa del mismo cromosoma, y ganancias de material del brazo largo del cromosoma 1. La evidencia sugiere que cualquier alteración cromosómica en la médula ósea es una señal de alarma ya que puede indicar el desarrollo de síndrome mielodisplásico o progresión a leucemia aguda mieloblástica, en particular cuando las anormalidades implican material de los cromosomas 3 y 7. La presencia de clonas anormales en la médula ósea ha demostrado ser un factor pronóstico en el desarrollo de malignidad hematológica, por lo que la evaluación sistemática de este tejido en pacientes con AF es esencial para su adecuado seguimiento y manejo (Neitzel, et al. 2007).

2) Hipersensibilidad a agentes alquilantes

Tuvieron que pasar casi 10 años más para que Sasaki y Tonomura hicieran el siguiente descubrimiento sobre el fenotipo celular de AF: la hipersensibilidad a agentes alquilantes.

En su artículo de 1973, los autores reportaron una susceptibilidad anormal de las células AF que se manifestaba por rupturas cromosómicas cuando se les exponía a agentes alquilantes bifuncionales. A su vez, descartaron una

respuesta anormal de estas células a radiación gamma y desecharon la idea de que su inestabilidad cromosómica pudiera ser secundaria a una deficiencia de ATP. Los autores también conjeturaron que la hipersensibilidad a agentes alquilantes que se observa en las células AF se debe a un mal funcionamiento en el sistema que permite la reparación de los ICL (Sasaki and Tonomura 1973). La confirmación de esta conjetura sólo fue cuestión de tiempo (Niedernhofer, Lalai and Hoejmakers 2005).

Este descubrimiento constituye el fundamento detrás de las pruebas de diagnóstico para AF que se basan en la determinación tanto cualitativa como cuantitativa de la sensibilidad a ICL. Como se describió en la sección A-I-4, se consideran resultados compatibles con el diagnóstico de AF, la disminución de la supervivencia celular, la identificación de rupturas cromosómicas y la acumulación de células en las fase G2 del ciclo, después de la exposición al agente alquilante de elección (DEB, MMC, cisplatino, etc.). Se ha reportado que la exposición de las células AF a agentes alquilantes bifuncionales generan de 33 a 100 veces más aberraciones cromatídicas que las que se producen en células normales expuestas a las mismas condiciones (Niedernhofer, Lalai and Hoejmakers 2005) (Sasaki and Tonomura 1973).

3) Alteraciones en el ciclo celular

Algunas de las características clínicas de los pacientes con AF, como el retraso en el crecimiento y la falla medular pueden explicarse por un defecto en la proliferación celular. Es por esto que el estudio del ciclo celular se perfiló como una vía interesante en busca de respuestas sobre el origen del fenotipo AF. El estudio de su ciclo celular permitió identificar que estas células tienen un ciclo lento. Estudios en los que se utilizaron técnicas de incorporación con bromodeoxiuridina (BrdU), hicieron posible acotar las fases del ciclo celular en donde se origina el retardo. Así, se identificó que la fase G2/M de los linfocitos AF de sangre periférica, tiene una duración de aproximadamente el doble que el de las células control (Dutrillaux, et al. 1982). Estudios más recientes han permitido definir con mayor precisión que la alteración del ciclo celular de las células AF es el resultado de la combinación del retraso y el arresto de las fases S y G2, con un predominio de la alteración en el compartimento G2. También se ha podido demostrar que esta alteración afecta sucesivamente los ciclos celulares, y no está limitada a sólo uno (Schindler, et al. 2007). La exposición a agentes alquilantes exalta esta alteración del ciclo.

En un intento por explicar la secuencia de eventos que llevan a este arresto, Sala-Trepat *et al.* indujeron ICL en células AF de forma regulada y

observaron que mantenían la capacidad de sintetizar ADN a pesar de la presencia de ICL, al escapar al punto de monitoreo de S. De esta forma concluyeron que la acumulación de células AF en G2/M es secundaria a la presencia de ICL durante la fase S. Parecería que esta alteración del ciclo celular es reflejo del mal funcionamiento del punto de monitoreo de S que permite la progresión del ciclo a pesar del daño genómico. El alargamiento de la fase G2 es necesario para que este daño sea reparado antes de proseguir a fase M (Sala-Trepat, et al. 2000). Esto fue confirmado por el incremento de aberraciones cromosómicas que se observa en células AF después de ser tratadas con cafeína, un inhibidor del punto de monitoreo G2/M, que permite la progresión en el ciclo de células que tienen un extenso daño cromosómico (Seyschab, et al. 1994).

4) Hipersensibilidad al oxígeno

Se considera que el fenotipo clínico y celular de las células AF está principalmente causado por el defecto del sistema de reparación de ICL. Sin embargo, existe otra característica de estas células que podría estar involucrada. Pagano *et al.* sugieren que algunas de las manifestaciones tanto clínicas como celulares de los pacientes con AF podrían ser secundarias a daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS). Ejemplo de esto son

las asociaciones, ampliamente sustentadas por la literatura, entre la toxicidad por ROS y la falla medular, el cáncer y la diabetes mellitus tipo 2. La evidencia experimental de la que se dispone aún no es suficiente para sostener firmemente esta hipótesis (Pagano, et al. 2005). Sin embargo, desde la década de los ochenta Joenje *et al.* descubrieron que la tasa de rupturas cromosómicas espontáneas de linfocitos T en AF variaba en función de la tensión de oxígeno a la que se cultivaban. Observaron que si los cultivos de células AF se llevaban a cabo en condiciones hipóxicas (5% v/v), el crecimiento celular mejoraba y era comparable con el de células normales. Esta mejoría resultó, en parte, de una menor cantidad de células detenidas en G2 (Joenje, et al. 1981). Estudios recientes apoyan la probable participación de algunos genes AF en el metabolismo oxidativo y la regulación de funciones celulares oxígeno-dependientes (Neveling, Endt, et al. 2009).

IV. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

Como se mencionó previamente, el fenotipo AF es el resultado de alteraciones en la función de los genes involucrados en la vía de reparación AF/BRCA. En esta sección se describirán en un inicio las características de los genes que codifican para los productos proteicos que forman parte de esta vía. Posteriormente se explicará la forma en que ésta lleva a cabo su función y

finalmente se hablará de los mecanismos que se encargan de regular su actividad.

1) Genes

a) FANC

Al día de hoy se han descrito 13 genes FANC que se encuentran dispersos en el genoma y varían considerablemente en tamaño y estructura. De estos genes, hay cuatro que tienen un origen antiguo y están altamente conservados. FANCM y FANCI comparten estructura con otras proteínas, mientras que FANCD2 y FANCL tienen homólogos en otros organismos. El resto de los genes FANC tienen un origen más reciente y no se ha identificado ni homología significativa ni dominios funcionales con respecto a otras proteínas (Kalb, et al. 2007).

En la Tabla 2 se presentan las características de los 13 genes FANC, y sus respectivas proteínas (Green and Kupfer 2009) (Taniguchi and D'Andrea 2006) (Kalb, et al. 2007).

Tabla 2. Características de genes y proteínas FANC

Gen	Locus	Pb	kDa	Motivos Proteicos Conocidos	Función
FANCA	16q24.3	79107	163	NLS, NES, zipper de leucina parcial	Complejo Central
FANCB/ FAAP 95	Xp22.3	29656	95	NLS	Complejo Central
FANCC	9q22.3	218656	63	Ninguno	Complejo Central
FANCD1/ BRCA2	13q12.3	84193	384	Unión a RAD 51, DSS1, ssDNA NLS	Reclutamiento de RAD51, mediador de la RH
FANCD2	3p25.3	75502	155, 162	Ninguno	Forma un complejo con FANCI, es Ub
FANCE	6p21	14724	58	Ninguno	Complejo Central
FANCF	11p15	3309	42	Homología a ROM	Complejo Central
FANCG/ XRCC9	9p13	6179	68	Repetido tetratriopeptido	Complejo Central
FANCI	15q26	73169	140, 147	NLS, repetidos ARM, motivo EDGE Dominio zipper de leucina	Forma un complejo con FANCD2, es Ub
FANCI/BRIP1/BACH1	17q22	180771	140	DEAH-helicasa Unión a BRCA1	5'→3' DNA helicasa/ ATPasa
FANCL/PHF9	2p16.1	82138	43	Repetidos WD40 Dedo PHD	Complejo Central Ubiquitin ligasa
FANCM/Hef	14q21.3	64958	250	DNA translocasa Helicasa/endonuc	Helicasa. Localiza al complejo Central al ADN
FANCN/PALB2	16p12	38196	131	Repetidos WD40 like C terminal	Interactúa con FANCD1 en foci

NLS: señal de localización nuclear, NES: secuencia de exportación nuclear, RH: recombinación homóloga, Ub: ubiquitinizado

Hay evidencia de que las mutaciones en estos genes no se distribuyen al azar. Se ha observado que sus alteraciones dependen principalmente de la estructura misma del gen: los elementos repetitivos y su composición de bases lo hacen más susceptible de sufrir alguna variación. Por otra parte, se ha visto que el tamaño del gen no es un factor que influya en la posibilidad de mutación. Así, se ha documentado que genes pequeños como FANCG (6179 pb) pueden tener un gran número de mutaciones y estar presentes en 10 por ciento de los afectados, mientras que genes grandes como FANCM (64958 pb)

tienen un número de mutaciones muy reducido. Se ha especulado que los genes más recientes serían más tolerantes a las mutaciones, aunque no está claro si esto es a consecuencia de su función o de su estructura. La mayoría de las mutaciones de los genes FANC son mutaciones privadas, sin embargo existen algunas que se repiten dentro de un mismo grupo poblacional y han demostrado ser por efecto de fundador, mientras que otras se repiten sin respetar el origen poblacional por lo que se ha propuesto que se trata de mutaciones que ocurren en regiones cuya estructura las favorece (Kalb, et al. 2007).

El gen FANCA es el que se afecta más frecuentemente en los pacientes con AF. Hay una gran heterogeneidad en el tipo de mutaciones que sufre este gen. Las sustituciones son las más frecuentes y representan poco menos de la mitad. La estructura del gen, rica en repetidos Alu, hace que las deleciones sean el segundo tipo de mutación más frecuente con 32 por ciento de los casos. Asimismo, se han reportado inserciones y duplicaciones, en particular en regiones con repetidos directos y trectos de trinucleótidos que pueden favorecer este tipo de rearrreglos. FANCA es el gen para el que más mutaciones fundadoras se han descrito, entre otras, las transiciones c.295C>T en gitanos españoles y la c.790C>T en italianos de la región de Campania, así

como la delección de los exones 12 a 31 descrita en pacientes Afrikaans (Kalb, et al. 2007).

El gen FANCB/FAAP95 es el único que se encuentra en el cromosoma X. Únicamente se han descrito 5 mutaciones: una delección en la región 5'UTR y la región promotora, 3 microdelecciones/inserciones y una mutación que afecta el sitio de splicing. En estudios funcionales, se ha reportado que las mujeres portadoras inactivan de manera preferencial el X mutado (Kalb, et al. 2007).

El gen FANCC se encuentra mutado en 10 a 15 por ciento de los pacientes con AF. Se ha descrito una heterogeneidad alélica importante, aunque las mutaciones parecen concentrarse en la región que codifica para el extremo C-terminal de la proteína. Sin embargo, en pacientes de origen judío Askenazi se ha observado que la mutación c.456+4 A>T es la más frecuente, encontrándose en más de 80 por ciento de los pacientes de este grupo, la frecuencia de portadores ha sido estimada en menos de 1/100 (Kutler and Auerbach 2004).

El gen FANCD1/BRCA2 codifica para la proteína FANC más grande. Se han descrito mutaciones en toda la extensión del gen, pero se ha observado en todos los pacientes con mutaciones en este gen que al menos una de las dos

mutaciones es hipomórfica y conserva un dominio BRC funcional (Kalb, et al. 2007).

Al igual que FANCD1, en el gen FANCD2, todos los pacientes conservan algún grado de función residual. Las mutaciones se distribuyen al azar en todo el gen y la mitad de las mutaciones se encuentran en sitios de splicing (Kalb, et al. 2007).

Únicamente se han descrito 3 familias con mutaciones en FANCE, que es uno de los grupos de complementación con menor representación entre los pacientes con AF (Kalb, et al. 2007).

FANCF es el gen más pequeño y tiene únicamente un exón. Al día de hoy se han descrito 5 mutaciones sin sentido y microdeleciones que se concentran en la porción 5' del gen. Una característica interesante de este gen es el silenciamiento epigenético por metilación de su promotor que se ha descrito en varios tipos de tumores (Kalb, et al. 2007).

Las mutaciones de FANCG/XRCC9 están presentes en 10 por ciento de los pacientes con AF. Se han visto todos los tipos de mutaciones excepto deleciones. Estas se encuentran dispersas a lo largo del gen aunque se concentran en las regiones N- y C-terminal. En la población negra de Sud

África, Suazilandia, Mozambique y Malawi se ha observado la delección c.637_643delTACCGCC en más de 80 por ciento de los pacientes con AF (Kalb, et al. 2007).

El gen FANCI se identificó en 2007 al estudiar, por análisis de ligamiento, selección de regiones candidatas y confirmación de éstas por secuenciación, a 8 pacientes pertenecientes al grupo de complementación I. Se describieron nueve mutaciones puntuales y una delección. Cuatro pacientes fueron homocigotos, de estos dos provienen de matrimonios consanguíneos. El resto fueron heterocigotos compuestos (Dorsman, et al. 2007).

El gen FANCI/BRIP1/BACH1 es uno de los genes FANCI más grandes. Únicamente se han descrito 8 mutaciones diferentes. De éstas, la más prevalente es la c.2392C>T (R798X). Puesto que se ha observado en grupos étnicos diferentes y se ha corroborado su origen diverso por análisis de haplotipos, se ha determinado que esta mutación es favorecida por la estructura genómica y ocurre en un “hotspot” (Kalb, et al. 2007).

El gen FANCL/PHF9 codifica para la subunidad catalítica del complejo central. Sólo se ha descrito un paciente perteneciente a este grupo en quien se identificó una inserción de 177 pb en una secuencia rica en pirimidinas entre los exones 10 y 11 que condiciona pérdida del exón 11 (Kalb, et al. 2007).

Igualmente, sólo se ha reportado un paciente para el grupo de complementación M. Se identificaron las dos mutaciones en FANCM/Hef de este heterocigoto compuesto: una mutación sin sentido en el exón 13 en el alelo materno y una deleción en el exón 15 en el alelo paterno (Kalb, et al. 2007).

En 2007, se identificó el gen FANCN/PALB2 en 7 familias. Las mutaciones bialélicas que se describieron son mutaciones puntuales que conducen a proteínas truncas con pérdida de función (Reid, et al. 2007).

b) FAAP

Además de los 13 genes FANC, existen genes que codifican para proteínas asociadas a AF (FAAP por sus siglas en inglés) para los cuales se ha demostrado en modelos celulares experimentales que al comprometer su función las células muestran un fenotipo característico de AF. Sin embargo, no se les reconoce como grupo de complementación como tal ya que, hasta el momento, no se ha identificado ningún paciente que tenga mutaciones en estos genes. Ejemplos de esto son los genes que codifican para las proteínas FAAP24 y FAAP100.

FAAP24 es una proteína que forma un heterodimero estable con FANCM y forma parte del Complejo Central de AF. A través de su región

nucleasa, FAAP24 puede unirse a ADN de cadena sencilla. Esta proteína es necesaria para la monoubiquitinización de FANCD2 (Ciccia, et al. 2007).

FAAP100 también forma parte del Complejo Central, en particular participa en un subcomplejo en el que intervienen FANCB y FANCL. La formación de este subcomplejo parece evitar la degradación de sus componentes. Por otra parte, hay evidencia que sugiere una función estructural para esta proteína (Ling, et al. 2007).

c) Otros

Además de los genes FANC y FAAP, existen otros cuyos productos proteicos participan en las funciones de la vía AF/BRCA. Se relacionan con los procesos de recombinación, síntesis translesional, señalización del ciclo celular, remodelación de la cromatina y otros procesos celulares (Rego, Kolling and Howlett 2009). En la Tabla 3 se presentan algunos de los más importantes.

Tabla 3.- Proteínas No-AF que participan en la vía AF/BRCA

Proteína	Gen	Locus	Interacción con proteínas AF	Función	Proceso
Rad51	<i>RAD51</i>	15q15.1	FANCD1/ BRCA2 Unión a motivo BRC	Formación de microfilamento Invasión de ssDNA	Recombinación homóloga
BRCA1	<i>BRCA1</i>	17q21	FANCD2 FANCA FANCI/BRIP1 FANCD1/BRCA2	Monoubiquitinización de FANCD2. Formación de foci Reparación de ICLs	Recombinación homóloga Remodelación de la cromatina
BLM	<i>BLM</i>	15q26.1	FANCA FANCC FANCF FANCG	Helicasa 3'→5' Reparación de ICLs Reparación replicativa en la horquilla Localización a foci inducible por MMC	Recombinación homóloga Reparación replicativa
Nibrina	<i>NBS1</i>	8q21	FANCD2	Parte del complejo MRN. Identifica y promueve reparación de DSB. Promueve autofosforilación de ATM	Recombinación homóloga Unión de extremos no homólogos Regulación del ciclo celular
PCNA	<i>PCNA</i>	20p12	FANCD1/ BRCA2 FANCD2	Modificaciones postraduccionales permiten el mantener la estabilidad de la horquilla de replicación	Síntesis translesional
USP1	<i>USP1</i>	1p32.1 p32.3	FANCD2	Desubiquitinización de FANCD2 en G2 Desubiquitinización de PCNA	Síntesis translesional Respuesta de estrés a la replicación
ATM	<i>ATM</i>	11q22.3	FANCD2	Protein cinasa que activa el checkpoint de fase S en respuesta a daño al DNA (DSB)	Regulación del ciclo celular
ATR	<i>ATR</i>	3q22q24	FANCD2 FANCI FANCG	Protein cinasa que activa el checkpoint de fase S en respuesta a horquillas de replicación detenidas o ssDNA	Regulación del ciclo celular
CHEK1	<i>CHEK1</i>	11q22q23	FANCD2 FANCE	Fosforilada por ATR Necesario para la monoubiquitinización de FANCD2 Fosforilación de FANCE induce su degradación	Regulación del ciclo celular
UBE2T	<i>UBE2T</i>	1q31	FANCL	Participa en la monoubiquitinización de FANCD2 Promueve la autoubiquitinización de FANCL	Regulación del ciclo celular
H2AX	<i>H2AX</i>	11q23.2 q23.3	FANCD2	Reclutamiento de proteínas de reparación Necesario para la formación de foci	Remodelación de la cromatina
TIP60	<i>KAT5</i>	11q13	FANCD2	Colocaliza con H2AX y FANCD2 Reparación de ICLs	Remodelación de la cromatina

2) Enlaces covalentes cruzados y su reparación por la vía AF/BRCA

a) *Enlaces covalentes cruzados*

Los ICL, son un tipo de lesión del ADN que provoca la formación de enlaces covalentes entre las dos cadenas de la molécula. Esta modificación en la estructura impide la separación de las cadenas, lo que a su vez genera bloqueos en procesos celulares esenciales como la replicación, la transcripción y la segregación. La falta de reparación de estas lesiones condiciona rupturas y rearrreglos cromosómicos y muerte celular (Muniandy, et al. 2010).

Existen numerosos compuestos capaces de generar ICL en el ADN. Los más estudiados son los agentes quimioterapéuticos que se valen del efecto tóxico que producen los ICL como tratamiento contra el cáncer. Otras fuentes de agentes alquilantes pueden encontrarse en el ambiente como las furocumarinas de algunas plantas, o hasta endógenamente como ciertos productos de la peroxidación lipídica. La estructura y la toxicidad de los enlaces cruzados depende del tipo de agente que los provoca, así como de su farmacocinética y su farmacodinamia (Dronkert and Kanaar 2001).

Uno de los agentes que se utiliza con mayor frecuencia tanto en la clínica como en el laboratorio es la mitomicina C. Para activarse, tiene que pasar por un ciclo de oxidación-reducción, liberando ROS que pueden generar

daño adicional. Este fármaco es capaz de generar 6 tipos diferentes de aductos: cuatro monoadductos, un enlace covalente intrahebra y un enlace covalente cruzado. Todos se generan en las guaninas, principalmente cuando se encuentran en sitios d(CpG) en el surco menor. Sin embargo, los ICL sólo pueden formarse en estos sitios lo cual provoca una disrupción mínima del dúplex. Del total de aductos que genera la MMC, únicamente de 5 a 13 por ciento son ICL (Muniandy, et al. 2010) (Dronkert and Kanaar 2001).

b) Vía AF/BRCA

La reparación de los ICL requiere de la activación, durante la replicación, de la vía AF/BRCA, cuya función parece ser la coordinación de actividades pertenecientes a distintos mecanismos de reparación clásicos, entre los que se incluyen la reparación por escisión de nucleótidos, la síntesis translesional y la recombinación homóloga.

Un evento indispensable para el correcto funcionamiento de esta vía es la monoubiquitinización de las proteínas FANCD2 y FANCI, por medio de un grupo de proteínas FANC y proteínas asociadas a AF que se ensamblan para formar un complejo que lleva el nombre de Complejo Central. Las proteínas FANCD2-FANCI ubiquitinizadas son capaces de reconocer la lesión y atraer otras proteínas para iniciar su reparación. En los siguientes párrafos se detalla

este proceso (Green and Kupfer 2009) (Kee and D'Andrea 2010) (Moldovan and D'Andrea 2009).

Proteínas del Complejo Central (Core complex)

De las 13 proteínas FANC que se conocen hasta ahora, 8 forman parte del Complejo Central. Este complejo es el responsable de llevar a cabo la monoubiquitinización de FANCD2 y FANCI, y si es deficiente en alguno de sus componentes, su función se ve comprometida. Algunos datos experimentales sugieren la existencia de subcomplejos, pero su relevancia biológica aún no ha sido dilucidada. La función específica de algunas subunidades se ha ido evidenciando. Así, se ha determinado que el Complejo Central es capaz de interactuar con la proteína FANCD2 a través de la subunidad FANCE. También se identificó que la actividad ubiquitín E3 ligasa del complejo está a cargo de FANCL (de Winter and Joenje 2009).

Más recientemente, FANCM ha aparecido como una proteína esencial debido a la gran cantidad de roles que desempeña para preservar la integridad genómica en respuesta a daño al ADN. Existe evidencia experimental que indica que esta proteína, en asociación con FAAP24, es capaz de activar el punto de monitoreo de S para inhibir la replicación del ADN, permitir la localización del Complejo Central a la cromatina de los sitios de lesión para

inducir la monoubiquitinización de FANCD2-FANCI y estabilizar las horquillas de replicación colapsadas (Kee and D'Andrea 2010) (Kim, et al. 2008).

Proteínas del Complejo ID

Las proteínas FANCD2 y FANCI forman un complejo dinámico que tiene la capacidad de entrar y salir de la cromatina en función de sus modificaciones postraduccionales. Estas proteínas tienen un tamaño y una estructura similares y en respuesta a daño genómico, pueden ser monoubiquitinizadas por FANCL en las lisinas 561 y 523 respectivamente. Este proceso es necesario para mantener la monoubiquitinización del otro componente del complejo ID. Se ha visto que la ubiquitinización de FANCD2 es esencial para llevar a cabo el proceso de reparación. Aunque la modificación de FANCI no es esencial, parece favorecer la reparación, además de tener un papel en la regulación de la vía AF. En respuesta a esta modificación postraduccional FANCD2-I se localiza en foci de cromatina en donde se encuentran otras proteínas involucradas en la reparación (Moldovan and D'Andrea 2009).

Proteínas efectoras río abajo

Se considera que las proteínas FANCD1, FANCI y FANCN se encuentran localizadas río abajo del complejo ID ya que ninguna es necesaria

para su monoubiquitinización. Estos componentes de la vía AF son considerados efectores ya que participan directamente el proceso de reparación.

FANCI, también conocida como BRIP1 o BACH1, es el único componente de la vía AF que tiene función helicasa, además de FANCD1. Cuando FANCI es fosforilada en la serina 990 puede interactuar con el dominio BRCT de la proteína no-AF BRCA1 para participar en la respuesta a daño al ADN (Moldovan and D'Andrea 2009). Un estudio reciente ha dado luz sobre las funciones de este componente de la vía AF. FANCI es reclutado a la cromatina en respuesta a estrés replicativo, probablemente para facilitar la reparación de la lesión que está generando dicho estrés. Esta proteína se vale de su función helicasa para permitir el ensamblaje de FANCD2 monoubiquitinizado a la cromatina en los sitios en los que ha habido daño. Los autores proponen que esta actividad podría remodelar el ADN para evidenciar un sitio de unión para FANCD2 o bien podría generarlo al procesar el ADN dañado. Parecería que FANCI es la pieza que une físicamente FANCD2 con BRCA1. También parecería tener un rol en el señalamiento de los puntos de monitoreo dependientes de ATR (Zhang, et al. 2010).

La participación de la proteína FANCD1/BRCA2 en la vía FA/BRCA está bien estudiada; su dominio de unión a ADN y su capacidad de interactuar con numerosas proteínas le permite participar en diversos procesos celulares como la estabilización de las horquillas de replicación, la recombinación homóloga y la regulación de la citocinesis. En respuesta a daño al ADN, esta proteína interactúa con FANCD2 monoubiquitinizada para organizar focos nucleares en los que se localizan tanto BRCA1 como RAD51, los cuales son sustratos necesarios para llevar a cabo la reparación de las horquillas de replicación colapsadas (Andreassen and Ren 2009) (Kalb, et al. 2007).

FANCN también participa ríó abajo en la vía AF. En respuesta a daño al ADN, se une a FANCD1 para regular su estabilidad y su interacción con la cromatina en la matriz nuclear (Andreassen and Ren 2009).

c) Reparación de los enlaces covalentes cruzados

La reparación de ICL se inicia cuando la horquilla de replicación se encuentra con una lesión y colapsa. Este estrés replicativo inicia la señalización a través del punto de monitoreo coordinado por ATR para el reclutamiento de la maquinaria de reparación. Este tipo de lesión es tan nociva que para subsanarla genera otra lesión igualmente tóxica para el ADN: la ruptura de doble cadena (DSB por sus siglas en inglés). Para sobrellevar

ambas, la célula utiliza varios mecanismos de reparación de forma coordinada que han sido descritos con detalle en (Andreassen and Ren 2009).

Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

La liberación de los ICL es el primer paso en la reparación de este tipo de lesión. Para lograr esto se requiere que unas endonucleasa corten los extremos 3' y 5' del enlace covalente cruzado, generando un ruptura de doble cadena en una de las cromátides hermanas. Existen varias nucleasas (XPF-ERCC1, el complejo SLX4 o la nucleasa FANCD2 en sí misma) que podrían llevar a cabo esta función. Recientemente, también se identificó la endonucleasa FAN1 que, por estar localizada en los sitios de daño con FANCD2 ubiquitinizada, es un candidato para liberar el ICL. La función específica de estas nucleasas es un tópico de intensa investigación en este momento (Kee and D'Andrea 2010) (O'Donnell and Durocher 2010).

El aducto que se libera, queda unido a la otra hebra y debe ser eliminado por la maquinaria de NER.

Síntesis translesional

Para restaurar la integridad de la hebra, una ADN polimerasa translesional sintetiza la secuencia faltante en modo propenso a errores.

Recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos

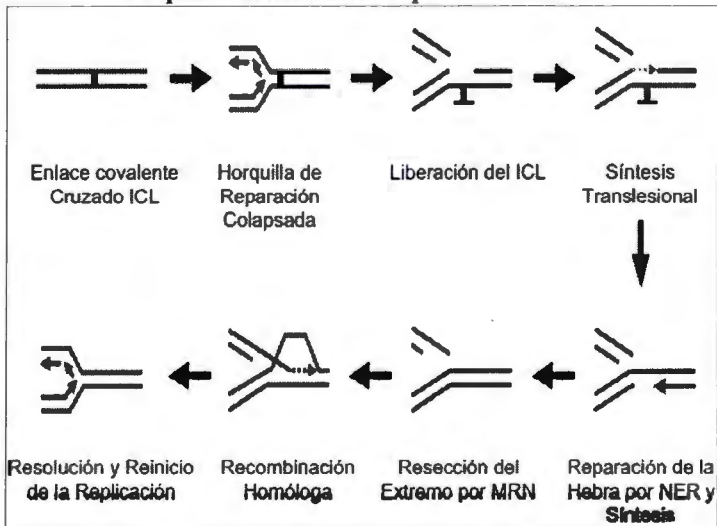
Las rupturas de doble cadena pueden ser reparadas a través de dos mecanismos: por recombinación homóloga (RH) o por unión de extremos no homólogos (NHEJ por sus siglas en inglés). La utilización de un mecanismo o el otro aún no se entiende a detalle. Sin embargo, el factor determinante parece ser la disponibilidad de cromátides hermanas. Así, la activación de la RH se ve favorecida durante las fases S y G₂, cuando está disponible el templado homólogo o la cromátide hermana. Mientras que cuando la ruptura de doble cadena ocurre en G₁ a consecuencia de un evento nocivo que no se asocia con la replicación, se activa primordialmente la NHEJ.

Cuando la RH se activa, el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) utiliza su función exonucleasa 5'-3' para exponer ambos extremos 3'OH de las hebras en la DSB. Esta resección genera ADN de cadena sencilla que puede migrar para aparearse con su cromátida hermana para iniciar la RH. Esto reinicia la horquilla de replicación colapsada a la vez que repara la ruptura de doble cadena que se generó al liberar el ICL.

Se han propuesto algunos modelos que buscan explicar mecanísticamente porque se favorece la activación de un tipo de reparación sobre el otro en distintas fases del ciclo celular. Por un lado, en fase S, la

activación de la RH podría ser consecuencia de que FANCD2 monoubiquitinizado recluta factores involucrados en la recombinación (BRCA1, BRCA2). Por otro lado, estudios recientes sugieren que la vía AF está involucrada activamente en la inhibición de NHEJ; ya sea al no permitir la unión de factores de NHEJ en la DSB o bien facilitando la eliminación de dichos factores de la cromatina dañada, evitando en ambos casos el proceso de unión de extremos. Parecería pues que el fenotipo AF es consecuencia tanto de una RH deficiente como de una falla en la supresión de la unión de extremos no homólogos, resultando en una reparación de ADN propensa a errores con acumulación de deleciones e inserciones. (Kee and D'Andrea 2010).

Esquema 1. Modelo de reparación de ICL



Tomado de (Andreassen and Ren 2009)

3) Regulación de la vía AF/BRCA

La activación no controlada de la vía AF tiene efectos devastadores para la célula. Actualmente, se cree que esta vía se encuentra apagada de forma basal y únicamente se activa en respuesta al estímulo de daño al ADN. Una vez que éste es reparado, la vía regresa a su estado inactivo. Puesto que el paso limitante de la activación de esta vía es la ubiquitinización del complejo FANCD2-I, muchos de los mecanismos de regulación descritos hasta ahora se centran en fomentar o limitar esta modificación postraduccional.

Es importante mencionar que la vía AF únicamente puede ser activada durante la fase S del ciclo celular y que existen mecanismos de regulación que inhiben su actividad durante la mitosis.

a) Regulación positiva: activación de la vía.

Como se ha mencionado, la vía AF se activa en respuesta a la detección de daño al ADN. El principal regulador positivo de esta vía, es la cinasa ATR, encargada de coordinar la respuesta celular a este estímulo durante la fase S. Al ejercer su función, esta enzima fosforila varios componentes de la vía AF, ya sea directamente o a través de su cinasa efectora Chk1.

Los principales blancos para esta regulación son las proteínas FANCD2 y FANCI que, como se expuso anteriormente, son la pieza clave para iniciar

la formación de foci de reparación. Esta modificación postraduccional ocurre en ambos componentes de este complejo. Sin embargo, la evidencia experimental parece indicar que la fosforilación de FANCI tiene un papel primordial en esta función regulatoria. Este es un ejemplo de comunicación cruzada en-trans de los sistemas de fosforilación-ubiquitinización, en el que la fosforilación de FANCI, y en menor medida la de FANCD2, permite su reclutamiento al complejo central para ser ubiquitinizadas. De manera alternativa, también se propone que el efecto de esta modificación es inhibir la desubiquitinización del complejo FANCD2-I, permitiendo así su acción.

Como consecuencia de la formación de ICL, la proteína FANCA se vuelve blanco de ATR. Al ser fosforilada se localiza en el núcleo y puede integrarse al Complejo Central para permitir una respuesta efectiva al daño al ADN. De la misma manera, se ha observado que FANCG debe ser fosforilada para promover la reparación (Moldovan and D'Andrea 2009).

b) Regulación negativa: inhibición de la vía

Dado que la ubiquitinización del complejo FANCD2-I es la pieza clave para la activación de la vía AF, uno de los mecanismos principales para mantener la vía AF silente es la desubiquitinización de este complejo. Esta es la tarea de la enzima USP1 que, a su vez, está altamente regulada. Esta

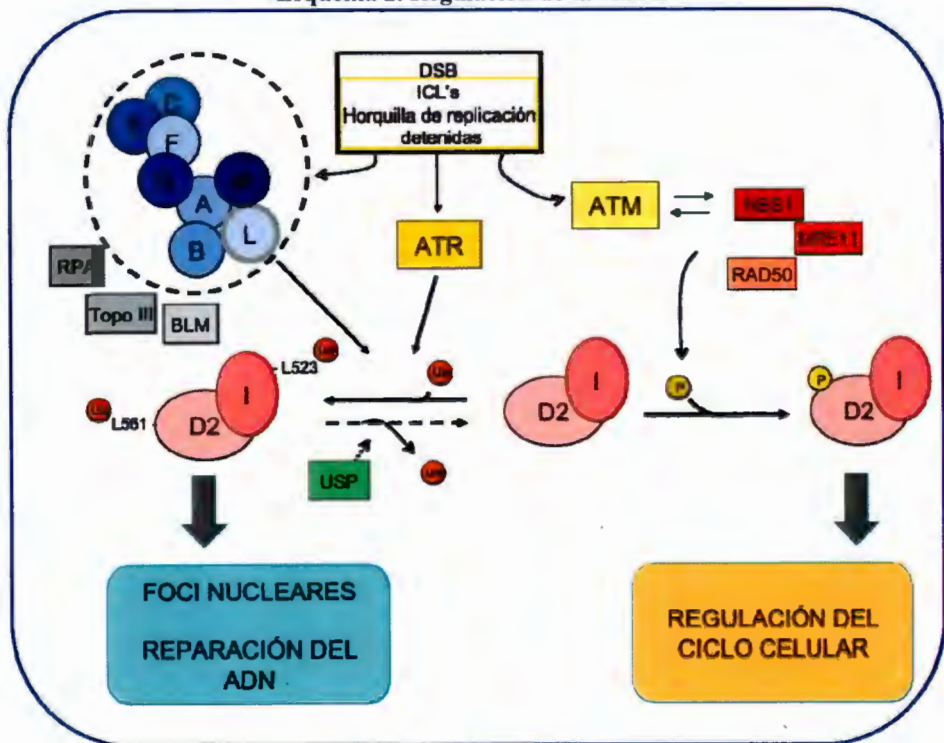
enzima se encuentra formando un complejo con UAF1 que actúa como un activador para USP1. En condiciones basales, el complejo USP1-UAF1 mantiene a FANCD2-I desubiquitinizado. En respuesta a daño al ADN, la función de este complejo se ve mermada por un doble mecanismo que incluye la inhibición de la transcripción del gen USP1 y la degradación por el proteasoma del producto proteico de dicho gen. Este sistema de regulación permite que, en presencia de daño al ADN, se acumule un exceso de FANCD2-I ubiquitinizado para promover la reparación del daño.

Otro nivel de regulación de la vía AF fue descrito recientemente y consiste en no permitir la ubiquitinización del complejo FANCD2-1 al eliminar al Complejo Central de la cromatina. Este mecanismo funciona de la siguiente forma: la proteína FANCM forma un complejo con FAAP24 que se encuentra unido a la cromatina durante todo el ciclo celular. Sin embargo, este complejo únicamente puede reclutar al Complejo Central cuando FANCM se encuentra hipofosforilado, lo cual ocurre sólo en la fase S del ciclo celular. Una vez que la replicación se ha completado, FANCM es hiperfosforilada por varias cinasas (en particular Plk1). Esta modificación es reconocida por la ubiquitin ligasa SCF- β TRCP que a su vez ubiquitina a FANCM marcándola para degradación por el sistema de

proteasoma. Este mecanismo no sólo evita la activación de la vía AF, además asegura que el Complejo Central no pueda ser reclutado a la cromatina durante mitosis.

También se sugiere que la modulación de la actividad de la ubiquitin-ligasa y de las concentraciones locales de los distintos factores que participan en la vía AF podrían ser otros mecanismos de regulación negativa de la vía AF (Moldovan and D'Andrea 2009).

Esquema 2. Regulación de la vía AF



Modificado de (Kalb, et al. 2007)

V. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

A pesar de numerosos esfuerzos por establecer una correlación genotipo-fenotipo, la AF ha comprobado ser una enfermedad compleja.

La única correlación genotipo-fenotipo por grupo de complementación sobre la que hay evidencia clara, es la relativa a los grupos de complementación AF-D1 y AF-N con el desarrollo de meduloblastoma, tumor de Wilms y LAM a edad temprana. Estos pacientes alcanzan una incidencia acumulada para malignidad de 97 por ciento a los 5.2 años.

Algunas observaciones deben considerarse con cautela debido a posibles sesgos de muestreo por la baja frecuencia de ciertos grupos de complementación. Sin embargo, se ha reportado que los grupos AF-B, AF-E y AF-F son aquellos en los que se observa menor severidad clínica. De la misma manera, se ha descrito un fenotipo más leve en aquellos pacientes que muestran mosaicismo revertante, aunque sólo se ha descrito en 5 de los 13 grupos de complementación.

Una regla de pronóstico general que ha sido posible establecer es que los pacientes que presentan pocas malformaciones congénitas y en quienes el eje radial está íntegro tienen un mayor riesgo de desarrollar las neoplasias asociadas con AF (AML y SCC). No obstante, aún está por demostrarse que

esta observación es válida para cada uno de los distintos grupos de complementación.

Los intentos por relacionar directamente el fenotipo de los pacientes con alguno de los genes responsables de la enfermedad han resultado poco fructíferos. Sin embargo, a medida que se dispone de mayor información sobre el tipo de mutaciones, se ha comprobado la importancia de la caracterización de éstas para entender esta compleja enfermedad. Así, ha sido posible establecer que las mutaciones nulas son más graves que las que guardan algún grado de función. Prueba de esto es el que, hasta la fecha, no se haya identificado individuo alguno con mutaciones nulas (amorfias) en ambos alelos para los grupos de complementación AF-D2, AF-I. Esto sugiere que, al presentarse dicho caso, el resultado es fatal de forma prenatal, lo que se ha confirmado en modelos murinos con mutaciones amorfas homocigotas para *Brca2*. Asimismo, en pacientes del grupo de complementación AF-A, se ha visto que la ausencia completa de la proteína FANCA resulta en un fenotipo más severo que en aquellos individuos del mismo grupo en los que se detecta proteína residual.

Se cree que existen mutaciones que permiten supervivencia a largo plazo. Prácticamente todos los pacientes con AF mayores de 50 años

pertenecen al grupo de complementación AF-A, la mayoría son heterocigotos compuestos y portan al menos una mutación de sentido erróneo.

A medida que se conozca más sobre la estructura y la función de las proteínas AF podrá predecirse de mejor forma el efecto de las distintas mutaciones que afectan a los genes que las codifican.

Por si lo anterior fuera poco, algunas familias en las que se observan fenotipos discordantes sugieren que en esta enfermedad mendeliana también influyen otros factores como el trasfondo genómico, los genes modificadores, los factores ambientales y el azar (Neveling, Endt, et al. 2009).

B. ANTECEDENTES DIRECTOS

En 1996, Frías *et al.* trataron líneas celulares linfoblastoides derivadas de pacientes AF-A y de pacientes sanos con MMC para evaluar el efecto de dicho fármaco sobre la síntesis de ADN en ambos contextos. Los resultados de este estudio mostraron que la exposición a MMC de células AF inducía una disminución en la cantidad de células que sintetizaban ADN. Se demostró que este efecto se mantiene en el tiempo (a mayor tiempo post exposición, menor número de células marcadas). De igual forma, esto no se observó en la línea celular normal, y en ausencia del estímulo nocivo, no se encontraron

diferencias en el número de células marcadas entre estas líneas celulares. Los resultados fueron concordantes con los de otros investigadores que también ponen de manifiesto que la MMC afecta el número de células que se encuentran en fase S sin alterar la cantidad de ADN que se sintetiza por célula (Frias, et al. 1996).

Posteriormente, en otra serie de experimentos realizados en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, Molina *et al.* estudiaron la respuesta a MMC de cinco líneas celulares linfoblastoides AF (AF-A, -B, -C, -D1 y E) y una línea celular normal analizando dos parámetros: índice mitótico (IM) y aberraciones cromosómicas (AC).

El índice mitótico permite identificar la progresión del ciclo celular de G2 a M. En la línea celular normal, se observó un IM basal de 2.4 ± 0.2 que aumentó hasta 2.9 ± 0.5 al exponer a las células a MMC por 24 horas. Mientras que el IM basal de las células AF fue de 3.4 ± 0.9 , al exponerse por 24 horas a MMC, aumentó hasta 3.8 ± 1.0 . En las otras líneas celulares AF, también se observó un aumento en el número de células que pasan de G2 a M posterior a una exposición equivalente. Los autores suponen que esto podría deberse al arresto del ciclo celular resultante de la exposición a MMC y de la sincronización de los cultivos que ocurre como consecuencia de la eliminación

del bloqueo al eliminar dicho estímulo. Puesto que las células AF son más sensibles al arresto de G2/M inducido por MMC, se esperaría que hubiera una mayor cantidad de células AF en mitosis con respecto a las células normales.

Las AC son la forma más clara de daño al ADN. Su identificación es un dato inequívoco de la discontinuidad del material genético y por ende de su inestabilidad. La línea normal analizada demostró una frecuencia basal de 0.05 ± 0.03 aberraciones por célula, la exposición a MMC aumentó la frecuencia de AC a 0.11 ± 0.03 . Por su parte, las células AF-A presentaron una frecuencia basal de AC de 0.15 ± 0.06 y al ser expuestas a MMC, aumentó a 3.05 ± 1.04 . Por otra parte, 78 por ciento de las células AF del grupo de complementación A demostraron ser células muy dañadas con más de 5 aberraciones por célula.

Ambas observaciones permiten concluir que una parte de las células AF-A están transitando de G2 a M a pesar de tener daño cromosómico extenso (Molina, et al. 2010).

Finalmente, en 2008, Martínez *et al.* describieron el efecto de MMC sobre la expresión diferencial de genes asociados a TP53, con el fin de dilucidar la naturaleza de los procesos celulares asociados a daño al ADN en

ausencia de una vía AF/BRCA funcional. Para esto, cuantificaron por medio de RT-PCR cuantitativa los transcritos de 21 genes de interés posterior a la exposición a MMC.

En células normales no se identificaron cambios de expresión significativos posterior a la exposición a MMC. En cambio, las células AF-A demostraron un aumento significativo de la transcripción de TP53 y siete genes regulados por este factor de transcripción, entre los que se incluyeron TR1AP1, TP53I3, CDKN1A, PCNA, DDB2, SGK, GADD45A. También se identificó un aumento en la expresión de dos genes indirectamente regulados por TP53: CCNB1, HSPA8, y de un gen no regulado por TP53 pero que interviene en el metabolismo oxidativo: SOD1.

Estos resultados mostraron que en células que tienen comprometida la vía AF/BRCA, el estrés genotóxico provocado por MMC condiciona un aumento en la expresión de TP53 y algunos de sus blancos con el fin de mantener la integridad del material genético de la célula al estimular tres procesos celulares clave dependientes de TP53: arresto del ciclo celular (CDKN1A, CCNB1, GADD45A), reparación del ADN (BLM, XPC, DDB2) y apoptosis (TP53I3, TNFRS10B) (Martínez, et al. 2008).

En resumen, estos resultados indican que al exponer a las células AF-A al estímulo genotóxico de la MMC: 1) la mayoría de las células son incapaces de replicar su ADN durante la fase S, 2) hay una mayor cantidad de células AF-A que transitan de G2 a M a pesar de que tienen una gran cantidad de AC en comparación con las células normales y 3) las células AF-A que tienen daño genotóxico son capaces de promover los procesos celulares de arresto del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis mediados por TP53, que tienen como fin mantener la integridad del material genético de la célula.

Se trata pues de células con extenso daño genómico que son capaces de avanzar en el ciclo celular a pesar del daño. Dichas células podrían conservar el potencial de fomentar procesos celulares con el fin de mantener la integridad del genoma y se esperaría que pudieran ser detenidas y eliminadas en fases posteriores del ciclo celular. La primera interrogante a vislumbrar sería definir si las células AF-A dañadas son capaces de terminar exitosamente la mitosis. Para esto, en la investigación objeto de este trabajo se usó el índice mitótico (IM) que es un indicador de si la célula fue capaz de iniciar la mitosis y el índice nuclear (IN) que mide si la célula completó exitosamente la división celular.

C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La AF es una enfermedad que presenta una alteración en el sistema de reparación del ADN o de vigilancia de la integridad genómica. En experimentos previos, se ha observado un número de mitosis suficiente para hacer un estudio citogenético en células AF expuestas a MMC. Las células analizadas tienen un gran número de aberraciones cromosómicas por lo que no se esperaría que este tipo de células entraran a mitosis, como se observa que sucede. Sin embargo, el inicio de la mitosis cuantificada por el IM, no es indicativo del número de células que concluyeron la división celular. Es posible que después de metafase (sub-fase en la que se analizan los cromosomas), las células muy dañadas se seleccionen negativamente y se eliminen.

La medición de IM e IN en células AF-A que han sido expuestas a MMC, permitirá comprobar si las células dañadas pueden iniciar y terminar la mitosis.

¿Existen diferencias en la capacidad de iniciar y concluir la mitosis entre células con anemia de Fanconi-A y células normales expuestas a mitomicina C?

D. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio experimental.

E. OBJETIVOS

I. GENERAL

Identificar la existencia de diferencias en el inicio y el término de la mitosis en cultivos de células normales y de células con AF-A expuestas a MMC mediante la comparación del IM y el IN.

II. ESPECÍFICOS

Determinar IM, IN y cantidad de células MN, BN y PN 24 horas posteriores al inicio de la exposición a MMC en ambos grupos.

Determinar IM, IN y cantidad de células MN, BN y PN 48 horas posteriores al inicio de la exposición a MMC en ambos grupos.

Comparar IM, IN y cantidad de células MN, BN y PN de células AF-A y células normales a las 24 horas y 48 horas posteriores al inicio de la exposición a MMC.

F. HIPÓTESIS

Posterior a la exposición a MMC, las células AF-A serán menos exitosas en iniciar y completar la mitosis respecto de las células normales.

G. JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con AF tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores a lo largo de la vida. Presentan una incidencia acumulada a los 40 años de 33 por ciento para tumores hematológicos y de 28 por ciento para tumores sólidos. Esta incidencia es 500 veces mayor que la de la población general (Kutler, Singh, et al. 2003).

Las células AF son un modelo biológico natural para estudiar y comprender los mecanismos normales de vigilancia y reparación del genoma humano. Es bien sabido que el mal funcionamiento de estos conduce al desarrollo de neoplasia.

Estudiar el efecto de la MMC sobre la reproducción celular de la línea AF-A generará conocimiento sobre la supervivencia de estas células cuando su material genético está dañado y aportará información sobre la biología de la enfermedad.

H. MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

- Líneas celulares linfoblastoides AF-A VU817 y NL-49
- Material plástico de cultivo y de cosecha
- Laminillas esmeriladas
- Pipetas varias
- Medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Green Island, NY, USA)
- Antibiótico-antimicótico (Gibco RL, Grand Island, NY, USA)
- Suero fetal de bovino (HyClone, Utah, USA)
- Glutamina (Gibco RL, Grand Island, NY, USA)
- Piruvato de sodio (Gibco RL, Grand Island, NY, USA)
- Aminoácidos no esenciales (Gibco RL, Grand Island, NY, USA)
- Ficoll hypaque (Axis-Shield, Scotland)
- Colchicina (Sigma, St Louis MO, USA)
- Citocalasina B (Sigma, St Louis MO, USA)
- Cloruro de Potasio 0.075 M (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J. USA)
- Fijador Carnoy: Metanol 3:1 Ácido Acético (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J. USA)

- Mitomicina C (MMC) (Sigma, St Louis MO, USA)
- Colorantes diversos.

II. MÉTODOS

1) Diseño Experimental

Las células AF son conocidas por tener comprometido el sistema de reparación de enlaces covalentes cruzados. A consecuencia de esto tienen alteraciones en la duración del ciclo celular y el punto de monitoreo de S. Aparentemente, el punto de monitoreo de G2/M parece estar intacto.

En vista de que experimentos previos en el laboratorio sugieren que las células AF-A muy dañadas tienen la capacidad de entrar a mitosis a pesar de la existencia de un punto de monitoreo de G2/M en respuesta a daño al ADN, se decidió monitorizar la entrada y salida de células AF-A a mitosis. Por lo anterior, se decidió realizar un estudio experimental en este trabajo.

Para hacer el seguimiento de las células que han iniciado la mitosis se utilizó el índice mitótico: IM. Este índice se calcula como el cociente del número de células en mitosis y el total de células observadas, multiplicado por 100. A mayor IM, mayor cantidad de células se encuentran en mitosis.

El seguimiento de las células que completaron la mitosis se hizo al determinar el índice nuclear (IN). Este indicador es una medición ponderada de la cantidad de ciclos celulares completados exitosamente por las células. Este índice se construye a partir de la medición de la cantidad de células mononucleadas (MN), binucleadas (BN) y polinucleadas (PN) observadas de acuerdo a lo propuesto por Fenech (Fenech and Morley 1985). De la misma forma, a mayor IN, mayor eficiencia para completar los ciclos celulares. El análisis en conjunto pero por separado de estas variables permite, a su vez, identificar la cantidad de células que completaron exitosamente ninguno, uno o más ciclos celulares.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado para poder calcular medidas de tendencia central y de dispersión.

2) Preparación para Índice Mitótico

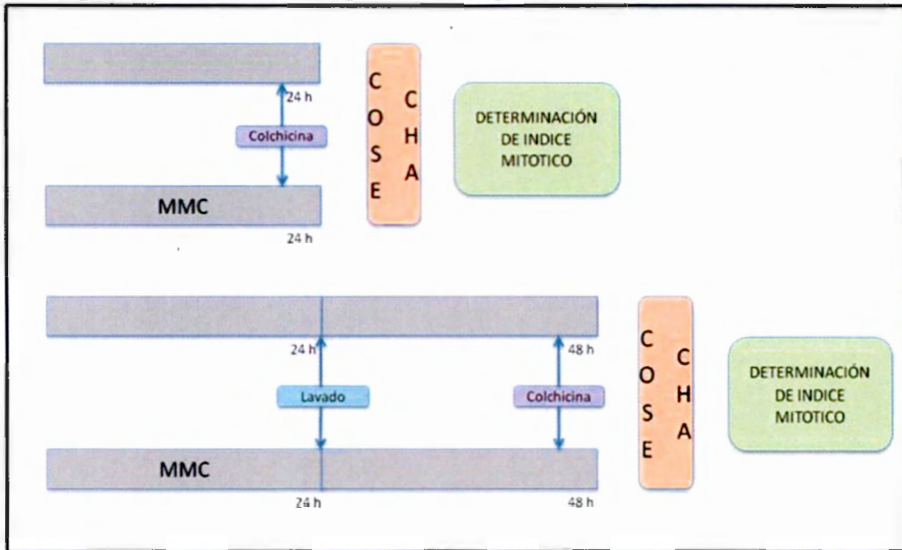
Para cada una de las repeticiones, se realizaron cuatro cultivos de cada una de las líneas celulares con una densidad de 300,000 células/ml en medio RPMI 1640, suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado, glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y 1% de antibiótico-antimicótico. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

La mitad de los cultivos fueron tratados por 24 horas con MMC [10ng/mL]. Se cosecharon cultivos en dos lapsos de tiempo: los primeros, 24 horas posteriores al inicio del cultivo; los segundos, 48 horas posteriores al inicio de los cultivos, dejando un lapso de recuperación sin MMC de 24 horas para las células que fueron expuestas.

Se detuvo la mitosis con colchicina [10µg/ml], 2 horas previas al momento de la cosecha y se hizo la cuantificación del número de células en mitosis de un total de 2,000 células consecutivas. Se calculó el índice mitótico conforme se describe en la sección de Diseño Experimental.

En el Esquema 3 se presentan las condiciones experimentales a las que fueron sometidas ambas líneas celulares.

Esquema 3. Condiciones experimentales para obtención de índice mitótico



3) Preparación para Índice Nuclear

Para cada una de las repeticiones, se realizaron cuatro cultivos (diferentes de los que se hicieron para obtener el IM) de cada una de las líneas celulares con una densidad de 300,000 células/ml en medio RPMI 1640, suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado, glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y 1% de antibiótico-antimicótico. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

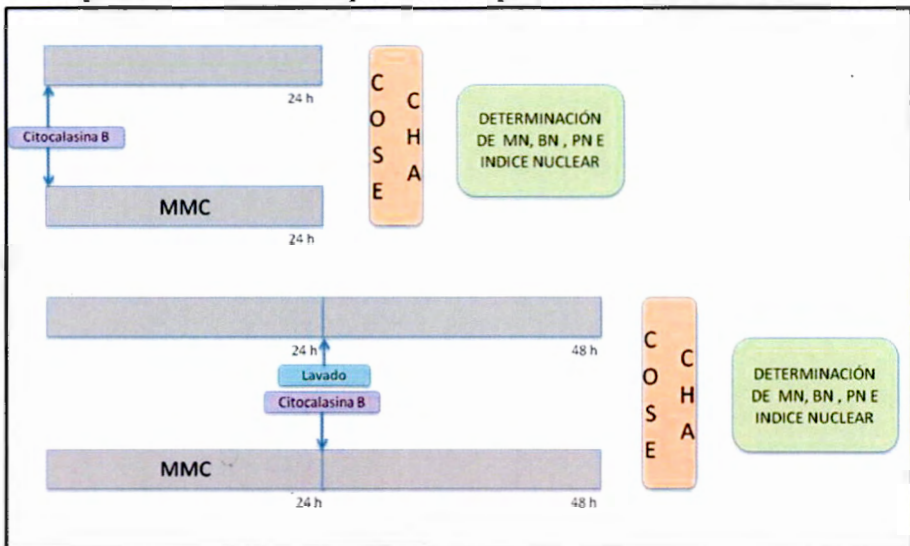
La mitad de los cultivos fueron tratados por 24 horas con MMC [10ng/mL]. Se cosecharon cultivos en 2 lapsos de tiempo: los primeros, 24 horas posteriores al inicio del cultivo; los segundos, 48 horas posteriores al

inicio de los cultivos, dejando un lapso de recuperación sin MMC de 24 horas para las células que se expusieron.

Para obtener el IN se detuvo la citocinesis exponiendo a las células 24 horas antes de su cosecha a citocalasina B [3µg/ml] y se midió el número de células mononucleadas (MN), binucleadas (BN) y polinucleadas (PN) en 200 células consecutivas, aplicando la fórmula descrita por Fenech (Fenech and Morley 1985).

En el Esquema 4 pueden consultarse las condiciones experimentales a las que fueron sometidas ambas líneas celulares.

Esquema 4. Condiciones experimentales para obtención de índice nuclear.



Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

En la Tabla 4 se presenta la nomenclatura utilizada para referirse a las distintas condiciones experimentales utilizadas. Esta nomenclatura será una referencia útil en la sección de resultados.

Tabla 4. Nomenclatura de los experimentos.

Nomenclatura	Tratamiento	Tiempo
CTRL24	Control- sin tx	24 horas
MMC24	MMC- 10ng/ml	24 horas
CTRL48	Control-sin tx	48 horas
MMC48	MMC- 10ng/ml	48 horas

A esta nomenclatura se añadirán diversos prefijos que harán referencia a la variable de interés. Cuando se refiera al índice mitótico, se usa el prefijo IM-, mientras que cuando sea respecto al índice nuclear, el prefijo que se utiliza es IN-. De la misma forma, cuando se habla del número de mononucleadas se utiliza MN-, el número de binucleadas se representa como BN- y el de polinucleadas como PN-. Por su parte, los prefijos NL- y AF- hacen referencia a la línea celular (NL-49 y AF-A VU817 respectivamente) en la que se hizo la observación.

I. RESULTADOS

Con el objeto de identificar la eficiencia de entrada y salida de mitosis de las dos líneas celulares estudiadas se obtuvieron, por un lado los valores de

índice mitótico (IM) e índice nuclear (IN). Por otro lado, para identificar la distribución de las células entre aquellas que no han completado ciclo celular alguno y las que han completado uno o más, se contabilizaron el número de células mononucleadas (MN), binucleadas (BN) y polinucleadas (PN). Estas variables fueron obtenidas para cada una de las muestras, en cada una de las distintas condiciones a las que fueron sometidas ambas líneas celulares, como se detalló en la sección de material y métodos.

Para demostrar la existencia de diferencias significativas entre las observaciones realizadas, se llevaron a cabo pruebas estadísticas no paramétricas, utilizando el programa de estadística SPSS versión 12.0, debido a que el pequeño tamaño de la muestra no permite comprobar normalidad en su distribución.

Para variables dependientes (medidas en la misma línea celular pero en distintas condiciones experimentales), se utilizó la prueba de diferencia de medianas de Wilcoxon que está diseñada para probar una hipótesis sobre la localización de las muestras en la distribución de una población. Esta prueba se utiliza en muestras pareadas, para probar la hipótesis de que la diferencia de medianas es cero.

Por otro lado, cuando se compararon variables independientes (medidas en distintas líneas celulares), se utilizó la prueba de diferencia de medianas de Mann-Whitney para probar la hipótesis nula de que dos poblaciones tienen funciones de distribución idénticas contra la hipótesis alternativa de que las funciones de distribución difieren únicamente con respecto a su localización (mediana). Para ambas pruebas se consideraron significativos aquellos valores con una p igual o menor a 0.05. (Electronic Statistics Textbook n.d.)

En las tablas siguientes, se presentan los resultados de las tres observaciones realizadas para cada variable estudiada.

Tabla 5. Resultados de las tres observaciones independientes de índice mitótico (IM)* en las distintas condiciones experimentales

NLCTRL24	1.112	1.471	1.061	1.215	0.224
NLMMC24	1.523	1.112	0.959	1.198	0.292
NLCTRL48	1.989	2.617	1.574	2.060	0.525
NLMMC48	0.756	2.302	1.266	1.441	0.788
Experimento	R1	R2	R3	Promedio	DL
AFCTRL24	2.669	4.058	3.093	3.273	0.712
AFMMC24	0.604	1.833	2.041	1.492	0.777
AFCTRL48	2.197	4.657	3.466	3.440	1.230
AFMMC48	1.471	1.678	3.252	2.134	0.974

En negritas se marcan los valores que corresponden a la mediana para cada experimento.

*IM = (# mitosis/2000 células observadas) x 100.

Tabla 6. Resultados de las tres observaciones independientes de índice nuclear (IN)* en las distintas condiciones experimentales

Experimento	R1	R2	R3	Promedio	σ
NLCTRL24	1.185	1.240	1.150	1.192	0.045
NLMMC24	1.175	1.235	1.185	1.198	0.032
NLCTRL48	1.365	1.275	1.385	1.342	0.059
NLMMC48	1.235	1.310	1.285	1.277	0.038
AFCTRL24	1.180	1.120	1.105	1.135	0.040
AFMMC24	1.160	1.130	1.145	1.145	0.015
AFCTRL48	1.250	1.170	1.200	1.207	0.040
AFMMC48	1.100	1.195	1.255	1.183	0.078

En negritas se marcan los valores que corresponden a la mediana para cada experimento.

*IN = ((MN)+2(BN)+3(PN))/200 células observadas

Tabla 7. Resultados de las tres observaciones independientes del número de células mononucleadas (MN), binucleadas (BN) y polinucleadas (PN) de la línea celular NL-49 en las distintas condiciones experimentales

Experimento	R1	R2	R3	Promedio	σ
MNCTRL24	164	152	173	163	10.53565
BNCTRL24	35	48	24	36	12.01388
PNCTRL24	1	0	3	1	1.52752
MNMMC24	168	158	164	163	5.03322
BNMMC24	29	37	35	34	4.16333
PNMMC24	3	5	1	3	2.00000
MNCTRL48	128	149	125	134	13.07670
BNCTRL48	71	47	73	64	1.46836
PNCTRL48	1	4	2	2	1.52752
MNMMC48	154	144	146	148	5.29150
BNMMC48	45	50	51	49	3.21455
PNMMC48	1	6	3	3	2.51661

En negritas se marcan los valores que corresponden a la mediana para cada experimento.

Tabla 8. Resultados de las tres observaciones independientes del número de células mononucleadas (MN), binucleadas (BN) y polinucleadas (PN) de la línea celular AF-A VU817 en las distintas condiciones experimentales

Experimento	R1	R2	R3	Promedio	DE
MNCTRL24	164	176	179	173	7.93725
BNCTRL24	36	24	21	27	7.93725
PNCTRL24	0	0	0	0	0.00000
MNMMC24	168	174	171	171	3.00000
BNMMC24	32	26	29	29	3.00000
PNMMC24	0	0	0	0	0.00000
Experimento	R1	R2	R3	Promedio	DE
MNCTRL48	151	166	160	159	7.54983
BNCTRL48	48	34	40	41	7.02377
PNCTRL48	1	0	0	0	0.57735
MNMMC48	180	161	149	163	15.63116
BNMMC48	20	39	51	37	15.63116
PNMMC48	0	0	0	0	0.00000

En negritas se marcan los valores que corresponden a la mediana para cada experimento.

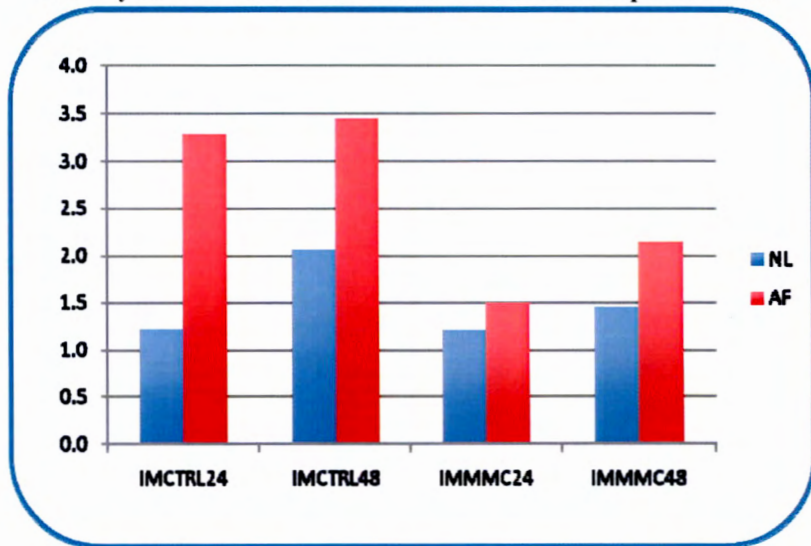
I. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

En esta sección se describirán los resultados obtenidos de forma general.

1) Índice Mitótico

En la Gráfica 1 se presentan los promedios de los IM para cada experimento. Da la impresión de que en ambas líneas celulares a mayor tiempo de cosecha mayor IM mientras que disminuye cuando se expone a MMC. También se observa consistentemente que los IM de las células AF son mayores que los de las células normales.

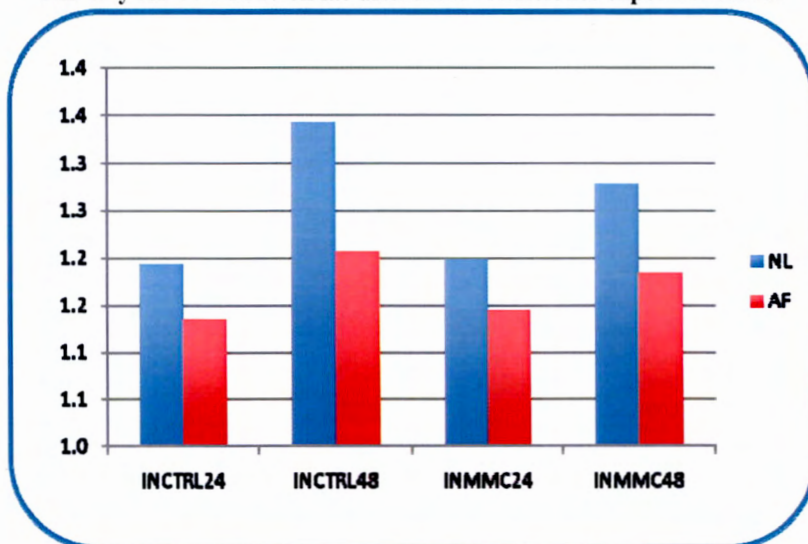
Gráfica 1. Promedios del índice mitótico para las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 en las diferentes condiciones experimentales.



2) Índice Nuclear

En la Gráfica 2 se muestran los promedios de los IN en cada una de las condiciones experimentales. De igual manera a lo observado para los IM, parecería que en ambas líneas celulares a mayor tiempo de cosecha mayor IN, así como que la exposición a MMC lo disminuye. Sin embargo, de manera opuesta a lo observado para los IM, las células normales tienen un IN mayor que el de las células AF en todas las condiciones experimentales.

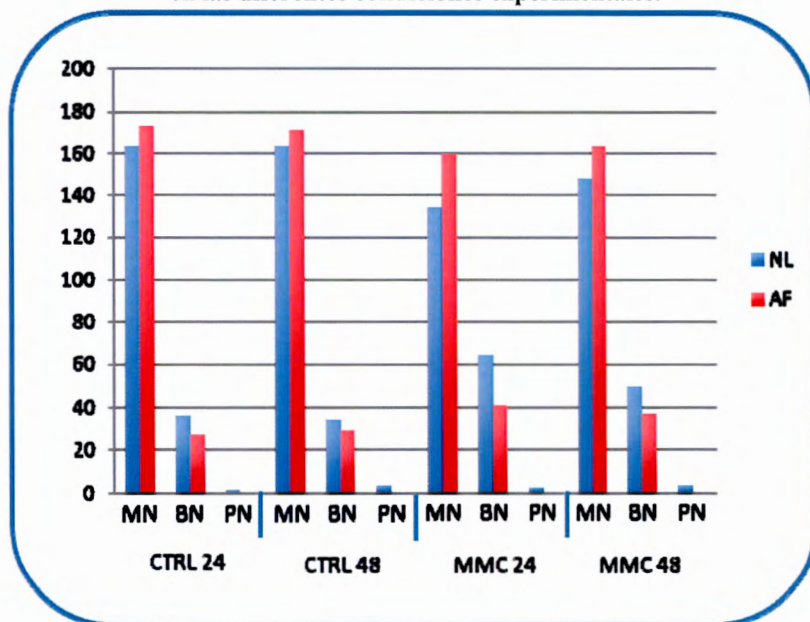
Gráfica 2. Promedios del índice nuclear para las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 en las diferentes condiciones experimentales.



3) Cantidad de células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas

En la Gráfica 3 se exponen los promedios de la cantidad de células MN, BN y PN en las distintas condiciones experimentales.

Gráfica 3. Promedios la cantidad de mononucleadas, binucleadas y polinucleadas para las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 en las diferentes condiciones experimentales.



El tiempo de cosecha parece no afectar la distribución de las células, y la exposición a MMC incrementa la cantidad de células BN. En este caso llama la atención que la cantidad de células MN de la línea AF siempre es mayor que el de la línea normal, a diferencia de las células BN y PN que siempre son mayores en la línea normal.

II. ANÁLISIS COMPARATIVO

En esta sección se llevará a cabo el análisis estadístico necesario para comprobar si existen diferencias entre, por una parte el valor de las variables

bajo distintas condiciones experimentales al interior de una misma línea celular, y por otra, el valor de dichas variables entre las dos líneas celulares estudiadas.

1) Diferencias dentro de la misma línea celular

a) Línea celular NL-49

Puesto que diferentes muestras de la misma población de células NL-49 fueron evaluadas en distintas condiciones experimentales, las mediciones de las variables de estas muestras se consideran dependientes del tiempo y de la exposición al tratamiento.

Diferencias por tiempo

Debido a lo anterior, se utilizó la prueba de diferencia de medianas para variables dependientes de Wilcoxon para comprobar si existen diferencias significativas como resultado de los tiempos de cosecha, tanto en caso de haber sido expuestas o no al efecto de la MMC.

Ninguna de las pruebas realizadas alcanzó significancia estadística. Por lo tanto se puede decir que el momento en el que se realiza la cosecha no produce variaciones significativas en IM, IN ni en la cantidad de MN, BN y PN de la línea celular NL-49.

En la Tabla 9 se exponen los resultados de dichas pruebas.

Tabla 9. Prueba de Wilcoxon para variables dependientes de células NL-49 por tiempo

Experimento	24 horas	48 horas	Wilcoxon	p
IM CTRL	1.112	1.989	-1.604	0.109
IM MMC	1.112	1.266	-0.535	0.593
IN CTRL	1.185	1.365	-1.604	0.109
IN MMC	1.185	1.285	-1.604	0.109
MN CTRL	164	128	-1.604	0.109
BN CTRL	35	71	-1.069	0.285
PN CTRL	1	2	-0.447	0.655
MN MMC	164	146	-1.633	0.102
BN MMC	35	50	-1.633	0.102
PN MMC	3	3	-0.272	0.785

Diferencias por exposición a tratamiento

De la misma manera, se utilizó la prueba de Wilcoxon para investigar si existen diferencias significativas producidas por la exposición a MMC tanto a las 24 horas como a las 48 horas de cosecha. Estos resultados se exponen a continuación.

Tabla 10. Prueba de Wilcoxon para variables dependientes de células NL-49 por tratamiento

Experimento	CONTROL	MMC	Wilcoxon	p
IM 24	1.112	1.112	-0.272	0.785
IM 48	1.989	1.266	-1.633	0.102
IN 24	1.185	1.185	0.000	1.000
IN 48	1.365	1.285	-1.069	0.285
MN24	164	164	0.000	1.000
BN24	35	35	-0.272	0.785
PN24	1	3	-0.816	0.414
MN48	128	146	-1.069	0.285
BN48	71	50	-1.069	0.285
PN48	2	3	-1.342	0.180

Nuevamente, ninguno de estos resultados fue significativo estadísticamente. Por ende, la exposición a MMC no produce un efecto específico sobre IM, IN ni sobre la cantidad de MN, BN y PN en la línea celular NL-49.

b) Línea celular AF-A VU817

También se estudió la línea celular AF-A VU817, bajo distintas condiciones experimentales, por lo que la medición de sus variables también se consideran dependientes.

Diferencias por tiempo

Los resultados de las observaciones fueron sometidas a la prueba de Wilcoxon para definir si existen diferencias significativas causadas por el momento de la cosecha, tanto en el grupo que fue expuesto a MMC como en el que no. A continuación, la Tabla 11 resume estos datos.

Tabla 11. Prueba de Wilcoxon para variables dependientes de células AF-A VU817 por tiempo

Variable	Control	MMC	Z	P
IM CTRL	3.093	3.466	-0.535	0.593
IM MMC	1.833	1.678	-1.069	0.285
IN CTRL	1.120	1.200	-1.604	0.109
IN MMC	1.145	1.195	-1.069	0.285
MN CTRL	176	160	-1.604	0.109
BN CTRL	24	40	-1.604	0.109
PN CTRL	0	0	-1.000	0.317
MN MMC	171	161	-1.069	0.285
BN MMC	29	39	-1.069	0.285
PN MMC	0	0	0.000	1.000

Estos resultados tampoco demuestran significancia estadística. Al igual que para la línea celular NL-49, el momento de la cosecha no es un factor que condicione un cambio significativo en IM, IN ni en la cantidad de MN, BN y PN de las células AF-A VU817.

Diferencias por exposición a tratamiento

Por último, la prueba de Wilcoxon también fue utilizada para investigar si existen diferencias significativas entre las variables estudiadas de esta línea celular que puedan explicarse por el efecto de la MMC en los dos momentos en los que se realizó la medición. Se muestran los resultados en la Tabla 12.

Tabla 12. Prueba de Wilcoxon para variables dependientes de células AF-A VU817 por tratamiento

Experimento	CONTROL	MMC	Wilcoxon	p
IM 24	3.093	1.833	-1.604	0.109
IM 48	3.466	1.678	-1.604	0.109
IN 24	1.120	1.145	-0.535	0.593
IN 48	1.200	1.195	0.000	1.000
MN 24	176	171	-0.535	0.593
BN 24	24	29	-0.535	0.593
PN 24	0	0	0.000	1.000
MN 48	160	161	0.000	1.000
BN 48	40	39	0.000	1.000
PN 48	0	0	-1.000	0.317

Puesto que estos resultados no demostraron significancia estadística, se puede decir que la exposición a MMC tampoco produce un efecto

significativo sobre IM, IN ni sobre la cantidad de MN, BN y PN en la línea celular AF-A VU817.

En resumen, se puede concluir que para las dos líneas celulares estudiadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en IM, IN ni en la cantidad de MN, BN y PN que se expliquen por el momento en que se realizó la cosecha ni por el efecto del tratamiento con MMC. Es decir que dentro de la misma línea celular, ni el momento de la cosecha ni la exposición al tratamiento son factores que modifiquen las variables estudiadas.

2) Diferencias entre las líneas celulares

Las comparaciones que se realizan entre variables independientes de muestras diferentes, como es el caso cuando se comparan los resultados de las observaciones de las mismas variables en dos líneas celulares diferentes, deben abordarse con pruebas que permitan identificar un cambio en su localización en la distribución. La prueba de diferencia de medianas independientes o U de Mann-Whitney, es la indicada en este caso.

a) Cosecha a las 24 horas

Sin tratamiento

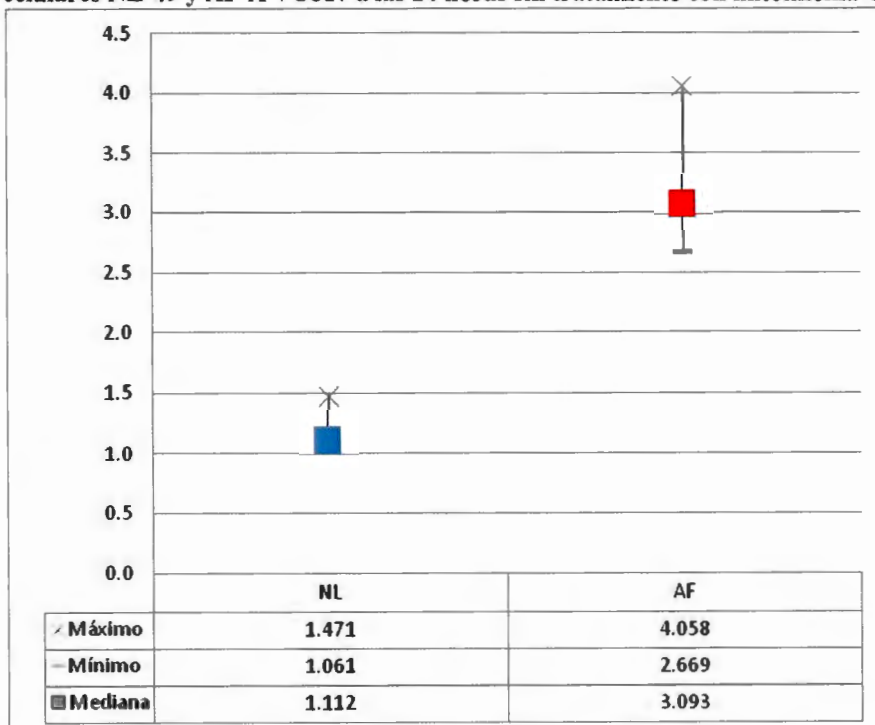
Los resultados de la prueba de Mann-Whitney para las distintas variables a las 24 horas de cosecha cuando no hubo exposición a MMC se presentan a continuación.

Tabla 13. Prueba de Mann-Whitney para comparación de variables independientes entre líneas celulares a las 24 horas de cosecha sin exposición a mitomicina C

IM	1.112	3.093	0.000	0.046*
IN	1.185	1.120	1.000	0.127
MN	164	176	1.500	0.184
BN	35	24	2.500	0.376
PN	1	0	1.500	0.121

La única variable que mostró una diferencia estadísticamente significativa al comparar los resultados entre las dos líneas celulares fue el IM. En este caso, el IM de las células AF-A VU817 resultó ser significativamente mayor que el de las células NL-49. La Gráfica 4 muestra las distribuciones de los índices mitóticos de ambas líneas celulares y se observa claramente que la localización de las distribuciones no se traslapan por lo que pueden considerarse diferentes.

Gráfica 4. Comparación de las distribuciones de los índices mitóticos de las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 a las 24 horas sin tratamiento con mitomicina C



En condiciones basales (sin tratamiento y a las 24 horas de cosecha), hay una mayor cantidad de células AF-A VU817 que inician la mitosis, mientras que no hay diferencias entre la cantidad de células que terminan la mitosis entre las dos líneas celulares. Estos resultados podrían deberse a que las células AF-A VU817 están alargando su estancia en mitosis y no se alcanza a ver su culminación, o bien podría ser el resultado de su muerte durante la división celular.

No se encontraron diferencias significativas en el número de células MN, BN y PN entre las dos líneas celulares en estas condiciones experimentales, lo cual indica que las células AF-A VU817 pueden ser tan capaces como las células NL-49 de proseguir en el ciclo celular bajo estas condiciones.

Con tratamiento

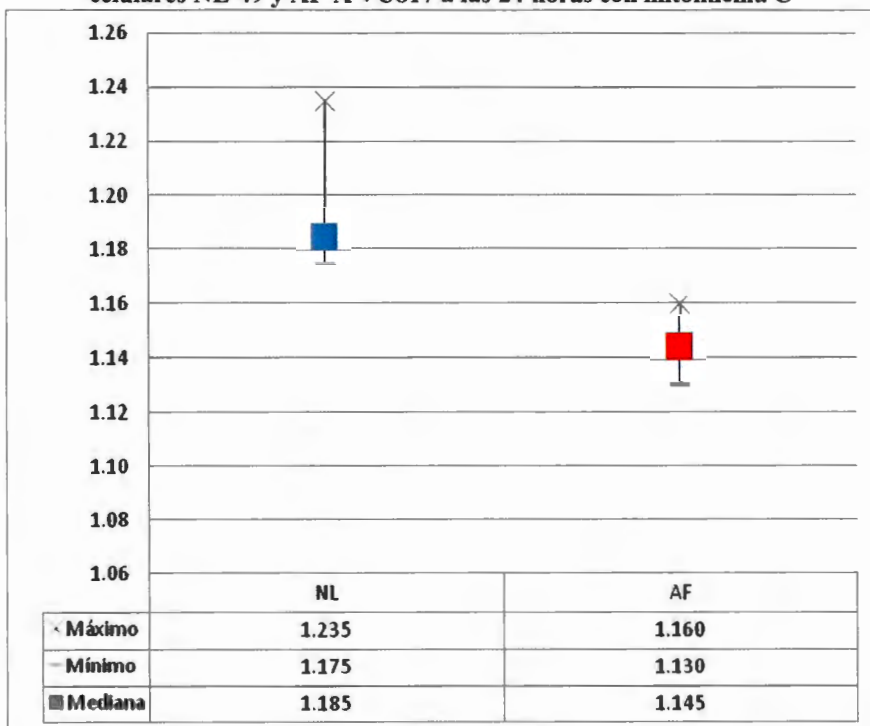
En la Tabla 14 se presentan los resultados de la prueba de Mann-Whitney para diferencias entre las variables a las 24 horas de cosecha cuando hubo exposición a MMC.

Tabla 14. Prueba de Mann-Whitney para comparación de variables independientes entre líneas celulares a las 24 horas de cosecha posterior a exposición a mitomicina C

Variable	NL-49	AF-A VU817	Z	P
IM	1.112	1.833	3.000	0.513
IN	1.185	1.145	0.000	0.050*
MN	164	171	0.500	0.077
BN	35	29	1.500	0.184
PN	3	0	0.000	0.037*

En estas condiciones experimentales, se encontraron dos variables para las que se encuentran diferencias significativas entre líneas celulares. En primer lugar, se identificó que el IN de las células NL-49 es mayor que el de las células AF-A VU817, esto puede observarse en la Gráfica 5.

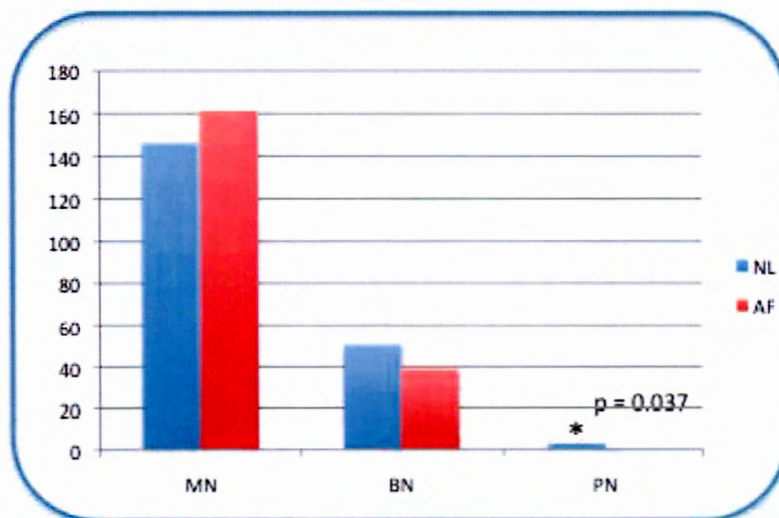
Gráfica 5. Comparación de las distribuciones de los índices nucleares de las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 a las 24 horas con mitomicina C



Comparado con las condiciones basales, no se observa la mayor cantidad de células AF-A VU817 que entran a mitosis. Es posible que el efecto de la MMC sobre estas células sea el de evitar la división celular, ya sea deteniendo a las células en interfase o afectando su supervivencia. El IN mayor en células NL-49 también indica que estas células están mejor adaptadas para concluir la mitosis en condiciones adversas.

En segundo lugar, se identificó que el número de PN en la línea celular NL-49 es mayor que el de la línea AF-A VU817, en la cual, de hecho, no se encontraron PN.

Gráfica 6. Comparación de las medianas del número de mononucleadas, binucleadas y polinucleadas de las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 posterior al tratamiento con mitomicina C a las 24 horas



Este resultado es congruente con la observación previa, puesto que la ausencia de células PN en la línea celular AF-A VU817 es indicativa de que no están logrando completar más de un ciclo celular. El hecho de que no se observe un aumento en el número de células BN indicativo de que las células se están acumulando en interfase, podría sugerir que en presencia de MMC, las células AF-A VU817 se concentran en la interfase que precede a la primera mitosis o mueren después de esta.

b) Cosecha a las 48 horas

Sin tratamiento

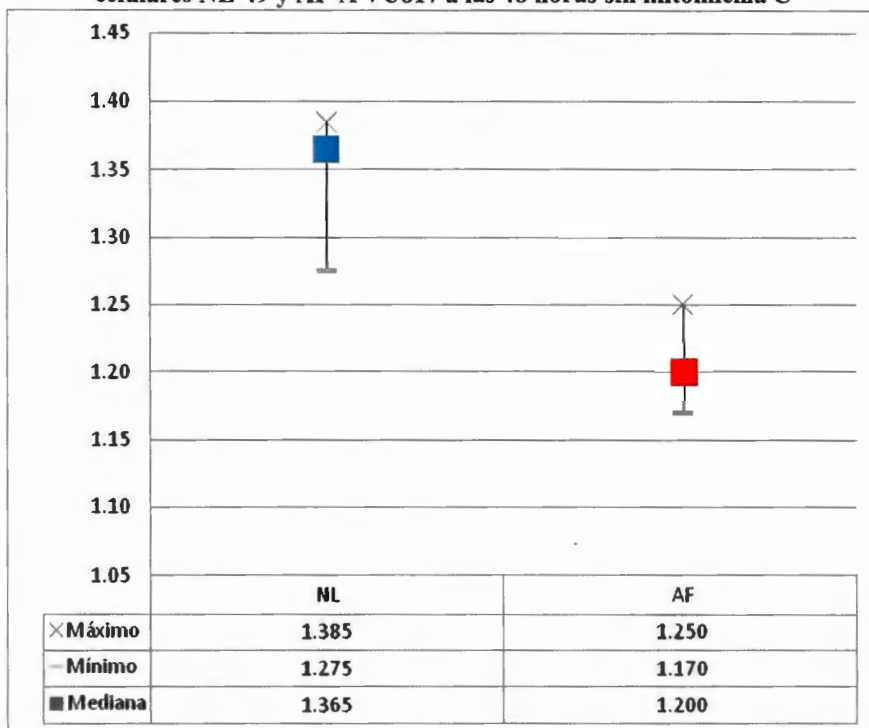
La prueba de Mann-Whitney, aplicada a las variables obtenidas a las 48 horas de cosecha cuando no hubo exposición a MMC, arrojó los siguientes resultados.

Tabla 15. Prueba de Mann-Whitney para comparación de variables independientes entre líneas celulares a las 48 horas de cosecha sin exposición a mitomicina C

IM	1.989	3.466	1.000	0.127
IN	1.365	1.200	0.000	0.050*
MN	128	160	0.000	0.050*
BN	71	40	1.000	0.127
PN	2	0	0.500	0.072

En este caso también se encontraron dos variables para las que se comprobaron diferencias significativas. Por un lado, el IN de las células NL-49 es mayor que el de las AF-A VU817, expuesto en la Gráfica 7.

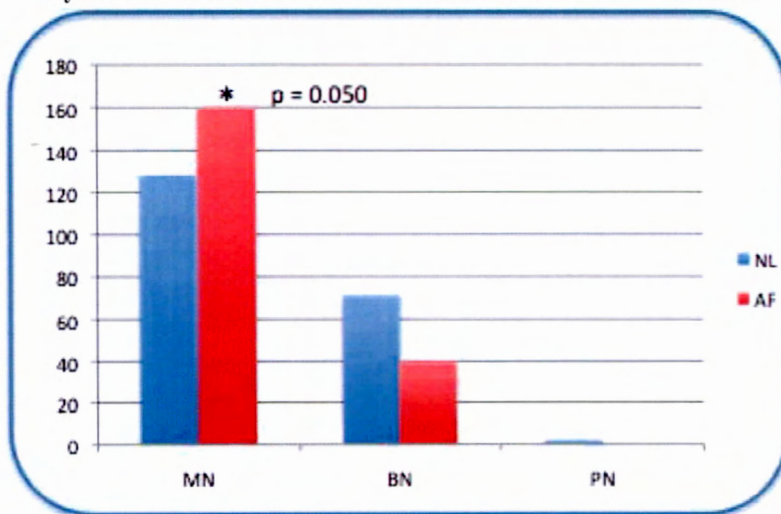
Gráfica 7. Comparación de las distribuciones de los índices nucleares de las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 a las 48 horas sin mitomicina C



Al igual que en el caso anterior, no se observa el exceso de células AF-A VU817 que entran a mitosis. A su vez, el mayor IN en células NL-49, sería indicativo de que estas células están mejor adaptadas para concluir la mitosis a pesar del tiempo de cultivo más prolongado.

La otra variable en la que se observaron diferencias significativas entre líneas celulares fue el número de células MN que resultó ser mayor en la línea AF-A VU817.

Gráfica 8. Comparación de las medianas de MN, BN y PN de las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 sin tratamiento con mitomicina C a las 48 horas



Este resultado apoya la observación previa. Existe una mayor cantidad de células mononucleadas AF-A VU817 ya que no están logrando progresar en el ciclo celular para ser detectadas como binucleadas. Esto apoya el supuesto de que las diferencias se deben a que las células AF-A VU817 se están acumulando en interfase.

Con tratamiento

Finalmente, la comparación de variables entre líneas celulares, utilizando la prueba de Mann-Whitney a las 48 horas de cosecha posterior a la exposición a MMC, muestra los siguientes resultados.

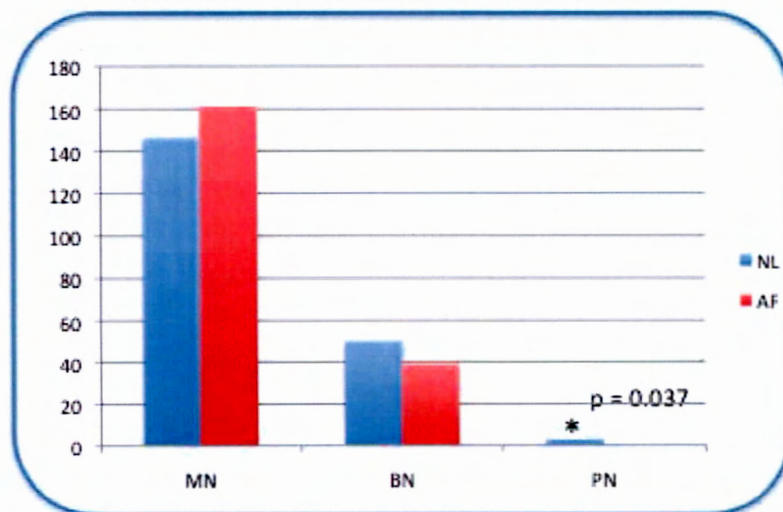
Tabla 16. Prueba de Mann-Whitney para comparación de variables independientes entre líneas celulares a las 48 horas de cosecha sin exposición a mitomicina C

Experimento	N ₁	N ₂	U ₁	U ₂
IM	1.266	1.678	2.000	0.275
IN	1.285	1.195	1.000	0.127
MN	146	161	1.000	0.127
BN	50	39	2.500	0.376
PN	3	0	0.000	0.037*

En este caso, no se observaron diferencias entre el IM e IN de las líneas celulares.

Sin embargo, sí se observaron diferencias en el número de PN entre ambas líneas celulares. Se observó una mayor cantidad de células PN en la línea normal.

Gráfica 9. Comparación de medianas de MN, BN y PN de las líneas celulares NL-49 y AF-A VU817 con tratamiento con mitomicina C a las 48 horas.

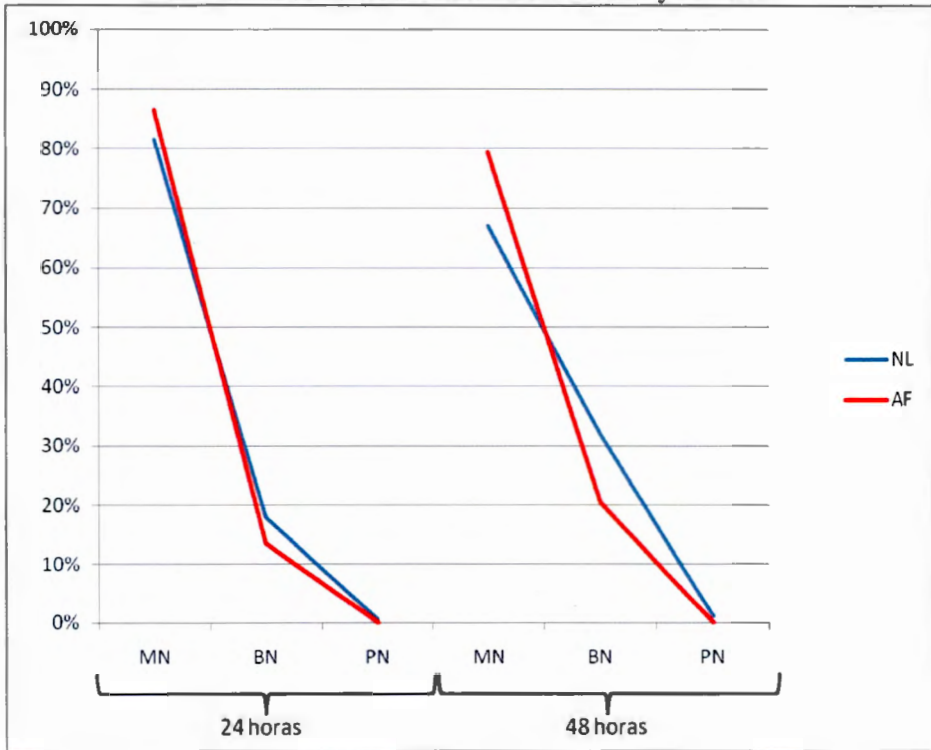


Nuevamente, la detección de células PN en la línea celular NL-49 es indicativa de que estas células son capaces de proseguir en el ciclo celular mientras que las células AF-A VU817 no lo son.

c) Comportamiento en el tiempo

La comparación en el tiempo de la distribución entre los tipos de células es un reflejo de la cinética del ciclo de ambos tipos celulares. La Gráfica 10 es una representación en el tiempo del comportamiento basal de las células.

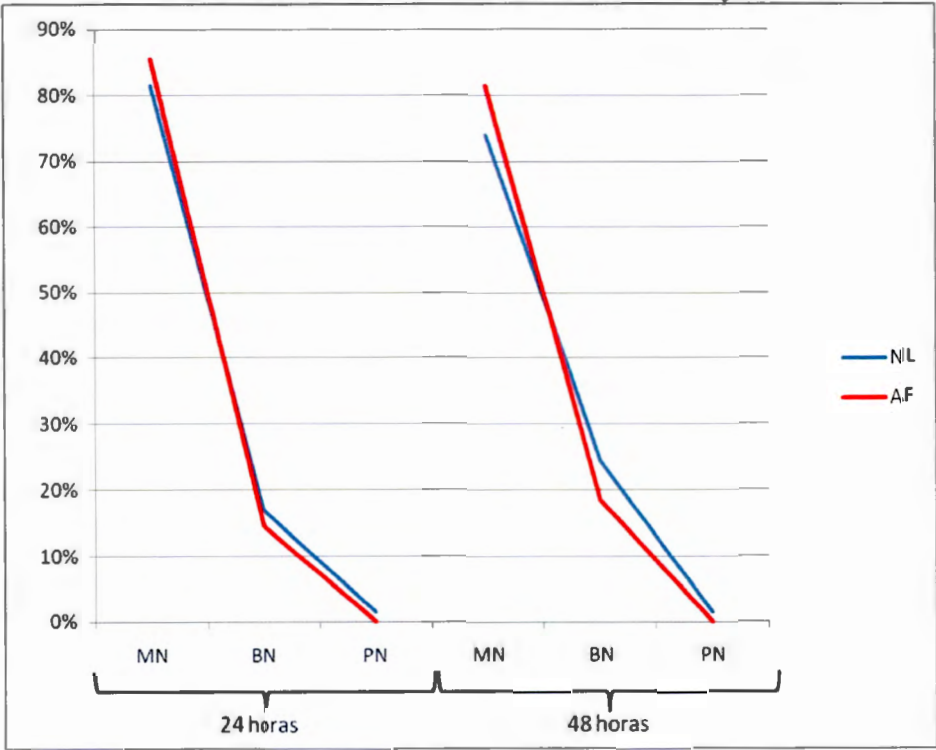
Gráfica 10. Comparación de proporciones de MN, BN y PN entre líneas celulares sin tratamiento a las 24 y 48 horas.



Se observa que para ambos momentos, la línea AF tiene una mayor proporción de células MN, lo que indica un retraso en la transición al siguiente ciclo celular en comparación con la normal. Es de notarse que a las 48 horas, la parte central de la curva que representa a la línea normal se desplaza a la derecha. Extrapolando esta tendencia, se esperaría que a mayor tiempo este desplazamiento diera lugar a un cambio en la concavidad de la curva respecto de la de 24 horas.

Cuando se hace la misma comparación en células expuestas a MMC, se observa que tanto la línea normal como la AF muestran retraso en comparación con las que no fueron sometidas a tratamiento. Este comportamiento es congruente con los resultados previamente expuestos.

Gráfica 11. Comparación de proporciones de MN, BN y PN entre líneas celulares con tratamiento con MMC a las 24 y 48 horas.

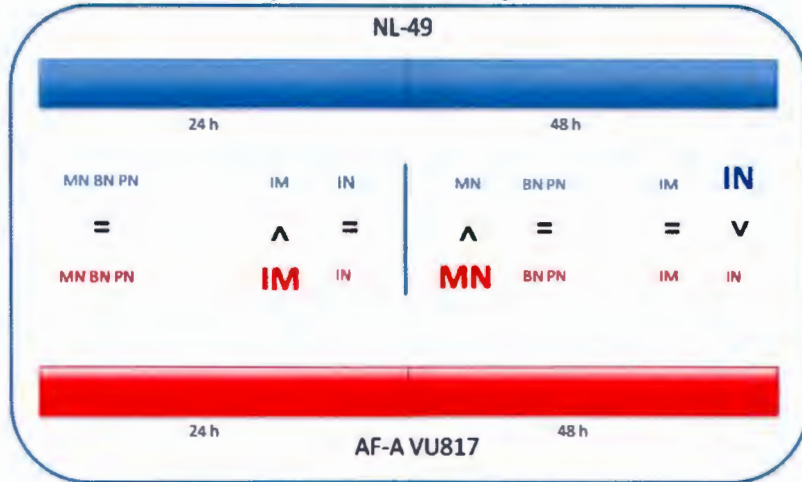


Solamente algunas de las diferencias observadas en el análisis descriptivo resultaron ser significativas. Es posible que esto se deba a un bajo número de observaciones. Los valores de p para la prueba de Mann-Whitney

de algunas variables (cantidad de MN con tratamiento a las 24 horas, cantidad de PN sin tratamiento a las 48 horas) entre líneas celulares tienen tendencia a la significancia. Esta observación, aunada a que el análisis descriptivo sugiere que el comportamiento de las variables sigue una tendencia, permite inferir que al aumentar el número de repeticiones es posible que se alcance la significancia estadística deseada.

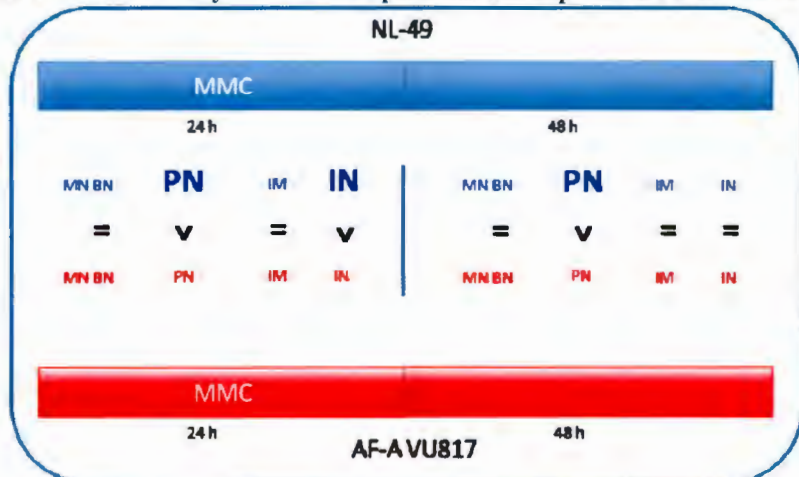
A continuación, se expone gráficamente el resultado de las comparaciones entre las variables estudiadas en ambas líneas celulares en los dos tiempos de cosecha, resaltando aquellas comparaciones que sí fueron estadísticamente significativas. El esquema 5a contiene dicha información cuando no hubo exposición a MMC.

Esquema 5a. Resumen de resultados de la comparación de índice mitótico, índice nuclear, mononucleadas, binucleadas y polinucleadas entre células NL-49 y AF-A VU817 sin exposición a mitomicina C



También se presentan gráficamente estos resultados cuando las líneas celulares fueron expuestas a MMC.

Esquema 5b. Resumen de resultados de la comparación de índice mitótico, índice nuclear, mononucleadas, binucleadas y polinucleadas entre células NL-49 y AF-A VU817 posterior a la exposición a mitomicina C



J. DISCUSIÓN

La anemia de Fanconi es un excelente modelo de estudio para el funcionamiento y la regulación del mecanismo de reparación de ICL. Como se expuso en este trabajo, la vía AF coordina varios sistemas de reparación y ejerce una vigilancia estrecha sobre la progresión del ciclo celular.

En este trabajo, estudiamos las diferencias en las capacidades para iniciar y concluir la mitosis de una línea celular AF-A y otra normal, expuestas a MMC durante 24 horas, seguidas o no de 24 horas de recuperación. Se midieron el IM e IN, así como la cantidad de MN, BN y PN de ambos tipos celulares en las distintas condiciones experimentales, para investigar su eficiencia en el inicio y la conclusión de la mitosis. Los resultados obtenidos indican que, dentro de la misma línea celular, tanto para la AF-A como la normal, ni la exposición al tratamiento ni la oportunidad de tiempo de recuperación afectaron significativamente el comportamiento de las células. También se evidenció que el IM de las células AF-A tiende siempre a ser mayor que el de las células normales, mientras que para el IN esta relación se invierte. Por su parte, el análisis de la cantidad de células MN, BN y PN sugiere que las células AF-A completan menos ciclos celulares que las células normales.

I. REVISIÓN DE LOS ANTECEDENTES DIRECTOS

Este trabajo fue motivado inicialmente por un estudio previo en el laboratorio donde se realizó este trabajo, en el cual se observó un aumento en el IM posterior a la exposición a MMC en todas las líneas que se estudiaron (Molina, et al. 2010). Atribuyeron esto a que en células AF, aunque se alcanza el daño necesario para activar el punto de monitoreo G2/M con una menor exposición a un agente tóxico que en células normales, las células AF no se detienen o mueren y progresan a fase M, provocando que ante el mismo estímulo nocivo, una mayor cantidad de células AF se acumulen en mitosis (Heinrich, et al. 1998). Otra explicación podría ser que las células tratadas con MMC se estacionen en el ciclo celular de manera diferente de acuerdo a su origen AF o normal; al respecto Islaih *et al.* estudiaron el efecto de varios compuestos químicos sobre la cinética del ciclo celular y observaron que las células de una línea linfoblastoide tratadas con MMC por 4 horas, se encuentran arrestadas en G2/M hasta 24 horas después del tratamiento (Islaih, et al. 2005). En el presente trabajo, además de tratar de corroborar la observación de Molina *et al.*, se exploró si las células que inician la división celular son capaces de concluirla.

En la serie de experimentos reportados en este trabajo, el incremento del IM en respuesta a la MMC, no se comprobó para ninguna de las condiciones

experimentales. Los IM obtenidos distan de los reportados por Molina *et al.* como consta en la siguiente tabla.

Tabla 17. Comparación de los resultados de Índices Mitóticos* en Molina *et al.* y el presente trabajo

	Mediciones de Molina <i>et al.</i>	Mediciones de este trabajo
Sin tratamiento		
Línea celular normal	2.4 ±0.2	1.2 ±0.2
Línea celular AF	3.4 ±0.9	3.3 ±0.7
Con tratamiento		
Línea celular normal	2.9 ±0.5	1.2 ±0.3
Línea celular AF	3.8 ±1.0	1.5 ±0.8
Líneas celulares		
Normal	NL-6846	NL-49
AF	AF-A HSC-72	AF-A VU817

* A las 24 horas de cultivo

Cuando se compara el IM de las células normales entre los dos experimentos tanto con exposición a MMC como en ausencia de ésta, las diferencias son evidentes: los IM reportados por Molina *et al.* son hasta de más del doble de los encontrados en este trabajo. Asimismo, en comparación con los resultados que aquí se presentan, el IM de las células AF-A que no se expusieron a MMC es prácticamente el mismo, mientras que el IM de las células que sí se expusieron es menor a la mitad.

En este trabajo, la relación de los IM de células AF-A con o sin exposición al tratamiento difiere de lo esperado; se esperaría una relación inversa que reflejara el retardo en el ciclo celular condicionado por la MMC.

El aumento del IM posterior a la exposición a MMC en líneas celulares AF-A VU817 y NL-49 no se comprobó.

Una posible explicación es que se utilizaron líneas celulares distintas. Molina *et al.* utilizaron las líneas celulares NL-6846 y AF-A HSC-72 mientras que en este trabajo se utilizaron las líneas NL-49 y AF-A VU817. El cambio en las líneas celulares utilizadas se debió a que, por una parte la línea NL-6846 se hizo sensible a MMC y dejó de ser un buen punto de comparación y por otra las reservas disponibles en el laboratorio de la línea AF-A HSC-72 se agotaron.

II. COMPARACIONES DENTRO DE LA MISMA LÍNEA CELULAR

El siguiente punto a discutir es la ausencia de diferencias en el IM, IN y la cantidad de MN, BN y PN dentro de cada una de las líneas celulares estudiadas en las distintas condiciones experimentales planteadas. Por los resultados obtenidos, se puede decir que ni la exposición al tratamiento ni el momento de la cosecha generan diferencias en el comportamiento de las células estudiadas.

La constatación previa es de extrema importancia para el análisis que se realizará a continuación. La demostración de que las condiciones experimentales no influyen en el comportamiento de las células pertenecientes

a la misma línea, permite afirmar que las diferencias que se encontraron al comparar las dos líneas celulares reflejan las características que separan a estos dos tipos celulares y no las de las condiciones experimentales.

III. COMPARACIONES ENTRE LÍNEAS CELULARES

1) Experimentos sin tratamiento

En condiciones basales, se observó que hay una mayor cantidad de células AF-A VU817 que inician la mitosis en comparación con las NL-49. Es bien sabido que las células AF presentan un ciclo celular más lento a expensas de una fase G2/M más prolongada en respuesta a una falla en el punto de monitoreo de S, que permite la progresión del ciclo celular a pesar de la presencia de horquillas de replicación colapsadas (Heinrich, et al. 1998) (Sala-Trepat, et al. 2000). Este mayor número de células AF al inicio de la mitosis podría ser reflejo de esto, o bien puede deberse a que se están retrasando en el compartimiento de la fase M. Puesto que la metodología utilizada es estática y no permite ver la progresión de las células en el tiempo, el IM observado únicamente refleja el estado de las células 24 horas después del inicio del cultivo, momento en el que se observa la acumulación de células AF en G2/M.

Cuando los cultivos se dejaron durante 48 horas sin exposición a MMC, se observó que las células AF tienen un IN menor que las normales y fue

evidente que las células AF presentaron una mayor cantidad de células MN que las normales.

Las células MN son aquellas que no han completado mitosis alguna durante el tratamiento con citocalasina. El detectar una mayor cantidad de células MN en la línea celular AF, también es una manifestación del retraso en G2/M que caracteriza a estas células. Por su parte, el mayor IN de las células normales refleja que hay una mayor cantidad de linfocitos que están transitando por los ciclos celulares, lo que se correlaciona con lo anterior.

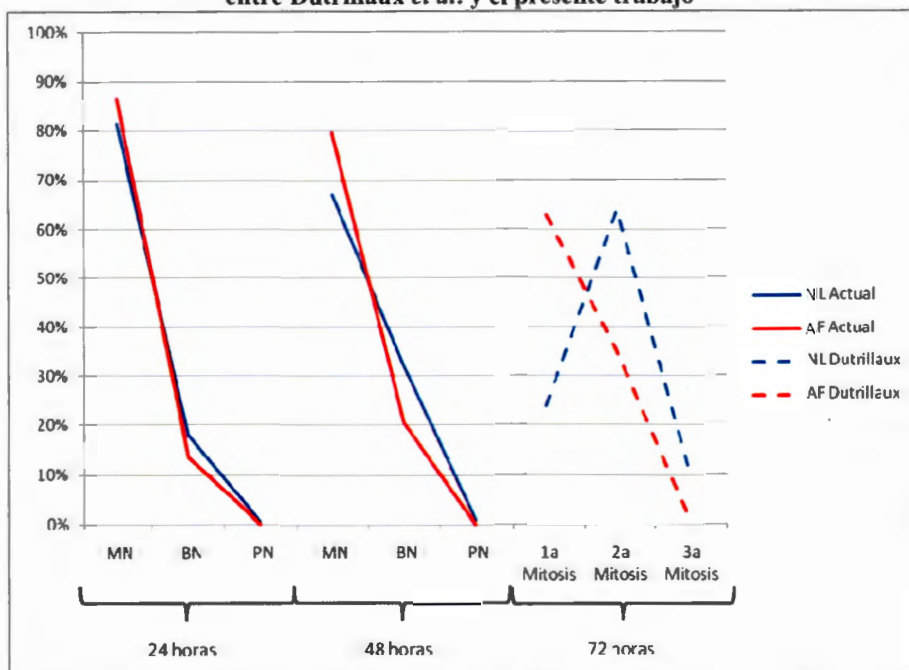
Dutrillaux *et al.* estudiaron el ciclo celular de linfocitos AF, por medio de experimentos de incorporación de Brd-U y observaron que en linfocitos AF en cultivo por 72 horas había un mayor número de mitosis de primer ciclo y una ausencia de mitosis de tercer ciclo, comparados con células normales (Dutrillaux, et al. 1982).

La metodología utilizada en el presente trabajo, no permite ver directamente en las mitosis a qué número de ciclo celular corresponde. Sin embargo, el análisis de la cantidad de MN, BN y PN permite ubicar la distribución de las células en los ciclos celulares consecutivos. Así, la cantidad de células MN representa la proporción de linfocitos que aún no han iniciado división celular alguna y sería una población no estudiada en el trabajo de

Dutrillaux. Mientras que la cantidad de células BN representa la proporción de linfocitos que han completado una mitosis y es la población que Dutrillaux identifica como aquellos que se encuentran en la primera mitosis. Finalmente la cantidad de células PN representa la proporción de linfocitos que han completado al menos dos mitosis y abarca las poblaciones que Dutrillaux clasifica como segunda y tercera mitosis.

En la Gráfica12 se comparan los resultados obtenidos en ambos trabajos.

Gráfica 12. Comparación de proporciones de células en ciclos celulares consecutivos entre Dutrillaux *et al.* y el presente trabajo



Este trabajo explora la cinética del ciclo celular a las 24 y 48 horas mientras que Dutrillaux lo hizo a las 72 horas. A pesar de las diferencias temporales y metodológicas, los resultados parecen congruentes. Como se sugirió en la sección de Resultados, al permitir un mayor tiempo de cultivo, la parte central de la curva tiende a desplazarse a la derecha, invirtiendo su concavidad inicial. Esto se observa claramente para la línea celular normal. La comparación gráfica de los resultados de ambos estudios muestra que la curva de las células AF a las 72 horas en el de Dutrillaux tiene una forma similar a la de las células normales a las 48 horas del presente estudio. Esto muestra, una vez más, que la cinética del ciclo de las células AF está retrasada en comparación con la de las normales.

Cuando se analizan en conjunto los resultados de ambos estudios, considerando los diferentes tiempos utilizados, se observa que en linfocitos AF no expuestos a MMC, hay una mayor proporción de células que sólo pudieron completar una mitosis, respecto a las que completaron dos o más en comparación con las células normales; esto es indicativo de una mayor cantidad de células AF retrasadas, en espera de ingresar a mitosis.

En el estudio de Dutrillaux *et al.* también se observó que las mitosis de segunda división se convierten en la población predominante hasta después de

88 horas de cultivo (Dutrillaux, et al. 1982). En el presente trabajo, todos los experimentos se llevaron a cabo con un tiempo de cultivo menor que esto, por lo que no se puede observar este fenómeno.

La enorme proporción de células MN que se observan en este estudio representan células que aún no han iniciado alguna división celular. La mayor proporción de células MN en AF en comparación con las células normales, refleja un arresto o retraso en G2/M. Al observar los resultados en los dos tiempos de estudio, 24 y 48 horas de cultivo, se ve que a mayor tiempo hay una mayor proporción de células en el segundo ciclo celular. Esto es más evidente en las células normales, que además mostraron un ligero incremento en la proporción de células que terminan una segunda división celular, mientras que las AF en ningún momento alcanzan la segunda división.

Lo anterior coincide con lo reportado por Dutrillaux *et al.* respecto al arresto de los linfocitos AF en G2/M. Aunque por los tiempos de cultivo utilizados no se pudo observar la transición de la población celular hacia un segundo ciclo celular completo, los datos en el tiempo sugieren que dicho fenómeno podría observarse en caso de permitir cultivos más prolongados.

2) Experimentos con tratamiento con Mitomicina C

La exposición de los cultivos celulares a 24 horas de tratamiento con MMC, provocan que el IN de las células AF-A sea menor que el de las células NL y se observa que tanto a las 24 como a las 48 horas después del tratamiento con MMC, hay una mayor cantidad de PN en la línea NL, lo cual es indicativo que las células AF no se están moviendo a través del ciclo celular como las normales.

La MMC incrementó de manera significativa la acumulación de células AF en la fase G2/M del ciclo celular, como ha sido reportado previamente por otros autores (Seyschab, et al. 1994) (Islaih, et al. 2005), de manera que es muy probable que no llegaran a fase M, ya sea por el prolongado arresto o porque en lugar de entrar a mitosis tomaran el camino de la apoptosis. Así, no se observó un IM mayor en células AF.

La posibilidad de que las células AF sufran apoptosis está sustentada por Islaih *et al.*, quienes estudiaron el efecto de varios fármacos genotóxicos sobre el ciclo celular de una línea linfoblastoide. Estos autores encontraron que el tratamiento con MMC condicionó un aumento en los niveles de expresión de genes regulados por p53 relacionados con regulación del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis (Islaih, et al. 2005). Por su parte, Martínez *et*

al. reportaron que en células AF-A tratadas con MMC hubo un aumento en la transcripción de varios genes regulados por p53, entre los que se encuentra el gen TNRSF108 relacionado con apoptosis (Martínez, et al. 2008). En una revisión de los posibles mecanismos de muerte celular en células AF, Rodríguez-Gómez sugiere que ante el reconocimiento de daño irreparable durante las fases S y G2, la activación de la vía de p53 puede llevar al bloqueo de la progresión del ciclo celular para permitir la reparación del ADN o bien conducir a la célula a apoptosis (Rodríguez-Gómez 2009).

En conjunto, los resultados de estos experimentos sugieren lo siguiente:

La mayor cantidad de células MN, así como el mayor IM en la línea AF en todas las condiciones experimentales en comparación con las células normales indica que tienen un ciclo celular retrasado. Está bien descrito que este retraso ocurre a expensas de una mayor duración de la fase G2 (Seyschab, et al. 1994) (Islaih, et al. 2005), en estos experimentos el elevado porcentaje de MN refleja claramente esto. Sin embargo, ya que el IM identifica directamente a las células que se encuentran en metafase (una de las subfases de la mitosis) podemos decir que las células AF no sólo están detenidas en G2 sino también en fase M. Si se toma en cuenta que además el IN de las células AF es consistentemente más bajo que el de las células normales, podemos

sugerir que no sólo se trata de un retraso en el ciclo sino que podría estar arrestado e impedir el paso de las células hacia la siguiente interfase.

El siguiente punto que vale la pena comentar con respecto a la distribución de las células entre MN, BN y PN es que en todos los experimentos, la línea AF demostró la presencia de células BN lo que indica que al menos una parte de estas células, previamente retrasadas o arrestadas en mitosis son capaces de concluirla y proseguir al siguiente ciclo celular. La ausencia de células PN de anemia de Fanconi indica que su habilidad para transitar por ciclos celulares subsecuentes está restringida y que posiblemente estén muriendo en la interfase siguiente de la mitosis que recién concluyeron. Es posible que las células AF que logran completar la mitosis se encuentren condicionadas a morir.

La catástrofe mitótica, es un tipo de muerte celular que ocurre como resultado de daño genómico y la alteración de diversos puntos de monitoreo del ciclo celular. Esto permite la entrada a mitosis de células que deberían ser arrestadas durante la interfase para permitir la reparación del daño (Castedo, et al. 2004).

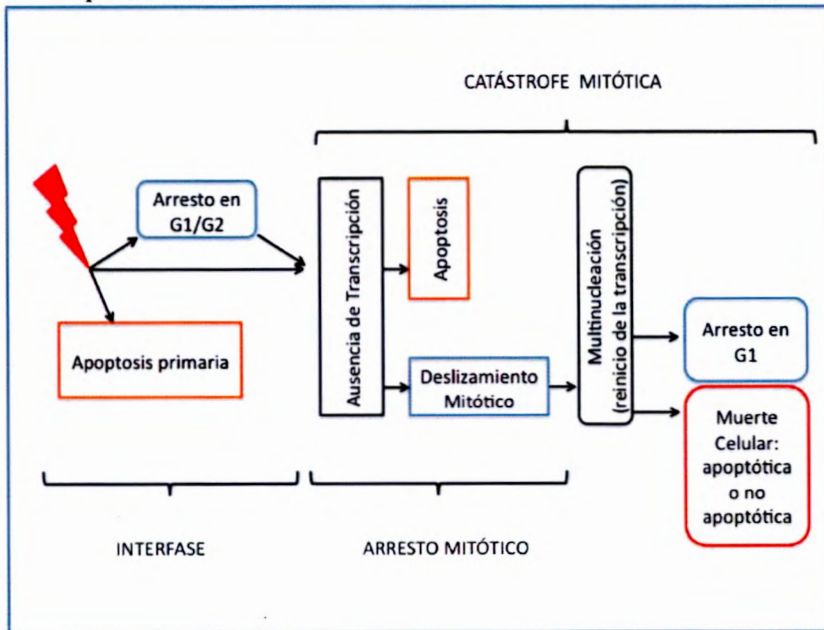
La revisión analítica de Blagosklonny, explica la serie de eventos que lleva a este tipo de muerte celular. Ante daño al ADN durante la interfase, las

células propensas a apoptosis sufrirán una muerte inmediata por este mecanismo antes de entrar a mitosis. En caso de que no mueran, los mecanismos de vigilancia de la integridad del genoma, deberían arrestar las células en G1 o G2 permitiendo la reparación de su genoma. Cuando los puntos de monitoreo del ciclo celular no funcionan correctamente, las células dañadas entran a mitosis y se arrestan en esta fase.

Durante la mitosis, para permitir la correcta segregación de los cromosomas, las células pierden su membrana nuclear. Esta estructura confiere una separación física entre los procesos de transcripción y traducción que permite su correcta regulación. Cuando esta barrera se pierde, para mantener la disociación de estos procesos, la transcripción se inhibe. El silenciamiento de la transcripción es la pieza clave que define el destino celular. Su ausencia, evita la síntesis de transcritos de proteínas antiapoptóticas, cuyos niveles decaen durante el arresto mitótico. Si las células arrestadas son propensas a apoptosis, esta depleción de factores antiapoptóticos será suficiente para promover la apoptosis I, un evento rápido independiente de p53. Sin embargo, si las células son resistentes a apoptosis, entonces el decaimiento de los niveles de ciclina B (principal regulador de la mitosis), provocará la salida de fase M de una célula con daño genómico. En

la siguiente interfase, esta célula está condicionada a morir ya sea por apoptosis tipo II, dependiente de p53 o por muerte no apoptótica lenta (Blagosklonny 2007). El Esquema 6, representa esto.

Esquema 6. Muerte celular a consecuencia de Catástrofe Mitótica



Tomado de (Blagosklonny 2007)

K. CONCLUSIONES

De la comparación entre las cinéticas de los ciclos celulares de las dos líneas estudiadas, podemos decir que aunque ambas líneas fueron capaces tanto de iniciar como de terminar la mitosis, existen diferencias en la eficiencia con la que lo hicieron.

Las células AF fueron capaces de iniciar y terminar la primera mitosis aunque más lentamente que las células normales. El tratamiento con MMC, agudizó el retraso al fomentar un mayor arresto en G2/M y la posible muerte de células con daño extremo. Sin embargo, tanto con MMC como sin exposición al tratamiento, las células AF fueron incapaces de llevar a cabo una segunda división celular.

El aumento del IM en respuesta a la exposición a MMC en linfocitos AF observado previamente en este laboratorio, sugería que las células con daño genómico eran capaces de iniciar la mitosis y llegar a metafase para ser observadas. Se supuso que el extenso daño al ADN que presentaban tendría que haber sido una señal suficiente para evitar su tránsito por el resto de la mitosis, por lo que se hubiera esperado que estas células murieran en subfases posteriores como la anafase. Sin embargo, aunque los resultados del estudio previo en relación con el aumento del IM ante la exposición a MMC no

podieron ser replicados, los resultados de este trabajo muestran que las células AF, expuestas o no a tratamiento, son capaces tanto de iniciar la mitosis como de terminarla y que una vez concluida la división celular, mueren utilizando alguno de los mecanismos de muerte celular. En este momento se desconoce cuál es el mecanismo que utilizan y la definición de esto deberá ser investigado experimentalmente en un futuro.

L. ANEXO DE RESULTADOS

La información contenida en la siguiente tabla se utilizó para construir los IM reportados en la sección de resultados. Estos se calcularon utilizando la fórmula:

$$IM = \frac{\text{número de metafases}}{2000} \times 100$$

Número de metafases detectadas de un total de 2,000 células consecutivas observadas en cada condición experimental en las 3 repeticiones efectuadas.

Experimento	R1	R2	R3
NLCTRL24	22	29	21
NLMC24	30	22	19
NLCTRL48	39	51	31
NLMC48	15	45	25
AFCTRL24	52	78	60
AFMC24	12	36	40
AFCTRL48	43	89	67
AFMC48	29	33	63

La información contenida en la siguiente tabla se utilizó para construir los IN reportados en la sección de resultados. Estos se calcularon utilizando la fórmula:

$$IN = \frac{(\text{número de MN}) + 2 \times (\text{número de BN}) + 3 \times (\text{número de PN})}{200}$$

Número de células MN, BN y PN detectadas de un total de 200 células consecutivas observadas en cada condición experimental en las 3 repeticiones efectuadas

	R1	R2	R3
MNCTRL24	164	176	179
BNCTRL24	36	24	21
PNCTRL24	0	0	0
MNMMC24	168	174	171
BNMMC24	32	26	29
PNMMC24	0	0	0
Experimento	R1	R2	R3
MNCTRL48	151	166	160
BNCTRL48	48	34	40
PNCTRL48	1	0	0
MNMMC48	180	161	149
BNMMC48	20	39	51
PNMMC48	0	0	0

M. Bibliografía

- Andreassen, P.R., and K. Ren. "Fanconi Anemia Proteins, DNA Interstrand Crosslink Repair Pathways and Cancer Therapy." *Current Cancer Drug Targets* 9 (2009): 101-117.
- Auerbach, A. "Fanconi Anemia and its diagnosis." *Mutation Research/Fundamental in Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668 (2009): 4-10.
- Blagosklonny, M V. "Mitotic Arrest and Cell Fate. Why and How Mitotic Inhibition of Transcription Drives Mutually Exclusive Events." *Cell Cycle* 6, no. 1 (January 2007): 70-74.
- Callén, E., and J. Surrallés. "Telomere dysfunction in genome instability syndromes. (S. Direct, Ed.)." *Mutation Research* 567 (2004): 85-104.
- Callén, E., J. Casado, S. Tishkowitz, and J. Bueren. "A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain." *Blood* 105 (5) (2005): 1946-1949.
- Castedo, M, J L Perfettini, T Roumier, K Andreau, R Medema, and G Kroemer. "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." *Oncogene* 23 (2004): 2825-2837.
- Ciccia, A., et al. "Identification of FAAP24, a Fanconi Anemia Core Complex Protein that Interacts with FANCM." *Molecular Cell* 25 (2007): 331-343.
- de Winter, J. P., and H Joenje. "The genetic and molecular basis of Fanconi anemia." *Mutation Research* 668 (2009): 11-19.
- Digweed, M., H. Hoehn, and K. Sperling. *Milestones in Fanconi Anemia Research*. Vol. 15, in *Fanconi Anemia. A paradigmatic Disease for the understanding of Cancer and Aging*, edited by D. Schindler and H. Hoehn, 21-38. Basel: Karger, 2007.
- Dokal, I. "Fanconi's anemia and related bone marrow failure syndromes." *British Medical Bulletin* 77 and 78 (2006): 37-53.
- Dorsman, J. C., et al. "Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI." *Cellular Oncology* 29 (2007): 211-218.
- Dronkert, M. L., and R. Kanaar. "Repair of DNA interstrand cross-links." *Mutation Research* 486 (2001): 217-247.
- Dufour, C., and J. Svahn. "Fanconi Anemia: new strategies." *Bone Marrow Transplantation* 41 (2008): S90-S95.
- Dutrillaux, B., A. Aurias, A. M. Dutrillaux, D. Buriot, and M. Prieur. "The Cell cycle of Lymphocytes in Fanconi Anemia." *Human Genetics* 62 (1982): 327-332.
- "Electronic Statistics Textbook." *Statsoft*. www.statsoft.com/textbook/nonparametric-statistics/ (accessed 2010 йил 10-07).
- Eyrick, M., B. Winkler, and P. G. Schlegel. *Stem Cell Transplantation in Fanconi Anemia - Recent Advances with Alternative Donors*. Vol. 15, in *Fanconi*

- Anemia A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cáncer and Aging*, edited by D. Schindler and H. Hoehn, 173-182. Basel: Karger, 2007.
- Fenech, M., and A. Morley. "Measurement of Micronuclei in lymphocytes." *Mutation Research* 147 (1985): 29-36.
- Frías, S, L. Gómez, B. Molina, E. Rojas, P. Ostrosky-Wegman, and A. Carnevale. "Effect of hydroxyurea and normal plasma on DNA synthesis in lymphocytes from Fanconi anemia patients." *Mutation Research* 357 (1996): 115-121.
- German, J., S. Schonberg, S. Caskie, D. Warburton, C. Falk, and J. H. Ray. "A Test for Fanconi's Anemia." *Blood* 69 (6) (1987): 1637-1641.
- Green, A. M., and K. M. Kupfer. "Fanconi Anemia." *Hematology/Oncology Clinics of North America* 23 (2009): 193-214.
- Hanlon Newell, A. E., et al. "Interstrand crosslink induces radials from between non homologous chromosomes but are absent in sex chromosomes." *DNA Repair* 3 (5) (2004): 535-542.
- Heinrich, M. C., et al. "DNA Cross-Linker- Induces G2/M Arrest in Group C Fanconi Anemia Lymphoblasts Reflects Normal Checkpoint Function." *Blood* 91 (1998): 275-287.
- Islaih, M, et al. "Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals." *Mutation Research* 578 (1-2) (2005): 100-116.
- Joenje, H, F Arwert, AW Eriksson, H de Koning, and AB Oostra. "Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia." *Nature* 290, no. 5802 (1981): 142-143.
- Kalb, R., K. Neveling, S. Herterich, and D. Schindler. *Fanconi Anemia Genes: Structure, Mutations, and Genotype-Phenotype Correlations*. Vol. 15, in *Fanconi Anemia A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging*, edited by D. Schindler and H. Hoehn, 39-58. Basel: Karger, 2007.
- Kee, Y., and A. D. D'Andrea. "Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability." *Genes and Development* 24 (2010): 1680-1694.
- Kim, J. M., Y. Kee, A. Gurtan, and A. D'Andrea. "Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24." *Blood* 111 (10) (2008): 5215-5222.
- Kutler, D. I., and A. D. Auerbach. "Fanconi Anemia in Ashkenazi Jews." *Familial Cancer* 3 (3-4) (2004): 241-248.
- Kutler, D. I., B. Singh, J. Satagopan, S. D. Batish, M. Berwick, and P. F. Giampietro. "A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)." *Blood* 101 (2003): 1249-1256.
- Leskovac, A., et al. "Fanconi Anemia is Characterized by Delayed Repair Kinetics of Double Strand-Breaks." *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221 (2010): 69-76.

- Ling, C., et al. "FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway." *EMBO Journal* 26 (8) (2007): 2104-2114.
- Lobitz, S., and E. Velleur. "Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades." *Nature Reviews Cancer* 6 (2006): 893-898.
- Martínez, A., et al. "Differential expression of TP53 associated genes in Fanconi Anemia cells after Mitomycin C and Hidroxyurea treatment." *Mutation Research* 656 (1-2) (2008): 1-7.
- Moldovan, G. L., and A. D. D'Andrea. "How the Fanconi anemia Pathway Guard the Genome." *Annual review of genetics* 43 (2009): 223-249.
- Molina, B., et al. "Hydroxyurea induces chromosomal aberrations in Fanconi anemia cells from complementation groups A, B, C, D1 and E." 2010: In process.
- Moreira, C. F., L. C. Brito-Junior, and J. R. Lemor. "Flow cytometry for Dyepoxybutane Test Analysis." *Genetics and Molecular Research* 7 (4) (2008): 1353-1359.
- Muniandy, P., J. Liu, A. Majumdar, S. Liu, and M. M. Seidman. "DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45 (1) (2010): 23-49.
- Neitzel, H., J. S. Kuhl, A. Gerlach, W. Ebell, and H. Tonnie. "Clonal Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Cells of Fanconi Anemia Patients: Results and Implications." In *Fanconi Anemia: A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging*, edited by D. Schindler and H. Hoehn, 79-94. Basel: Karger, 2007.
- Neveling, K., D. Endt, H. Hoehn, and D. Schindler. "Genotype-phenotype correlations in Fanconi Anemia." *Mutation Research and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668 (2009): 73-91.
- Neveling, K., R. Kalb, and D. Schindler. *Cancer in Fanconi anemia and Fanconi Anemia Genes in Cancer*. Vol. 15, in *Fanconi Anemia A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Ageing*, edited by D. Schindler and H. Hoehn, 59-78. Basel: Karger, 2007.
- Niedernhofer, L. J., A. S. Lalai, and H. J. Hoeijmakers. "Fanconi Anemia (Cross)linked to DNA Repair." *Cell* 123 (2005): 1191-1198.
- O'Donnell, L., and D. Durocher. "DNA Repair Has a New FAN1 Club." *Molecular Cell*, 2010: 167-169.
- Pagano, G., et al. "Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype." *European Journal of Hematology* 75 (2005): 93-100.
- Rego, M. A., I. V. Kolling, and N. G. Howlett. "The Fanconi anemia protein interaction network: casting a wide net." *Mutation Research and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668 (2009): 27-41.

- Reid, S., S. Schindler, H. Hanenberg, K. Barker, S. Hanks, and R. Kalb. "Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer." *Nature Genetics* 39 (2) (2007): 162-164.
- Rodriguez-Gómez, A. J. "Mecanismos de muerte celular en Anemia de Fanconi." *Tesis para obtener el título de Biólogo*. UNAM, 2009.
- Sala-Trepat, M., D. Rouillard, M. Escarceller, A. Laquerbe, E. Moustacchi, and D. Papadopoulo. "Arrest of S-Phase Progression Is Impaired in Fanconi Anemia Cells." *Environmental Cell Research* 260 (2000): 208-215.
- Sasaki, M. S., and A. Tonomura. "A High Susceptibility of Fanconi's Anemia to Chromosome Breakage by DNA Cross-linking Agents." *Cancer Research* 33 (1973): 1829-1836.
- Schindler, D., R. Friedl, R. Gavvovidis, R. Kalb, K. Neveling, and Y. Linka. *Applications of Cell Cycle Testing in Fanconi Anemia*. Vol. 15, in *Fanconi Anemia A Paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging*, edited by D. Schindler and H. Hoehn, 110-130. Basel: Karger, 2007.
- Seyschab, H., G. Bretzel, R. Friedl, D. Schindler, Y. Sun, and H. Hoehn. "Modulation of the spontaneous G2 phase blockage in Fanconi anemia cells by caffeine: differences from cells arrested by X-irradiation." *Mutation Research* 308 (1994): 149-157.
- Tamary, H., and B. Alter. "Current Diagnosis of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes." *Hematology and Oncology* 24 (2007): 87-99.
- Taniguchi, T., and A. D'Andrea. "Molecular pathogenesis of Fanconi Anemia: recent progress." *Blood* 107 (2006): 4223-4233.
- Tishkowitz, S., and V. Hodgson. "Fanconi anaemia." *Journal of Medical Genetics* 40 (2003): 1-10.
- Zhang, F., Q. Fan, K. Ren, A. D. Auerbach, and P. R. Andreassen. "FANCI/BRIP1 recruitment and regulation of FANCD2 in DNA damage responses." *Chromosoma*, 2010: Ahead of print.