

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

EFFECTO DE LA MITOMICINA-C E HIDROXIUREA EN LA ACTIVACIÓN DE ATM EN CÉLULAS AF-A

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
BIOL. DAVID ARTURO SOSA SÁNCHEZ

DIRECTORES DE TESIS

DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2010

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORES

Dra. Sara Frías Vázquez

Profesora investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México
e Instituto Nacional de Pediatría

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Mavil López Casamichana

Profesora investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Profesor investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Investigadora. Instituto Nacional de Pediatría

M en C. Bertha Molina Álvarez

Investigadora. Instituto Nacional de Pediatría

Este trabajo, forma parte de la línea de investigación “Porque las células de Fanconi –A incrementan la frecuencia de aberraciones cromosómicas por la aplicación de hidroxurea en fase G2” el cual es parcialmente apoyado por CONACyT (84259)

Agradezco Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico concedido mediante la beca otorgada en el periodo de Agosto 2008 a Agosto de 2010.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de citogenética del Instituto Nacional de Pediatría bajo la dirección de la Dra. Sara Frías Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres porque sin ellos no podría estar aquí, y porque las diferencias entre nosotros me han enseñado a ser una mejor persona.

Al Posgrado en Ciencias Genómicas por permitirme realizar mis estudios de maestría en un programa de alta calidad.

A los profesores del posgrado por las discusiones sostenidas a lo largo de mi estancia en el Posgrado.

En especial al Dr. Mauricio Castañón Arreola por el apoyo recibido en el uso del citómetro y análisis de datos, Dr. César López, y la Dra. Mavil López Casamichana por su crítica que logro hacer de este un mejor trabajo.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio de Citogenética del INP por todos los gratos momentos vividos dentro del laboratorio. En especial a la Dra. Bertha Molina por el incalculable apoyo en el análisis de metafases, al Biol. Alfredo por las discusiones en el lab que me ayudaron a entender mejor nuestros resultados y a la Dra. Leda Torres por brindarme sus enseñanzas y apoyo en el trabajo, pero aun más por brindarme su amistad.

Finalmente a la Dra. Sara Frías por darme la oportunidad de participar en este fabuloso grupo de trabajo, por la dirección del trabajo y la confianza que me otorgo.

DEDICATORIA

*A Rosy porque nunca has dejado de alentarme
para seguir adelante y sin tu apoyo y cariño
nunca hubiera podido lograr esto.*

A Sofí porque tu sonrisa hace que todo valga la pena.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
--------------------------	----------

ÍNDICE DE

FIGURAS.....	VI
---------------------	-----------

ÍNDICE DE

TABLAS.....	VII
--------------------	------------

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes generales.....	1
1.1.1. Vías de reparación del ADN.....	2
1.1.2. Reparación de rupturas de doble hebra.....	6
1.1.3. Síndromes de inestabilidad cromosómica	11
1.1.4. Vías de Señalización del daño en el ADN	27
1.2. Antecedentes Directos.....	30
2. HIPÓTESIS	32
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo general.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
5. METODOLOGÍA	35
5.1. Líneas celulares y tratamientos.....	35
5.2. Análisis del daño cromosómico	36
5.3. Análisis de expresión de los ARN mensajeros de ATM y ATR.....	36
5.3.1. Extracción de ARN total.....	36
5.3.2. Síntesis de ADN complementario (cDNA).....	37
5.4. Análisis de la activación de ATM en diferentes fases del ciclo celular por citometría de flujo.....	39

6.	RESULTADOS	41
6.1.	Daño cromosómico espontáneo e inducido por MMC e HU	41
6.2.	Análisis de expresión de los ARN mensajeros de ATR y ATM	45
6.2.1.	Expresión relativa de ATR	49
6.2.2.	Expresión relativa de ATM	53
6.3.	Análisis de activación de la proteína ATM en diferentes fases del ciclo celular por medio de citometría de flujo.	58
6.3.1.	Análisis de distribución en el ciclo celular	58
6.3.2.	Análisis de Activación de ATM	61
7.	DISCUSIÓN	65
8.	CONCLUSIONES	71
9.	BIBLIOGRAFÍA	72

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Micro gramos
µl	Micro litros
AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Anemia de Fanconi
AF/BRCA	Vía Anemia de Fanconi / Cáncer de mama
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	Proteína mutada en pacientes con ataxia telangiectasia
ATM-P	Proteína ATM fosforilada
ATR	Proteína relacionada con ataxia telangiectasia y con Rad3
ATRIP	Proteína de interacción con ATR
BASC	Complejo de vigilancia asociado a BRCA
BD	Compañía Becton Dickinson
BER	Sistema de reparación por escisión de nucleótidos
BRAFT	Complejo proteico formado por BML, RPA , AF y topoisomerasa III
BRCA1	Proteína 1 asociada a cáncer de mama
BRCA2	Proteína 2 asociada a cáncer de mama
BRIP1	Proteína de interacción con BRCA1
cDNA	ADN complementario
cel/ml	Células por mililitro
DNA-PK	Proteína cinasa dependiente de ADN
DNA-PKcs	Subunidad catalítica de la DNA-PK
dNTP's	deoxinucleotidos trifosfatados
DSB	Rupturas de doble hebra de ADN
EDTA	Acido etilendiaminotetraacetico
FAAP	Proteína asociada a anemia de fanconi

DEB	Diepoxibutano
FANC	Proteína de de complementación de anemia de fanconi
FANCD2-L	Forma larga de la proteína FANCD2
FANCD2-S	Forma corta de la proteína FANCD2
FAT	Dominio FRAP-ATM-TRRAP
FATC	Dominio C terminal FAT
FRAP	Proteína asociada a rampamicina FKBP-12
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Horas
HEAT	Dominio (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR)
HRR	Reparación por recombinación homóloga
HSP70	Proteína 70 de choque térmico
HU	Hidroxiurea
IL6	Interleucina 6
INF-γ	Interferon gamma
IR	Radiación ionizante
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de Potasio
KD	Dominio Cinasa
Kda	Kilodaltones
LP	Inserción larga
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
MLH1	Proteína homóloga a mutL
mM	Milimolar
MMC	Mitomicina C
MRN	Complejo proteico formado por MRE11, Rad 50 y NBS1
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
ng/ml	nanogramos por mililitro
NHEJ	Unión de extremos no homólogos

nm	Nanomolar
PALB2	Proteína compañera y localizadora de BRCA2
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBS-BSA	Suero albumina de bovino disuelto en PBS
PBS-DEPC	Dietilpirocarbonato disuelto en PBS
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI-3	3 Fosfoinositol cinasa
PIKK	Proteína cinasa de PIK
PRD	Dominio regulador PIKK
RT-PCR	Transcripción reversa- PCR
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPA	Proteína de recombinación A
rpm	Revoluciones por minuto
S/t-Q	Dominio serina/ treonina- glutamina
seg	Segundos
Ser	Serina
Sin Tx	Sin tratamiento
SN	Inserción de un nucleótido
Thr	Treonina
TNF-α	Factor de Necrosis tumoral α
TRRAP	Proteína asociada a dominios de transcripción o transformación
TTD	Tricotiodistrofia
USP 1	Proteasa específica de ubiquitinas 1
UV	Ultra Violeta

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vías de reparación del daño al ADN.	3
Figura 2.	Reparación por recombinación homóloga	7
Figura 3.	Reparación por unión de extremos no homólogos.	9
Figura 4.	Porcentajes de prevalencia de los diferentes grupos de complementación de anemia de Fanconi.	18
Figura 5.	Vía de señalización de anemia de Fanconi.	19
Figura 6.	Complejo nuclear de Anemia de Fanconi.	21
Figura 7.	Dominios de ATM.	27
Figura 8.	Estrategia experimental.	33
Figura 9.	Aberraciones cromosómicas por célula.	43
Figura 10.	Curva de amplificación de 7SL.	45
Figura 11.	Curva de amplificación <i>ATR</i> .	46
Figura 12.	Curva de amplificación <i>ATM</i> .	47
Figura 13.	Curvas de amplificación <i>ATR</i> representativas de la línea NL49.	49
Figura 14.	Curvas de amplificación <i>ATR</i> representativas de la línea VU817 (AF).	50
Figura 15.	Gráfica de expresión relativa de <i>ATR</i> .	51
Figura 16.	Curvas de amplificación <i>ATM</i> representativas de la línea NL49.	53
Figura 17.	Curvas de amplificación <i>ATM</i> representativas de la línea VU817.	54
Figura 18.	Gráfica de expresión relativa de <i>ATM</i> .	55
Figura 19.	Distribución de las células normales en el ciclo celular.	57
Figura 20.	Distribución de las células AF-A en el ciclo celular.	58
Figura 21.	Activación de ATM en células normales que se encuentran en G2/M.	60
Figura 22.	Activación de ATM en células AF-A que se encuentran en G2/M.	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de complementación en anemia de Fanconi.	17
Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados y sondas Correspondientes.	39
Tabla 2. Datos de aberraciones cromosómicas.	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales

La integridad y estabilidad del material genético está continuamente amenazada por factores endógenos y exógenos que pueden dañar al ADN (Bogliolo, *et al.*, 2002), sin embargo, todos los seres vivos tienen la capacidad de mantener la integridad genómica mediante múltiples mecanismos que reparan el daño al ADN (de Winter & Joenje, 2009; Matsuoka, *et al.*, 2007). Algunas causas de daño al ADN son: 1) Agentes ambientales físicos como radiación, químicos como agentes alquilantes o biológicos como virus 2) Productos propios del metabolismo celular normal, como la replicación, transcripción o metabolismo celular (Hoeijmakers, 2001) (Figura 1). Sin importar cual sea el origen, el daño genético es una amenaza para la supervivencia celular y en metazoarios, de no ser reparado lleva a la falla de órganos, inmunodeficiencia o cáncer (Abraham, 2001).

El genoma humano codifica para más de 130 enzimas que participan en los mecanismos que reparan el ADN (Wood, *et al.*, 2001). Los principales mecanismos son: 1) Reparación de apareamiento erróneo de bases (MMR) 2) Reparación por escisión de bases (BER) 3) Reparación por escisión de nucleótidos (NER), 4) Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), 5) Reparación por recombinación homóloga (HRR) (Hoeijmakers, 2001) (Figura 1). Sin embargo, las vías de reparación no son totalmente independientes, ya que se sobrelapan o interactúan una con otra (Thoms, *et al.*, 2007) y el fallo de una o varias de estas vías da lugar a células con fenotipo mutador, el cual puede estar relacionado con algún síndrome

(Christmann, *et al.*, 2003). El sistema activado para la reparación del ADN no depende únicamente del tipo de daño, sino del tiempo en el ciclo celular en el que ocurra, la disminución de la capacidad de reparación de las células ha sido correlacionada con el riesgo a generar cáncer y senescencia celular.

1.1.1. Vías de reparación del ADN

1.1.1.1. Reparación de apareamiento erróneo de bases (MMR- MissMatch Repair)

La función de la ruta de reparación de apareamiento erróneo de bases es corregir los apareamientos que no cumplan con las reglas de complementariedad. Es un sistema de múltiples pasos el cual debe detectar el error de apareamiento, verificar cual cadena posee el error, degradar la cadena errónea y sintetizar la cadena dañada, corrigiendo estructuras secundarias de ADN tales como bucles y regiones no apareadas, consecuencias del deslizamiento de la polimerasa durante la síntesis. Un defecto de este sistema provoca inestabilidad de microsatélites. (Hoeijmakers, 2001)

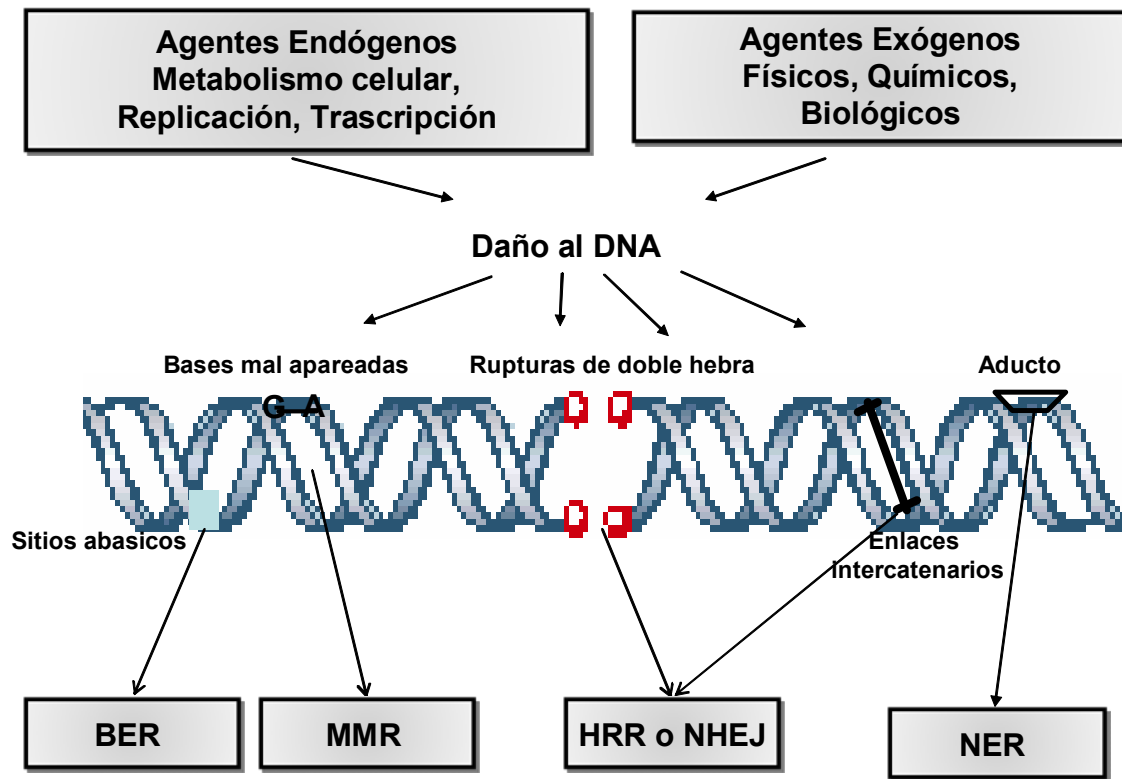


Figura 1. **Vías de reparación del daño al ADN.** Se muestran los tipos más comunes de agentes que causan daño al ADN, se observan las diferentes lesiones que se presentan en el ADN y las vías principales de reparación para cada tipo de daño.

1.1.1.2.Reparación por escisión de bases (BER-Base Excision Repair)

La escisión de bases elimina del genoma las bases erróneas o dañadas por reacciones químicas provocadas por especies reactivas de oxígeno y numerosos agentes genotóxicos ambientales. Dependiendo del número de nucleótidos incorporados durante el proceso de reparación esta vía se divide en: 1) de un solo nucleótido o SN (Single Nucleotide), en el cual solo se incorpora un nucleótido en el lugar del nucleótido dañado retirado; y 2) de inserción larga o LP (Long Patch), en el cual se incorpora más de un nucleótido durante la reparación. El proceso que se lleva a cabo inicia con el reconocimiento y escisión de la base dañada por parte de una glicosilasa, posteriormente una endonucleasa crea una incisión en el esqueleto de ADN en el sitio abásico, se elimina este fragmento abásico, se sintetiza usando la cadena complementaria y se liga el fragmento (Wood, *et al.*, 2001; Harrigan, *et al.*, 2006). Las deficiencias en esta vía se encuentran involucradas en el síndrome de Werner (Brosh & Bohr, 2007).

1.1.1.3.Reparación por escisión de nucleótidos (NER-Nucleotide Excision Repair)

Es la función de reparación de ADN más versátil y mejor estudiada, actúa en respuesta a la mayoría de las grandes distorsiones que bloquean la correcta replicación y transcripción del ADN, estas distorsiones incluyen fotoproductos inducidos por radiación ultra violeta (UV) y aductos derivados de productos químicos inductores de enlaces cruzados. Los procesos que realiza la NER son: i) reconocimiento del daño y formación de una estructura abierta de ADN ii) Incisión a ambos lados del daño, iii)

degradación de un oligonucleótido de 24 a 32 bases y síntesis de la secuencia eliminada usando como templado la secuencia complementaria, iv) religación del fragmento recién sintetizado (Araujo, *et al.*, 2001). En este proceso participan entre 20 y 30 enzimas de reparación en una secuencia específica.

En los genes que se están transcribiendo activamente las lesiones deben ser reparadas con mayor rapidez, por lo cual, la reparación ocurre de manera preferencial frente a aquellas lesiones en fragmentos que permanecen activos, a esta sub-vía se le nombra reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción (Wood, *et al.*, 2001). Las consecuencias de NER defectuosa, se manifiestan clínicamente en tres síndromes principales: 1) Xeroderma Pigmentosum, 2) Síndrome de Cockayne, 3) Tricotiodistrofia (TTD) (Hoeijmakers, 2001).

1.1.2. Reparación de rupturas de doble hebra

Las rupturas de doble cadena de ADN (DSB) son extremadamente citotóxicas, ya que una ruptura no reparada es letal para la célula (Shilon, 2001). Activan una compleja cascada de eventos que inician con el arresto del ciclo celular y el reclutamiento de las enzimas que llevan a cabo la reparación del daño al ADN (Hopfner, *et al.*, 2002; Jackson, 2002). Uno de los eventos tempranos en respuesta a las DSB es la fosforilación en la Ser 139 de la histona H2AX, esta modificación post-traducciona de la histona promueve la descondensación de la cromatina y recluta las proteínas de reparación (Ismail, 2008). Existen dos principales vías para reparar las DSB, la reparación por recombinación homóloga (HRR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Estas vías son muy distintas una de la otra pero funcionan de manera complementaria para reparar las DSB (Thoms, *et al.*, 2007). La HRR involucra el

apareamiento entre un cromosoma dañado y su homólogo no dañado el cual será usado como templado, por lo general no se pierde material genético en este proceso. En la NHEJ los extremos de las cadenas son ligeramente digeridos por una nucleasa y posteriormente son ligados directamente, este proceso generalmente conlleva la pérdida de material genético (Bradbury & Jackson, 2003). Sin embargo, ambas vías se encuentran ligadas a la formación de aberraciones cromosómicas, ya que la ineficiente señalización y/o reparación de las rupturas del ADN potencian los rearrreglos cromosómicos, los cuales son típicos de las células tumorales (Pfeiffer, *et al.*, 2000; Thoms, *et al.*, 2007).

1.1.2.1.Reparación por recombinación homóloga (HRR Homologous Recombination Repair)

La reparación por recombinación homóloga es un proceso altamente conservado en los eucariontes, que requiere de extensas secuencias homólogas (Pfeiffer, *et al.*, 2000); actúa de manera post-replicativa durante las fases S y G2 del ciclo celular, ya que la secuencia homóloga de la cromátida hermana sirve como templado para la síntesis (sin errores) de la cadena rota. El proceso comienza con la formación de extremos libres 3' de cadena sencilla generados por la nucleasa MRE11 la cual forma parte del complejo MRN, posteriormente RPA recubre la cadena sencilla de ADN y luego RPA se substituye por Rad 51 con la ayuda de Rad52, Rad54 y BRCA2. Rad51 forma filamentos de nucleoproteínas a lo largo de la cadena sencilla y cataliza la detección de la cromátida hermana, invasión de la cadena y formación de uniones Holliday que son resueltas por resolvasas (Christmann, *et al.*, 2003) (figura 2).

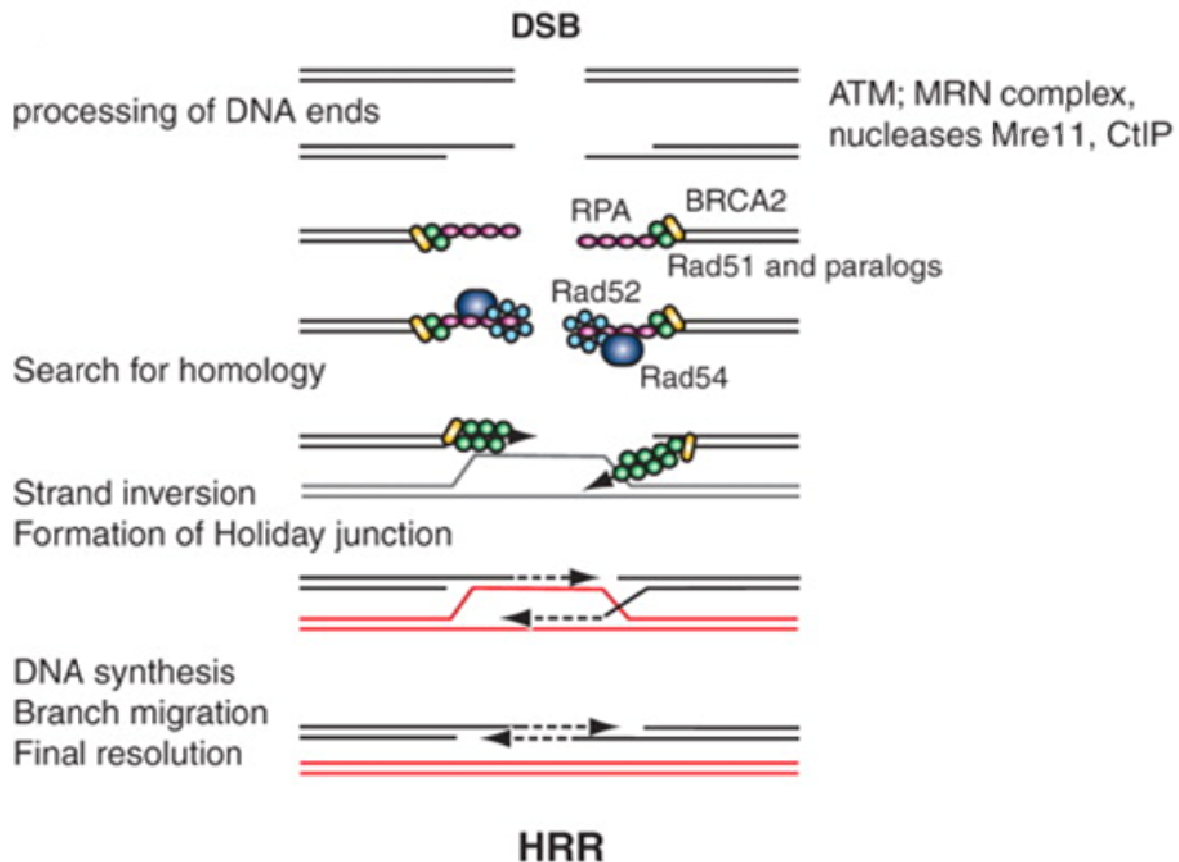


Figura 2. **Reparación por recombinación homóloga.** Cuando se genera una ruptura de doble hebra de ADN esta es detectada por el complejo MRN el cual activa a la cinasa ATM, esto inicia la cascada de señalización que permite la activación de nucleasas como Mre11 las cuales se unen a los extremos de ADN generados por la ruptura y los degrada para generar ADN de cadena sencilla el cual se recubre en primera instancia por RPA. RPA es substituido por Rad51 y sus parálogos con ayuda de Rad52, Rad54 y BRCA2. Rad 51 forma filamentos nucleoproteicos y ayuda a la búsqueda de la cromátida. Modificada de Kinner, *et al.*, (2008).

1.1.2.2.Recombinación no homóloga (NHEJ- Non Homologous End Joining)

Es un proceso propenso a error, ya que los extremos del ADN dañado, son religados sin la necesidad de verificación de secuencia u homología de secuencia (Pfeiffer, *et al.*, 2000). Un heterodímero Ku70/Ku80 se une a los extremos de las cadenas para evitar la degradación, se recluta DNA-PKcs y el complejo proteico de ligación XRCCA-DNA, dado que el alineamiento de los extremos ocurre cuando hay una micro-homología entre ambos segmentos (1-4 nucleótidos). En la mayoría de los casos se hace necesario un procesamiento llevado a cabo por el complejo ARTEMIS/DNA-PKcs. El paso de ligación se realiza por el complejo XRCC4/ligasaIV y es en éste en el que comúnmente se insertan o delecionan algunos nucleótidos, lo cual es la razón de los errores (Kotnis, *et al.*, 2009) (figura 3).

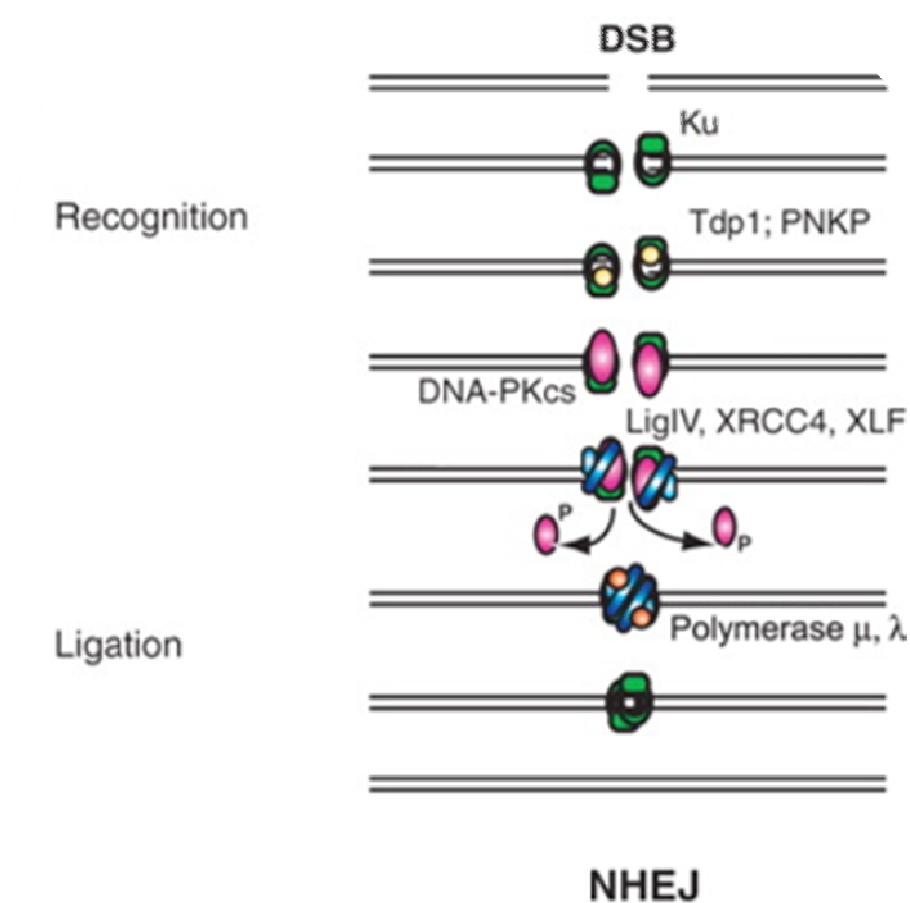


Figura 3. **Reparación por unión de extremos no homólogos.** Los extremos de ADN generados por la ruptura son reconocidos por el dímero Ku el cual recluta a Tdp1 o PNKP y a DNA-PKcs. Posteriormente la DNA-PKcs se libera de los extremos de ADN, lo que permite al complejo de ligación (DNA ligasaIV, XRCC4 y XLF) en conjunto con la DNA polimerasa sintetizar ADN y ligar los extremos de la cadena. Modificada de Kinner, *et al.*, (2008).

1.1.3. Síndromes de inestabilidad cromosómica

Se conocen varios síndromes de inestabilidad cromosómica que son causados por defectos en la reparación de lesiones en el ADN (Van Gent, *et al.*, 2001), en general estos síndromes son de herencia autosómica recesiva y se caracterizan por presentar alta frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas, envejecimiento prematuro, inmunodeficiencias, y desarrollo prematuro de neoplasias sobre todo hematológicas (Pfeiffer, *et al.*, 2000).

1.1.3.1.Xeroderma pigmentosa

Es un desorden cutáneo multigénico que puede ser causado por alteraciones en al menos 1 de los 8 genes distintos denominados *XPA-XPG* y *XPV*, cuyas proteínas participan en la vía de reparación NER. El gen alterado con mayor frecuencia y que provoca los síntomas más agudos de este síndrome es *XPA*. Los pacientes afectados presentan envejecimiento prematuro, lesiones oculares, trastornos neurológicos progresivos y elevada predisposición a desarrollar cáncer de piel (Thomps, *et al.*, 2007).

1.1.3.2.Síndrome de Werner

Causado por defectos en el gen *WRN* que codifica la proteína WRN la cual pertenece a la familia RecQ. WRN tiene actividad catalítica dual, exonucleasa 3'-5' y ADN helicasa 3'-5' y se ha propuesto que participa en los procesos de replicación, reparación, recombinación, transcripción y mantenimiento de telómeros. Las células de los

pacientes con Werner presentan inestabilidad genómica e hipersensibilidad a los agentes que inducen la interrupción de la replicación o la aparición de rupturas de doble hebra en la horquilla de replicación. Los pacientes presentan envejecimiento prematuro y síntomas asociados como arterioesclerosis, osteoporosis, debilitamiento del cabello, diabetes mellitus, cataratas y elevada incidencia de tumores, principalmente sarcomas (Harrigan, *et al.*, 2006; Multani & Chang, 2007; Sidorova, *et al.*, 2008).

1.1.3.3. Ataxia Telangectasia

Causado por mutaciones en el gen *ATM* cuyo producto del mismo nombre pertenece a la familia de las PI 3-quinasas y juega un papel principal en la regulación de diferentes cascadas de señalización que incluyen control del ciclo celular y reparación de DSB (Yang, *et al.*, 2005). Las células de estos pacientes presentan hipersensibilidad a la radiación ionizante, defectos en el control del ciclo celular, acortamiento en los telómeros y un nivel elevado de especies reactivas de oxígeno.

Los pacientes con ataxia telangiectasia muestran degeneración neuronal progresiva, caracterizada por la pérdida de las células de Purkinje en el cerebelo, inmunodeficiencia humoral y celular, ataxia ocular, telangiectasia facial y presentan un riesgo de 60-180 veces mayor de presentar cáncer. (Thomps, *et al.*, 2007)

1.1.3.4. Síndrome de Seckel

Síndrome causado por mutaciones en el gen *ATR* que codifica para la proteína del mismo nombre. Pertenece a la familia PI 3-quinasas, tiene un papel esencial en la proliferación celular y estabilidad genómica. Las células deficientes de ATR (*ATR*^{-/-})

son sensibles a la radiación UV y a los inhibidores de la replicación celular; las células de algunos pacientes presentan inestabilidad cromosómica en respuesta a mitomicina C (MMC). El síndrome se manifiesta por microcefalia severa, retraso mental, ojos anormalmente grandes, cara estrecha, orejas malformadas con ausencia de lóbulo, paladar ojival y anomalías en las extremidades (Brown & Baltimore, 2000).

1.1.3.5.Síndrome Nijmegen

Es un síndrome causado por mutaciones en el gen *NBS1* que codifica para la proteína nibrina (Varon, *et al.*, 1998), la cual junto con MRE 11 y RAD50 forma el complejo MRN que participa en la recombinación meiótica, las reorganizaciones de segmentos V (J) D, el mantenimiento telomérico y en la reparación del ADN en respuesta a la exposición a distintos agentes genotóxicos.

Los pacientes con este síndrome presentan características celulares similares a Ataxia Telangectasia, como inestabilidad cromosómica, sensibilidad a IR, fallos en el ciclo celular y síntesis de ADN radioresistente. La enfermedad puede cursar con microcefalia, retraso en el crecimiento, inmunodeficiencia, retraso mental progresivo, manchas café con leche, vitiligo, alteraciones en la pigmentación ocular y un elevado riesgo a adquirir enfermedades linfoides y cáncer sin presentar telangiectasia (Tauchi, *et al.*, 2002).

1.1.3.6.Síndrome de Bloom

Causado por errores en el gen *BLM* el cual codifica para BLM una helicasa de ADN perteneciente a la subfamilia RecQ. Participa en la reparación, replicación y

recombinación homóloga. Es necesaria para la localización nuclear del complejo MRN y es posible encontrar esta proteína dentro del complejo denominado BASC (BCRA-associated surveillance complex), y colabora con las proteínas FA en la resolución de horquillas de replicación estancadas.

Las células deficientes de esta proteína son hipersensibles a la luz UV, la hidroxiurea, agentes alquilantes y a radiación ionizante; presentan elevados niveles de intercambio de cromátidas hermanas, rupturas cromosómicas y reordenamientos.

Los pacientes con este síndrome presentan eritema telangiectásico en la cara, antebrazos y dorso de las manos, fotosensibilidad, enanismo, manchas café con leche, alteraciones esqueléticas e incremento en el riesgo a padecer leucemias, linfomas y carcinomas (Tikoo & Sengupta, 2010).

1.1.3.7. Anemia de Fanconi

Descrita por Guido Fanconi en 1927, la anemia de Fanconi es una enfermedad con heterogeneidad genética (al menos 13 genes A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M y N) que se hereda de forma autosómica recesiva y ligada al cromosoma X (Peiwen, *et al.*, 2005). La pancitopenia se presenta generalmente entre los tres y los siete años de edad tanto en hombres como mujeres, en una proporción 3:1 (Moustacchi, 2003),

1.1.3.7.1. Características clínicas

Es un trastorno que implica falla en la médula ósea afectando la producción de todos los tipos de células sanguíneas. La disminución en los glóbulos blancos predispone a los pacientes a infecciones, la baja de glóbulos rojos produce anemia y la de plaquetas puede causar sangrado por coagulación deficiente. Los pacientes también pueden

presentar hiperpigmentación generalizada en la piel o bien manchas oscuras o de color café con leche, talla baja y malformaciones en miembros superiores, anomalías genitales, malformaciones vertebrales y espinales; anomalías renales y urinarias, anomalías del sistema colector, anomalías oculares, retraso psicomotor, diabetes mellitus tipo 2, malformaciones del tracto gastrointestinal y predisposición a cáncer, sobre todo leucemia y tumores sólidos (Molina y Frías, 2006).

1.1.3.7.2. Características celulares

- Inestabilidad cromosómica espontánea encontrándose un promedio de 0.3 aberraciones por célula.
- Hipersensibilidad a agentes inductores de enlaces cruzados en el ADN como la mitomicina C (MMC), el Diepoxibutano (DEB) y el cisplatino. La frecuencia de aberraciones cromosómicas aumenta hasta 10 veces más que la espontánea, y disminuyen su tasa de proliferación al contacto con estos agentes (Joenje, *et al.*, 1995; Moustacchi, 2003; Molina y Frías, 2006). Esta hipersensibilidad a agentes alquilantes se usa en cultivos de células linfocíticas de pacientes como prueba para el diagnóstico de anemia de Fanconi. Es posible realizar la sub-tipificación de la enfermedad mediante estudios de complementación por fusión celular, complementación retroviral, o transferencia génica, las células de anemia de Fanconi presentarán complementación total o parcial solo al expresar la proteína del subtipo de anemia de Fanconi para la cual son deficientes. La complementación se mostrará en la disminución de la frecuencia de aberraciones cromosómicas y el daño producido por MMC o DEB (Bogliolo, *et al.*, 2002; Esmer, *et al.*, 2004).
- Hipersensibilidad al oxígeno. Las concentraciones normales de especies reactivas

de oxígeno (ROS) elevan el número de aberraciones cromosómicas, disminuyen la tasa de proliferación y detienen el ciclo celular en la fase G2 del ciclo celular. El estrés oxidativo promueve la interacción de proteínas AF con otras proteínas involucradas en el metabolismo redox. Debido a que la activación intracelular y detoxificación de MMC y DEB generan estrés oxidativo, se ha propuesto que la hipersensibilidad al oxígeno explicaría el fenotipo celular característico de la anemia de Fanconi (Pagano, 2000)

➤ Alteración en los niveles de factores de crecimiento. Las células de los pacientes con anemia de Fanconi presentan una baja producción de interleucina 6 (IL-6), lo que ayuda a explicar el defecto en la diferenciación del sistema hematopoyético que conduce al desarrollo de la anemia. Presentan también una concentración del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) ocho veces mayor que en las células normales. (Ibáñez, *et al.*, 2009).

➤ Alteración del ciclo celular. Se presenta un ciclo celular más largo, al parecer debido a un arresto en el punto de restricción de G2/M en respuesta al daño en el ADN de la fase S precedente (Bogliolo, *et al.*, 2002). Algunas proteínas codificadas por los genes de AF interactúan funcionalmente con las proteínas reguladoras ATM y BRCA1 requeridas para el funcionamiento adecuado de los puntos de restricción en S y G2.

➤ Defectos en la reparación del ADN. Varios productos génicos AF están relacionados con la recombinación homóloga: FANCD2 actúa con la proteína BRCA1 y las mutaciones en este gen producen defectos en la recombinación homóloga. FANCD1/BRCA2 es vital, ya que se une con gran especificidad a los extremos de rupturas de doble hebra de ADN y a las uniones Holliday (Park, *et al.*, 2005) ayudando a formar el filamento proteico de RAD51 que inicia el apareamiento durante la recombinación

homóloga (Yuan, *et al.*, 1999).

➤ Apoptosis alterada. En los grupos de complementación AF-A, B, C y D1, la apoptosis espontánea es alta y la respuesta a señales endógenas desreguladas y al tratamiento con agentes mutágenos como la MMC, se ve incrementada (Ridet, *et al.*, 1997). En los grupos AF-A y C se incrementa de tres a seis veces el proceso de apoptosis a través de la vía extrínseca mediada por el receptor de membrana Fas, en cambio la vía intrínseca y función mitocondrial son normales, ya que no hay despolarización de la membrana ni activación de la caspasa 3 o fragmentación oligonucleosomal (Clarke, *et al.*, 2004). La preferencia de la MMC por ADN mitocondrial y el desplazamiento de la proteína FANCG del núcleo a la mitocondria podría ser relevante en la generación de esta alteración. Además, se ha demostrado que la sobre-expresión de los genes *AF-A* y *AF-C* reduce el proceso apoptótico a niveles normales, lo cual hace suponer que ambos genes podrían funcionar como supresores de la apoptosis (Molina y Frías, 2006).

1.1.3.7.3. Características moleculares

Se han reconocido 13 genes relacionados a la anemia de Fanconi cada uno de los cuales codifica para una proteína diferente, la falla o falta de cualquiera de estas proteínas genera el fenotipo de anemia de Fanconi, y así se derivan los grupos de complementación (Ver Tabla 1) en los cuales se ha sub-dividido a los pacientes (de Winter & Joenje, 2009). Los grupos de complementación más frecuentes en pacientes son A, C y G (Figura 4) (Moldovan & D'Andrea, 2009)

Las 13 proteínas AF pueden ser funcionalmente divididas en 3 grupos (figura 5)

Tabla 1. **Grupos de complementación en anemia de Fanconi.** Se muestra el gen afectado y el *locus* para cada uno de los 13 grupos de complementación reconocidos hasta la fecha para anemia de Fanconi

GRUPO DE COMPLEMENTACIÓN	SÍMBOLO DEL GEN	LOCUS
FA-A	<i>FANCA</i>	16q24.3
FA-B	<i>FANCB</i>	Xp22.3
FA-C	<i>FANCC</i>	9q22.3
FA-D1	<i>BRCA2</i>	13q12.3
FA-D2	<i>FANCD2</i>	3p25.3
FA-E	<i>FANCE</i>	6p22-p21
FA-F	<i>FANCF</i>	11p15
FA-G	<i>FANCG</i>	9p13
FA-I	<i>FANCI</i>	15q25-q26
FA-J	<i>BRIP1</i>	17q22
FA-L	<i>FANCL</i>	2p16.1
FA-M	<i>FANCM</i>	14q21.3
FA-N	<i>PALB2</i>	16p12

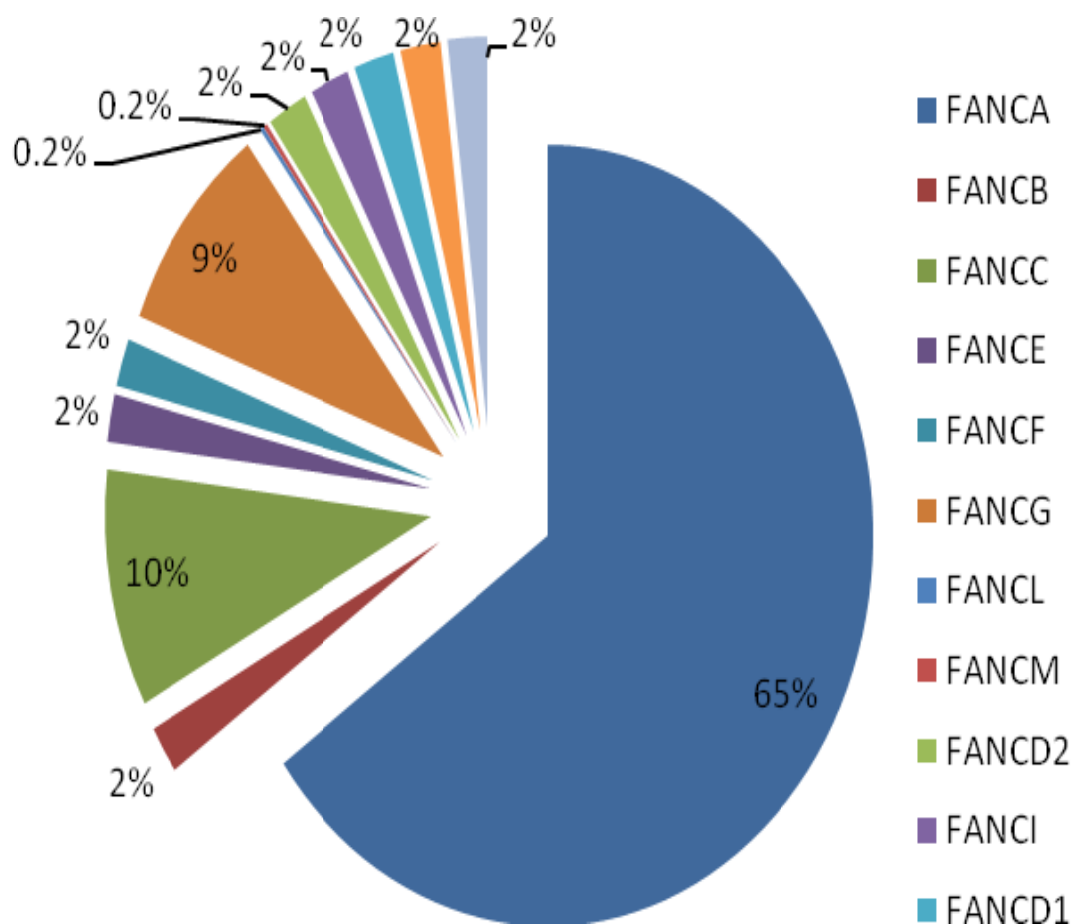


Figura 4. **Porcentajes de prevalencia de los diferentes grupos de complementación de anemia de Fanconi.** Se observa como los grupos de mayor prevalencia el grupo A con 66%, el grupo C con 10% y el grupo G 9%. Los grupos con menor prevalencia son el grupo L y el grupo M con solo 0.2%, el resto de los grupos de complementación presentan una prevalencia del 2% (Basada en Moldovan & D'Andrea 2009).

Figura 5. **Vía de señalización de anemia de Fanconi.** Se muestra el complejo nuclear el cual integra a 8 proteínas FANC (A, B, C, E, F, G, L, M) y 2 proteínas asociadas, el complejo ID y las proteínas efectoras de la vía. El complejo nuclear una vez ensamblado activa mediante monoubiquitinación a las dos proteínas del complejo ID, las cuales una vez monoubiquitinadas activan a las tres proteínas efectoras de vía FANCI, FANCD1 y FANCD2. Basada en Moldovan & D'Andrea (2009).

Complejo nuclear AF (figura 6) consiste en las proteínas asociadas a anemia de Fanconi FAAP 24, FAAP 100 y 8 proteínas AF: FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL y FANCM (Moldovan & D'Andrea 2009), varias de las cuales son fosforiladas por ATR y posiblemente otras cinasas río abajo de ATR. Estas 10 proteínas son necesarias para la ubiquitinación de FANCD2 y FANCD1. La MMC induce un incremento de este complejo en el núcleo (Quiao, *et al.*, 2001). Por otra parte, el complejo AF fue purificado como parte de un complejo multiproteico más grande llamado BRAFT (BML, RPA [replication protein A], AF y topoisomerasa III) (Meetei, *et al.*, 2003) que consiste en al menos 17 polipéptidos con varias actividades de procesamiento de ADN, entre ellas estabilizar las horquillas de replicación estancadas y permitir la subsecuente recombinación homóloga; lo cual es necesario para el reinicio de la replicación. La interacción entre BLM y el complejo AF sugiere que trabajan juntos para ayudar a restablecer las horquillas de replicación estancadas (Pichierri & Rosselli, 2004).

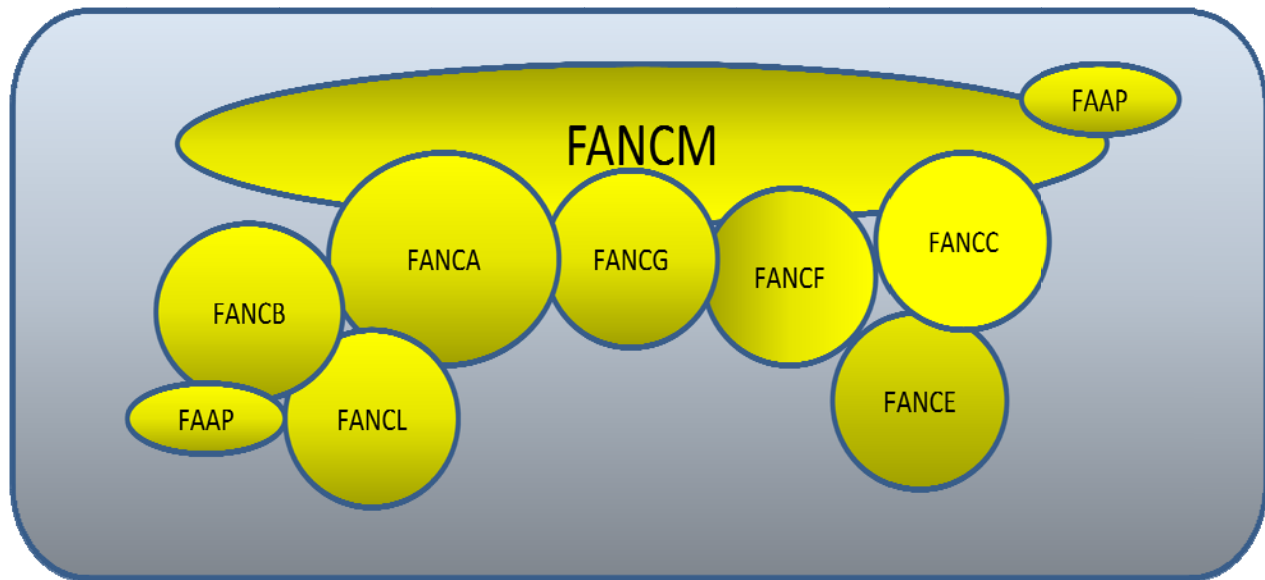


Figura 6. **Complejo nuclear de Anemia de Fanconi.** Se muestran las proteínas contenidas en este complejo, 2 proteínas FAAP (Proteína Asociada a Anemia de Fanconi) y las 8 proteínas de Anemia de Fanconi, se muestra a FANCM como un soporte que permitiría que todo el complejo se asociara con el ADN, y se muestra a FANL, el cual sirve como ubiquitin ligasa para continuar con la señalización vía el complejo ID

FANCA se localiza en el cromosoma 16q24.3; codifica para una fosfoproteína de 1455 aminoácidos que se asocia con algunas cinasas y factores de crecimiento, presenta secuencias repetitivas Alu, contiene una señal de localización nuclear bipartita y cinco señales de exportación nuclear ricas en leucina; interactúa directamente con FANCG para promover la acumulación nuclear del complejo AF; (Quiao, *et al.*, 2001). **FANCB** se localiza en el cromosoma Xp22.31 y está sujeto a la inactivación, presenta secuencia de localización nuclear, y hay evidencias de que tiene una función relevante en el transporte nuclear de FANCA y FANCL (de Winter & Joenje, 2009, D'Andrea, 2010). **FANCC** tiene señal de localización nuclear y citoplásmica; su función se asocia a la desintoxicación de radicales libres del oxígeno, a la regulación de apoptosis y al control de la proliferación celular (Bogliolo, *et al.*, 2002). Interactúa también con HSP70 para prevenir la apoptosis en las células hematopoyéticas expuestas a interferón gamma (IFN- γ) y al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Pang, *et al.*, 2001), participa en la activación de vías de señalización en respuesta a las citocinas y a los factores de crecimiento, en la regulación de la diferenciación mieloide y en el proceso de inflamación, y protege a las células hematopoyéticas de la apoptosis en vías independientes al complejo nuclear AF (Pang, *et al.*, 2002). **FANCE** Contiene dos señales de localización nuclear, forma parte del complejo nuclear AF y se requiere para la monoubiquitinación de FANCD2 (de Winter & Joenje, 2009; D'Andrea, 2010). **FANCF** se une directamente a FANCG y permite el ensamblaje con las otras proteínas AF; es una proteína adaptadora flexible que participa de manera muy importante en el ensamblaje multimérico (de Winter, *et al.*, 2000). **FANCG** involucrado en la reparación post-replicativa y participa en el ensamblaje y estabilización del complejo AF se

fosforila en los aminoácidos 383 y 387 e interactúa con el citocromo p450 y detecta el daño del estrés oxidativo citoplasmático (de Winter, *et al.*, 2000; Bogliolo, *et al.*, 2002). **FANCL** probablemente sea la subunidad catalítica requerida para la monoubiquitinación y redistribución de FANCD2 en *foci* subnucleares (Meetei, *et al.*, 2003). **FANCM** presenta dominio helicasa DEAH-box y de endonucleasa parecido a XPF/ERC44, *in vitro*, es capaz de disociar ADN de triple hélice, resolver estructuras Holliday y estructuras de horquillas de replicación, se localiza en la cromatina y es necesaria para el reclutamiento de las proteínas del complejo AF. Posee actividad translocasa dependiente de ATP que promueve la migración del complejo AF a lo largo del ADN; es fosforilada en fase M, fase S, y en respuesta al daño al ADN, tanto la fosforilación como su reclutamiento a cromatina es controlado por ATM y ATR, y parcialmente por FANCD2 (Kim. *et al.*, 2008; Sobeck, *et al.*, 2009).

Complejo ID. Comprende la interacción de FANCI y FANCD2, ambas son ubiquitinadas por el complejo AF, esta ubiquitinación provoca la redistribución de FANCD2-I a *foci* nucleares en la cromatina (dependientes de BRCA1 y γ H2AX) los cuales se cree son sitios de reparación de ADN donde las horquillas de replicación se encuentran estancadas. Es posible que la forma monoubiquitinada de FANCD2-I interactúe con los dominios de unión de ubiquitina de las polimerasas de translesión y las reclute, permitiendo a estas, remplazar a la polimerasa replicativa y así ignorar el daño. La des-ubiquitinación tanto de FANCD2 como de FANCI se cataliza por USP1 (ubiquitin specific protease 1) (de Winter & Joenje, 2009; D'Andrea, 2010).

FANCD2 juega papeles indispensables en procesos de desarrollo y en la supresión de tumores, se ha sugerido que participa en la vía de señalización activada por ATM en respuesta a radiación ionizante, en la que ATM fosforila FANCD2 en Ser222, induciendo la activación del punto de control de fase S (Bogliolo, *et al.*, 2002). Existen dos formas de FANCD2: 1) Una forma corta de rápida migración llamada FANCD2-S y 2) FANCD2-L una forma modificada post-traduccionamente, a la cual se le adiciona ubiquitina en K561 durante la fase S del ciclo celular y se dirige a *foci* subnucleares que contienen BRCA1, FANCD1/BRCA2, RAD51 y con la intervención de ATM y ATR realizan la reparación del ADN (de Winter & Joenje, 2009). Es probable que FANCD2 sea la proteína efectora clave en la vía de acción AF. Se han encontrado también FANCD2 y BRCA1 en el complejo sinaptonémico de los cromosomas meióticos y cuando están alteradas hay defectos en la reparación por recombinación homóloga (Garcia-Higuera, *et al.*, 2001). Intervienen en la reparación de las rupturas dobles del ADN y tienen alta afinidad a extremos de DSB y a uniones Holliday. (Oashi, *et al.*, 2005; Moldovan & D'Andrea, 2009). **FANCI** Se sabe poco de esta proteína, debido a su reciente descubrimiento. Sin embargo, al igual que FAND2 puede ser fosforilada por ATR o ATM en respuesta a diferentes tipos de daño en el ADN (Smogorzewska, *et al.*, 2007).

Proteínas independientes o río abajo del complejo ID; Incluye a las proteínas FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, y FANCI/BRIP1, estas proteínas marcan una conexión importante entre la vía AF y el cáncer de mama ya que las tres han sido encontradas en complejos con BRCA1; FANCD1/BRCA2-

BRCA1 y BRCA1-FANCD1/BRIP1 (de Winter & Joenje, 2009; Moldovan & D'Andrea, 2010).

FANCD1/BRCA2 una proteína con dominio de unión al ADN OB-plegado y múltiples repetidos BRC, su principal función es participar en la reparación por recombinación homóloga del ADN regulando la actividad de RAD51, se une a ADN de hebra sencilla y de doble hebra, se requiere para la reactivación y estabilización de las horquillas de replicación, y actúa río abajo del complejo AF (Kitao, *et al.*, 2006). **FANCD1/PALB2** se une a FANCD1/BRCA2 promueve su localización y estabilización en estructuras nucleares, como la cromatina o la matriz nuclear, le permite asociarse a BRCA1 y ha sido colocalizada con la recombinasa RAD51. (Xia, *et al.*, 2006; Shirley *et al.*, 2009; Zhang, *et al.* 2009). **FANCD1** ha sido encontrada en complejo con la TOPBP1 (proteína de unión a topoisomerasa II) y MLH1 (proteína de error de apareamiento, homóloga de mutL), también se ha encontrado formando otro complejo con PMS2 (proteína de segregación post meiotica incrementada 2); en ambos complejos BRCA1 se encuentra presente. FANCD1 es capaz de promover la carga de la polimerasa de síntesis de translesión a las horquillas de replicación estancadas, desplazando ADN o proteínas no deseables. (Wu, *et al.*, 2010; Xie, *et al.*, 2010).

1.1.4. Vías de Señalización del daño en el ADN

En el núcleo del proceso de señalización de daño a ADN se encuentran las cinasas ATM y ATR. Estas cinasas son activadas por daño al ADN y controlan los puntos de monitoreo del ciclo celular (Cimprich & Cortez, 2008). Ambas fosforilan el dominio S/T-Q (Serina/Treonina-Glutamina) de proteínas que inician cascadas de señalización como las proteínas de puntos de control Chk1 y Chk2 que extienden la señalización mediante fosforilación de otras proteínas (Abraham, 2001). Se han identificado más de 700 proteínas que son fosforiladas en el dominio S/T-Q en respuesta a radiación ionizante, por lo que muy probablemente son fosforiladas por alguna de estas dos cinasas maestras y que incluyen proteínas de las diversas vías de reparación (Matsuokoa, *et al.*, 2007)

1.1.4.1.ATM (Ataxia telangectasia mutated)

Es una proteína codificada en un gen de 160 kb localizado en 11q22–23, presenta un transcrito de 13 kb con 66 exones, su producto proteico es una cinasa Ser/Thr miembro de la familia PIKK (cinasas relacionadas con las cinasas 3 fosfoinositol) presenta la siguiente estructura de dominios: 1) Dominio de repetidos HEAT (Huntintong Elongation Factor PR65/A,TOR) el cual se une a NBS1, 2) Una señal de localización nuclear, 3) Dominio FAT(FRAP-ATM-TRRAP) el cual se propone controla la actividad cinasa 4) KD (Dominio Cinasa) 5) Dominio PRD (Dominio regulador PIKK) el cual sufre modificaciones post-traduccionales que potencian la actividad cinasa y 6) FATC (FAT C-terminal) al cual se une la acetiltransferasa Tip 60 (Jiang, *et al.*, 2006; Lempiainen & Halazonetis, 2009)(figura 7).

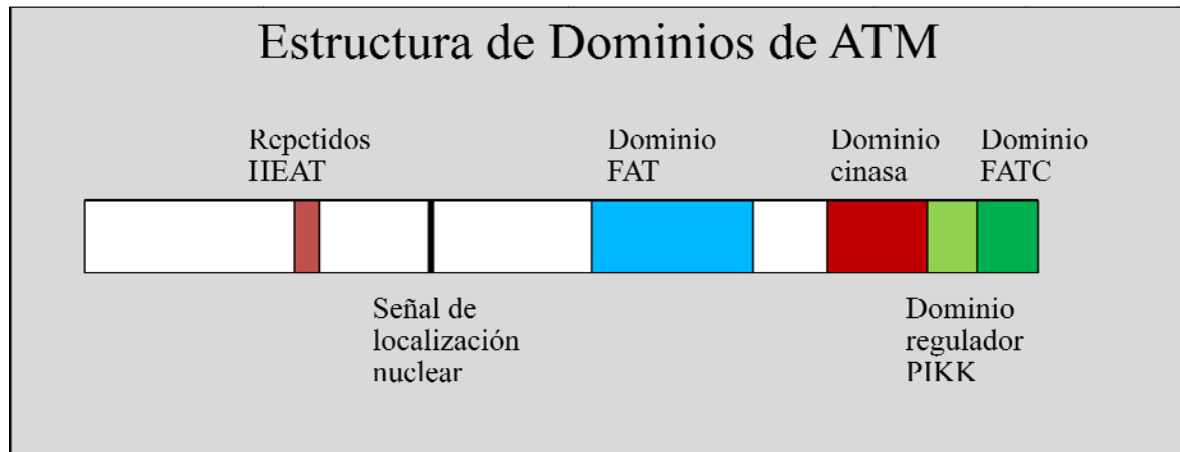


Figura 7. **Dominios de ATM.** Se muestran los dominios de ATM y su organización basada en Lempiainen & Halazonetis (2009).

ATM se recluta en el sitio de las rupturas de doble cadena de ADN, es capaz de autofosforilarse en al menos tres sitios (Ser367, Ser1893, Ser1981) y se localiza parcialmente activada en las regiones adyacentes a las rupturas, pero necesita ser completamente activada para ser localizada en el sitio de la ruptura. La completa activación y localización de ATM son procesos facilitados mediante la unión al C terminal de NBS1, parte del complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) el cual actúa subsecuentemente como adaptador de ATM para lograr la fosforilación de algunas proteínas como FANCD2, CHK1 y SCM1 (Young *et al.*, 2005).

La activación de ATM lleva a la rápida fosforilación de diversas proteínas involucradas en reparación del ADN como p53 y H2AX, la cual cuando se activa por ATM produce la variante γ H2AX, que parece ser la señal inicial para la subsecuente acumulación de proteínas de respuesta a daño al ADN (McManus & Hendzel, 2005).

ATM fosforila proteínas de control de ciclo celular como Chk2 la cual es de rápida movilidad a través del núcleo después del daño a ADN (Matsuoka, *et al.*, 2000), y proteínas de transcripción como p53 (en Ser 20) incrementando su estabilidad y concentración (Shieh, *et al.*, 2000). Induce la expresión de genes regulados por NF κ B en respuesta al estrés oxidativo (Abraham, 2001). ATM inmunoprecipita con PP2A (protein-phosphatase 2A) en células sin daño, pero esta interacción es abatida en respuesta a las rupturas de doble hebra, lo cual permite la autofosforilación. Una segunda fosfatasa (WIP1) puede defosforilar a ATM *in vitro*. La deficiencia de esta enzima genera la sobre expresión de ATM.

1.1.4.2.ATR (Ataxia telangiectasia and Rad 3 related)

ATR y ATRIP censan las rupturas de cadena sencilla ya sea que se generen en las

horquillas de replicación estancadas o por el procesamiento de rupturas de doble hebra (Matsuoka, *et al.*, 2007). Este complejo es esencial en el punto de control de la replicación (Brown & Baltimore, 2000), ATR fosforila *in vitro* a Chk2 (en Thr 26, Thr 68 y Ser 50) (Matsuoka, *et al.*, 2000) y a Chk1 (en Ser 345)

1.2. Antecedentes Directos

La vía AF/BRCA se activa por daños causados por agentes alquilantes o agentes que impiden la continuidad de la replicación del ADN (de Winter & Joenje, 2009). Existen numerosos estudios acerca de la hipersensibilidad de las células de Anemia de Fanconi a agentes inductores de enlaces cruzados, pero pocos acerca de la genotoxicidad de inhibidores de la replicación en células de Anemia de Fanconi (Frías, *et al.*, 1996; Martínez A., *et al.*, 2007).

La hidroximetilurea (HU) es un agente inhibidor de la ribonucleótido reductasa que disminuye el número de deoxinucleótidos en la célula, generando estancamiento y posterior colapso de las horquillas de replicación, produciendo rupturas de doble hebra. Se ha demostrado que la vía AF se activa en respuesta al estrés replicativo provocado por HU, induciendo la monoubiquitinación de FANCD2 y generando *foci* nucleares de proteínas de reparación por recombinación homóloga (Howlett, *et al.*, 2005). En células leucémicas la HU induce apoptosis en un tiempo de exposición de entre dos y cuatro horas (Kurose, *et al.*, 2006). En células de anemia de Fanconi de los grupos de complementación FANC-A FANC-C y FANC-G la HU inhibe la activación constitutiva de ATM (Ser 1981) que se presenta en estas células, la cual es necesaria para prevenir la acumulación de rupturas espontáneas, de tal forma que las células deficientes de la vía

AF son sensibles a la inhibición de ATM (Kennedy, *et al.*, 2007). Las células AF-A sometidas a HU durante G2 presentan aumento en las aberraciones cromosómicas (Martínez, *et al.*, 2008), reducen del índice mitótico y, cuando este procedimiento es precedido por un tratamiento con MMC las aberraciones cromosómicas se incrementan hasta seis veces, resaltando la sensibilidad de las células FANC-A (Molina, *et al.*, en proceso) sugiriendo que la hidroxiurea genera un daño celular en fase G2, diferente del daño que provoca en fase S.

En resumen, existen tres antecedentes directos importantes: a) las células AF deficientes en la vía AF/BRCA, son hiperdependientes de vías de reparación alternas (Kennedy, *et al.*, 2007). b) se ha observado en células leucémicas (no AF), que la HU inhibe la activación de ATM, una proteína de la principal vía alterna de señalización de daño (Kurose, *et al.*, 2006) y c) la HU genera daño cromosómico en fase G2 principalmente cuando existe un pre-tratamiento con MMC (Molina, *et al.*, en proceso). Por lo anterior, en el presente estudio se propone analizar la activación de la vía ATM como respuesta al tratamiento con MMC e hidroxiurea en células con mutación en el gen FANCA, las cuales son las más sensibles al tratamiento secuencial de MMC e HU (Molina, *et al.*, en proceso).

2. HIPÓTESIS

Si el incremento al daño al ADN de las células AF provocado por la adición de HU en fase G2, se debe a que no se activa la vía de reparación alterna mediada por ATM, entonces el tratamiento con HU provocará una disminución de la expresión de ATM y/o una baja en su activación por fosforilación en ser 1981.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la participación de ATM en la generación de daño al ADN inducido por HU, mediante el análisis de la activación de ATM por mitomicina C e hidroxiurea en células AF-A y normales, en diferentes fases del ciclo celular.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar las diferencias en el daño a nivel cromosómico entre células normales y células AF-A, producido por Mitomicina C (patognomónico de anemia de Fanconi), Hidroxiurea y Mitomicina C + Hidroxiurea
- 2) Determinar los niveles de expresión del mensajero del gen *ATM*, en células normales y células AF-A en respuesta a cada tratamiento.
- 3) Detectar las diferencias en la activación de la proteína ATM en células normales y células AF-A en diferentes fases del ciclo celular y en respuesta a cada tratamiento.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

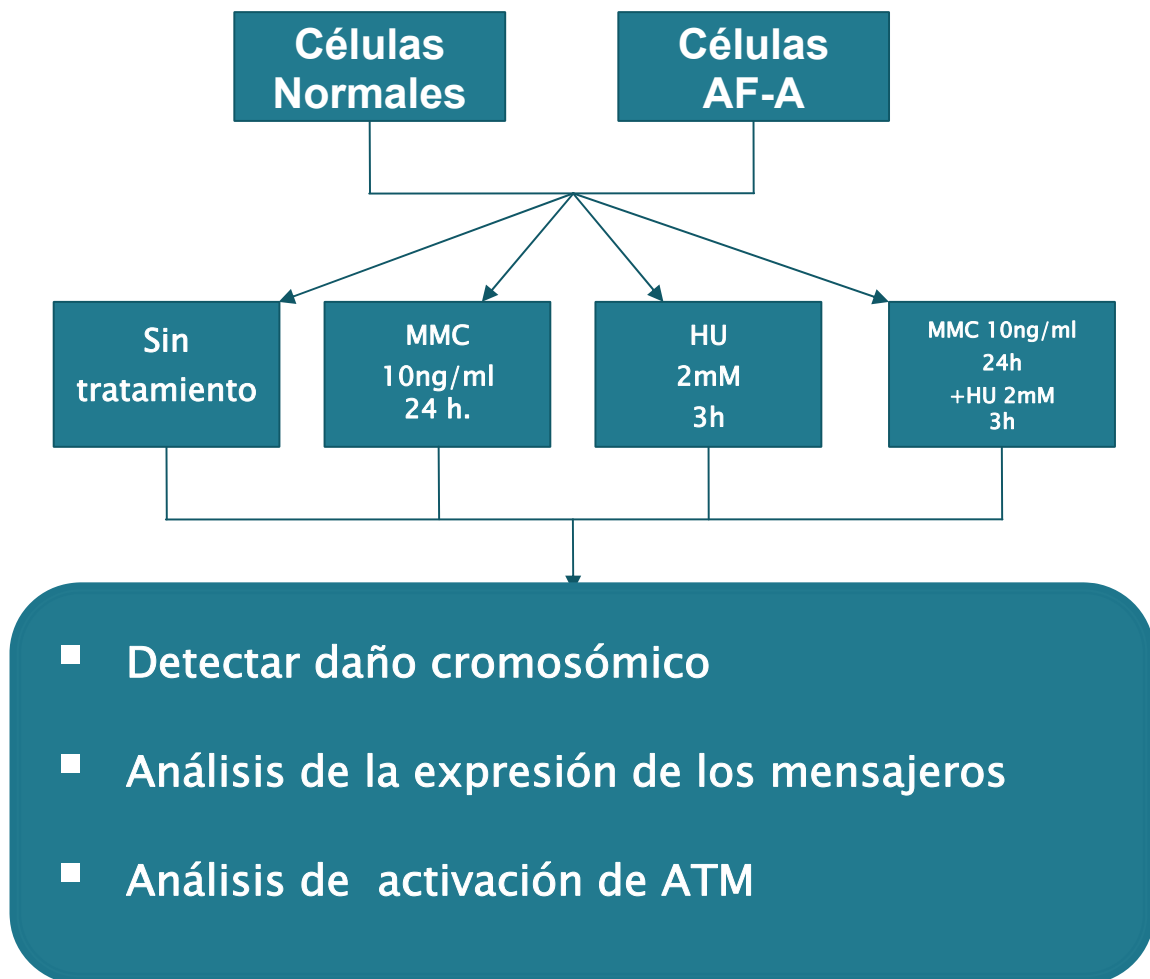


Figura 8. **Estrategia experimental.** Se cultivó líneas celulares linfoblastoides normales y (VU817). Los cuales se sometieron a los siguientes tratamientos. 1) Sin tratamiento. 72h en medio de cultivo. 2) MMC. 24h en medio de cultivo posteriormente se agregó MMC (10ng/ml) durante 24h, lavado del cultivo y 24h recuperación en medio de cultivo nuevo. 3) HU. 69h en medio de cultivo posteriormente se agregó HU 2mM 3h antes de la cosecha. 4) MMC+HU. 24 horas en medio de cultivo, posteriormente se agregó MMC (10ng/ml) durante 24h. lavado del cultivo y 21h de recuperación en medio de cultivo nuevo al cual 3h antes de la cosecha se le agrego HU 2mM. Para la cosecha a todos los tratamientos se les agregó 0.4ng/ml de colchicina 2h horas antes dividirlos para los ensayos realizados.

5. METODOLOGÍA

5.1. Líneas celulares y tratamientos

Se utilizaron las líneas celulares linfoblastoides normal (NL49) y AF-A (VU817). Cada línea se dividió en cuatro sub-cultivos de 25×10^6 células, las cuales fueron sembradas a una concentración de 0.3×10^6 cel/ml y recibieron el siguiente esquema de tratamiento:

- a) Cultivo sin tratamiento: Se mantuvieron las células en medio RPMI-1640 suplementado durante 72 h. Al finalizar el lapso se cosechó el cultivo.
- b) Mitomicina C. Se sometió el cultivo a una concentración final de mitomicina C de 10 ng/ml durante 24 h. Posteriormente las células se lavaron tres veces con solución Hank's y se dejaron reposar en condiciones de cultivo por 24 h. Al término de este lapso se cosechó el cultivo.
- c) Hidroxiurea. Se agregó hidroxiurea al cultivo a una concentración final de 2 mM en fase G2 (3 h antes del cultivo).
- d) Mitomicina C + Hidroxiurea. Se sometió el cultivo a una concentración final de mitomicina C de 10 ng/ml durante 24 h. Posteriormente las células se lavaron tres veces con solución Hank's, se dejaron reposar en condiciones de cultivo 21 h y se agregó hidroxiurea al cultivo a una concentración final de 2 mM en fase G2 (3 h antes del cultivo)

A todos los cultivos se les agregó colchicina a una concentración final de 0.4 ng/ml durante 2 h. antes de ser cosechados. Una vez terminados los tratamientos los sub-cultivos se dividieron de la siguiente manera:

- I. 5×10^6 células para realizar análisis de daño cromosómico en metafase.
- II. 10×10^6 células para análisis de expresión de los mensajeros.
- III. 15×10^6 células para determinar la activación de ATM.

5.2. Análisis del daño cromosómico

Una vez terminados los tratamientos las células se incubaron con solución hipotónica (KCl 0.075 M) a 37°C. Para la prefijación de las células se utilizó 1.5 ml fijador Carnoy de metanol y ácido acético (3:1). Posteriormente se continuó con lavados de fijador hasta obtener un botón celular limpio. Las laminillas se prepararon por goteo y las metafases fueron teñidas con colorante Giemsa. Para realizar el análisis de daño cromosómico se revisaron 50 metafases, se tomaron en cuenta rupturas cromosómicas, rupturas cromatídicas, figuras radiales, cromosomas dicéntricos, fragmentos cromosómicos.

5.3. Análisis de expresión de los ARN mensajeros de *ATM* y *ATR*

5.3.1.Extracción de ARN total.

Para obtener ARN total se lavaron las células 2 veces con PBS-DEPC 1X, posteriormente se utilizó Trizol Reagent® siguiendo el protocolo para extracción de ARN del laboratorio del grupo de genómica cuantitativa de la UTHSC-Houston (Shipley, 2006). Brevemente, para cada muestra por cada tratamiento se utilizó 1 ml de Trizol por 5×10^6 células, la mezcla se pasó 10 veces por aguja de insulina. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se agregó cloroformo en una relación de

volumen de 0.2:1 con el Trizol usado, se agitó con la mano hasta obtener una solución homogénea, se incubó por 2.5 min a temperatura ambiente. Una vez concluido este tiempo se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. La fase acuosa generada se transfirió a un tubo nuevo, donde se agregó 500 µl de isopropanol por cada 600 µl de solución acuosa. Posteriormente, la muestra se pasó por una columna RNeasy (Quiagen) poniendo 700 µl, se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 seg a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió hasta haber pasado toda la muestra por la columna. A continuación realizaron dos lavados con 500 µl de buffer RPE (incluido en el Kit), en el segundo lavado el tiempo de centrifugación se aumentó a 2 min, posteriormente se centrifugo la columna durante 1 min a 13,000 rpm. Finalmente la columna se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregó 30 µl de agua libre de RNAsas y se centrifugo 1 min a 10,000 rpm, este proceso se repitió una vez mas. La solución obtenida contiene el ARN total el cual se cuantificó por su absorbancia a 260 nm usando el equipo “nanodrop”.

5.3.2.Síntesis de ADN complementario (cDNA)

Se utilizó un 1µg de ARN el cual fue tratado con 10 unidades de DNAsa 1 (invitrogen) se incubó 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se inactivó la DNAsa 1 agregando 1µl de EDTA 25mM e incubando la reacción por 10 min a 65°C. Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA mediante el uso de oligos dT y hexámeros al azar utilizando el Kit “Transcriptor” (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a cada tubo se le agregó 1 µl de oligo dT, 2 µl de hexámeros al azar, se incubo a 65 °C por 10 min. Al terminar el tiempo de incubación

se colocaron los tubos en hielo, y a cada tubo se le agregaron 4µl de buffer 5X, 2µl de dNTP's, 0.5 µl de inhibidores y 0.5 µl de la enzima transcriptasa inversa. Posteriormente se colocaron en un termociclador Mastercycler con el siguiente programa 25°C durante 10 min, 50°C durante 60 min, 85°C durante 10 min, 4°C hasta retirar los tubos. Se cuantificó el cDNA y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Con la finalidad de conocer la cantidad óptima de cDNA a usar en los ensayos de PCR tiempo real, primero se realizaron curvas de amplificación utilizando diferentes cantidades de cDNA proveniente de células normales sin tratamiento. Para la amplificación de los genes de expresión constante: *7SL*, *β-actina* y *β-2 microglobulina (B2M)*, que fueron utilizados como genes de referencia, así como de los genes ATM y ATR, considerados como los genes problema.

Para lograr la amplificación de los fragmentos de interés se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada fragmento (TABLA 2), y se utilizaron sondas específicas (Universal Probes, Roche) para lograr la detección de regiones internas para cada fragmento.

Los oligonucleótidos para cada gen fueron diseñados usando el programa ProbeFinder de Roche, el cual asigna una sonda específica del kit Universal Probes. Una vez conocida la cantidad óptima de cDNA (2 µg), se realizaron los ensayos de amplificación por tiempo real con el cDNA de cada tratamiento para ambas líneas celulares. Los datos obtenidos se analizaron mediante la fórmula reportada por Pfaffl en 2001.

$$R=2^{-\Delta\Delta C_p}$$

$$R=2^{-\Delta\Delta C_p}=2^{-[\text{Gen problema}(C_p \text{ tratamiento}-C_p \text{ sin tratamiento})]-[\text{Gen referencia}(C_p \text{ tratamiento}-C_p \text{ sin tratamiento})]}$$

5.4. Análisis de la activación de ATM en diferentes fases del ciclo celular por citometría de flujo.

Las células fueron fijadas con 1% de formaldehído directo en el medio durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente fueron permeabilizadas con metanol absoluto a -20°C por al menos 1h. Posteriormente se colocaron 0.5×10^6 células en tubos de 1.5 ml y se lavaron con PBS 1X, se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios: rabbit anti-CENPF (Novus) y mouse anti-ATM-P (Ser 1981) (CellSignaling) a una dilución de 1:100 en PBS-BSA al 5%. Al terminar el tiempo de incubación las células se centrifugaron a 2000 rpm por 15 min y se les retiró con micropipeta la solución de anticuerpos primarios, posteriormente las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios: goat anti-mouse conjugado a FITC (Invitrogen) y goat anti-rabbit conjugado a PE-Cy5.5 (Invitrogen) a una dilución 1:500 en PBS-BSA 5%; se incubaron por 2 h en oscuridad a temperatura ambiente. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo modelo FACs Calibur (BD).

5.5. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa aplicando análisis de varianzas ANOVA y t de student .

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados y sondas correspondientes. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos así como el número de sonda “Universal probes” que fue utilizada para cada ARN mensajero.

ARN mensajero	Sonda	Oligo	Tamaño	Secuencia (5' -> 3')
β -Actina	64	Sentido	18	cca acc gcg aga aga tga
		Antisentido	20	cca gag gcg tac agg gat ag
B2M	42	Sentido	19	ttc tgg cct gga ggc tat c
		Antisentido	23	tca gga aat ttg act ttc cat tc
7SL	26	Sentido	19	gct gga gga tcg ctt gag t
		Antisentido	18	gac acc cga tcg gca tag
ATR	31	Sentido	21	gac att ggg cct ata ttg cag
		Antisentido	22	tgg ttt ctg aag aga agc aag a
ATM	80	Sentido	26	tga tag tag tgt tag tga tgc aaa cg
		Antisentido	23	cag cta aag gat taa tgg cac ct

6. RESULTADOS

6.1. Daño cromosómico espontáneo e inducido por MMC e HU.

En el análisis de metafases se observó que existe una diferencia significativa entre líneas celulares (tabla 3). Cuando se compara a las células normales con las células AF-A sin tratamiento, se observa que las últimas presentan un mayor número de aberraciones cromosómicas (AC), característico de las células de AF (Molina y Frías, 2006). El tratamiento con HU genera en las células AF-A un aumento significativo en la frecuencia de AC (0.52 AC/cel y $p=0.0039$), estos hallazgos están de acuerdo con los previamente reportados (Martínez, et al., 2008). Aunque se ha demostrado que la vía AF se activa en respuesta a HU por estrés replicativo (Howlett, et al., 2005), este efecto se descarta debido a que el tratamiento con HU es únicamente 3 h previas a la cosecha de metafases, lo cual ratifica que los datos obtenidos en el análisis de metafases son específicos de un tratamiento con HU en la fase G2. Una explicación del porque la HU genera AC sería porque podría interferir con la reparación postreplicativa del ADN al abatir la generación de dNTPs necesarios para reparar las lesiones endógenas generadas en las células AF. Por otra parte, se ha reportado que las células AF presentan hipersensibilidad a agentes inductores de enlaces cruzados que se manifiesta como un incrementando en la frecuencia de AC (Joenje, *et al.*, 1995; Moustacchi, 2003; Molina y Frías, 2006); esto es lo que observamos en las células AF-A tratadas con MMC (figura 9), en las cuales el número de AC aumenta significativamente en relación con las células no tratadas (5.91 AC/cel y $p=0.0001$). Como se observa claramente, el tratamiento con MMC+HU generó un aumento

significativo (11.941 AC/cel y $p=0.001$) en relación a las células sin tratamiento y a las células tratadas con MMC o con HU de manera independiente (figura 9), siendo los datos coincidentes y consistentes con los resultados obtenidos por Molina, et al., (en proceso), quien resalta la sensibilidad de las células FANC-A a este tratamiento. Se ha reportado previamente que la aplicación de HU a células C1 de Hámster Chino en fase G2, potencia el daño al ADN generado por el agente alquilante thiotepa, proponiendo la existencia de una vía de reparación en fase G2 la cuál sería sensible a la HU (Hansson & Hartley-Asp, 1981). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo específico por el cual la HU causa este efecto.

Tabla 3. **Frecuencias de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas por MMC e HU.** Se muestran los resultados obtenidos de tres replicas experimentales en las cuales se analizaron 50 células por tratamiento. Se muestra el promedio de las frecuencias de aberraciones en las tres replicas y la desviación estándar obtenida.

Línea	Tratamiento	Replicas			Promedio	D. E.
		1	2	3		
Normal	Sin Tx.	0.04	0.04	0.00	0.03	0.02
	MMC	0.12	0.08	0.40	0.20	0.17
	HU	0.20	0.24	0.32	0.25	0.06
	MMC + HU	0.28	0.12	0.44	0.28	0.16
VU817	Sin Tx.	0.20	0.28	0.32	0.27	0.06
	MMC	6.64	5.72	5.36	5.91	0.66
	HU	0.52	0.56	0.48	0.52	0.04
	MMC + HU	11.08	12.64	12.0	11.91	0.78

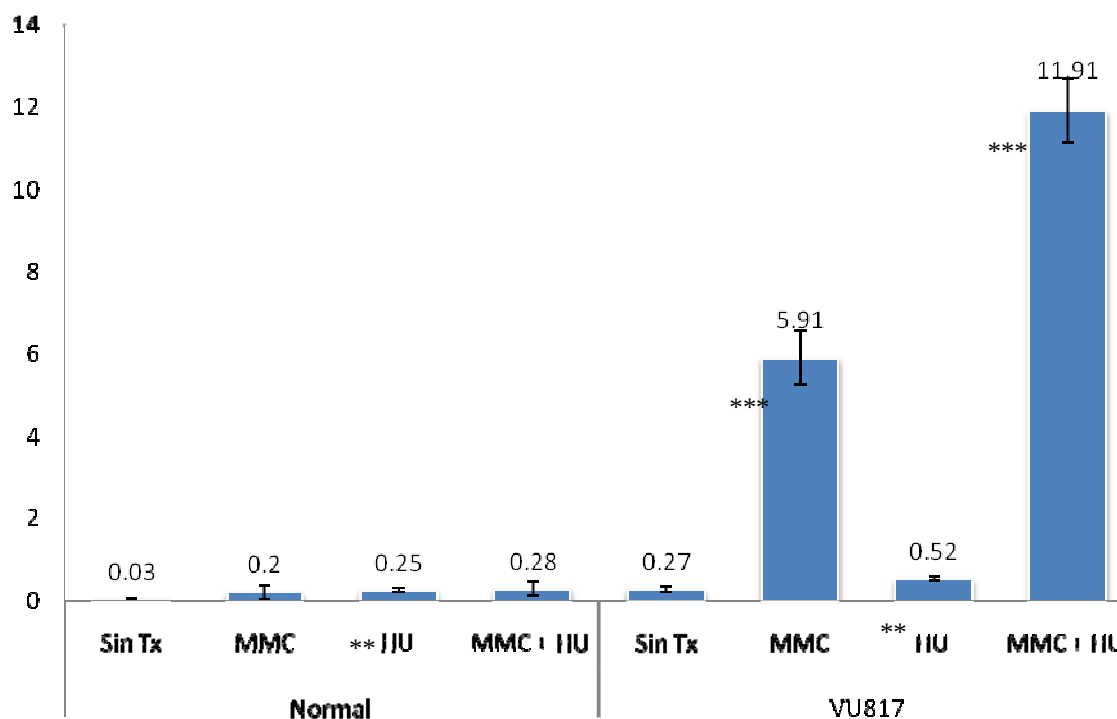


Figura 9. **Gráfica aberraciones cromosómicas por célula.** Se graficaron los promedios obtenidos de tres replicas biológicas, se muestran en ambas líneas celulares, normal y AF (VU817) los datos obtenidos de los cuatro cultivos, el control sin tratamiento y los tres tratamientos (MMC, HU y MMC+HU). Se observa la diferencia de las líneas celulares en respuesta a los tratamientos. En la línea AF se observa claramente el daño cromosómico generado por la MMC así como la potenciación del daño generado por HU en células previamente dañadas (MMC+HU), lo cual no se observa en las células normales.

** $p < 0.005$ en relación a sus células control sin tratamiento.

*** $p < 0.001$ en relación a sus células control sin tratamiento.

6.2. Análisis de expresión de los ARN mensajeros de *ATR* y *ATM*

Para conocer la cantidad de cDNA necesaria para realizar los ensayos se obtuvieron las curvas de amplificación de los genes B2M, 7SL, β -actina, *ATR*, y *ATM* a partir del cDNA de células normales sin tratamiento. Como se observa en las Figuras 10, 11 y 12, las curvas de amplificación se encontraron en un rango de 1.8 a 2 y mantuvieron una eficiencia de amplificación constante lo que permite utilizar modelos de cuantificación relativa (Pfaffl, 2006). Con las mismas curvas, se determinó que la cantidad de cDNA que se usaría era de 2 μ g, ya que con ella se logró que la amplificación de todos los cDNA's estuviera dentro de los rangos validos para realizar los análisis de cuantificación relativa (Pfaffl, 2006). Por lo anterior, las reacciones subsecuentes tanto de la línea normal (Figuras 13 y 16) como de la línea AF (Figuras 14 y 17) se realizaron usando 2 μ g de cDNA.

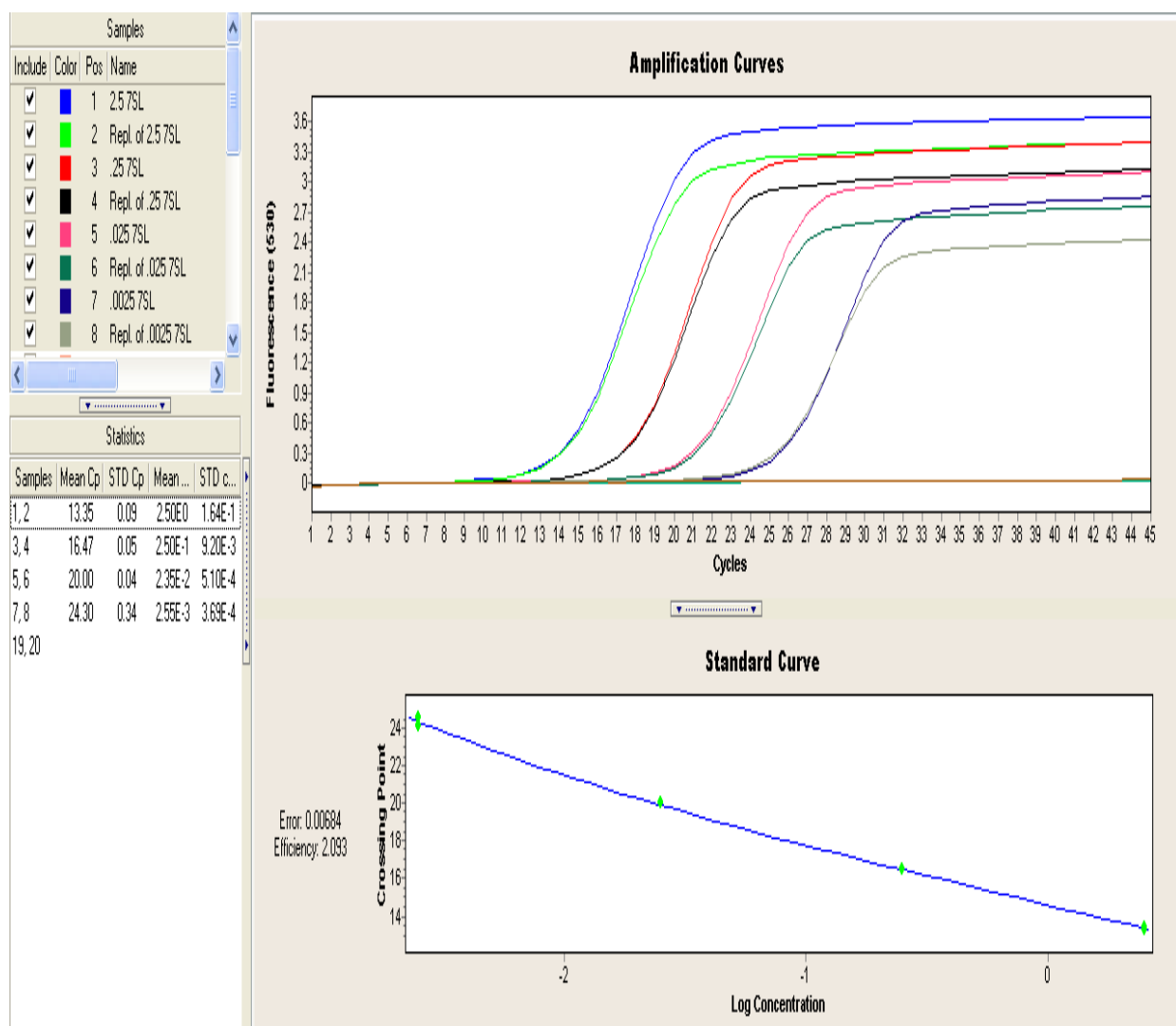


Figura 10. **Curva de amplificación de 7SL.** Se observa la curva de amplificación obtenida del gen 7SL con cuatro diluciones de cDNA (2.5µg, 0.25µg, 0.025µg, 0.0025µg), la curva estándar obtenida y la eficiencia de la reacción.

Figura 11. **Curva de amplificación *ATR***. Se observa la curva de amplificación obtenida del gen *ATR* con cuatro diluciones de cDNA (2.5µg, 0.25µg, 0.025µg, 0.0025µg), la curva estándar obtenida y la eficiencia de la reacción.

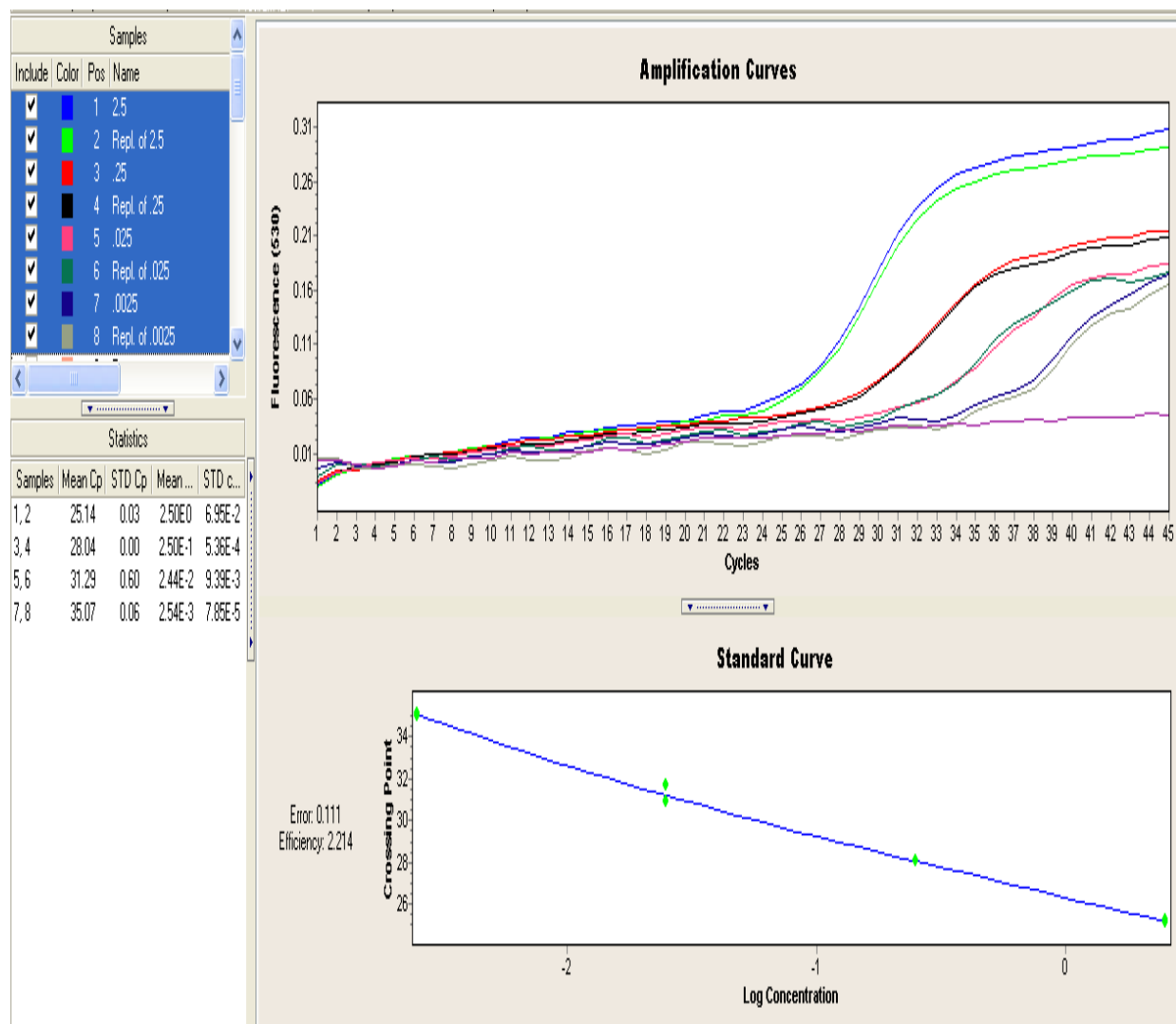


Figura 12. **Curva de amplificación ATM.** Se observa la curva de amplificación obtenida del gen *ATR* con cuatro diluciones de cDNA (2.5µg, 0.25µg, 0.025µg, 0.0025µg), la curva estándar obtenida y la eficiencia de la reacción.

6.2.1. Expresión relativa de ATR

Al analizar los resultados del qRT-PCR no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión el gen *ATR* entre los distintos tratamientos en ambas líneas celulares (Figura 15), esto se concluye en base a la literatura que indica como diferencia 0.5 en nivel de expresión con una $p < 0.05$ para que sea considerado como significativo (Martínez, *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos son congruentes con lo reportado por Andreassen y colaboradores (2004) y Collins y colaboradores (2009) quienes han demostrado que ATR es necesaria para el correcto funcionamiento de la vía AF y la deficiencia en la línea celular AF estudiada se encuentra río abajo en esta cascada.

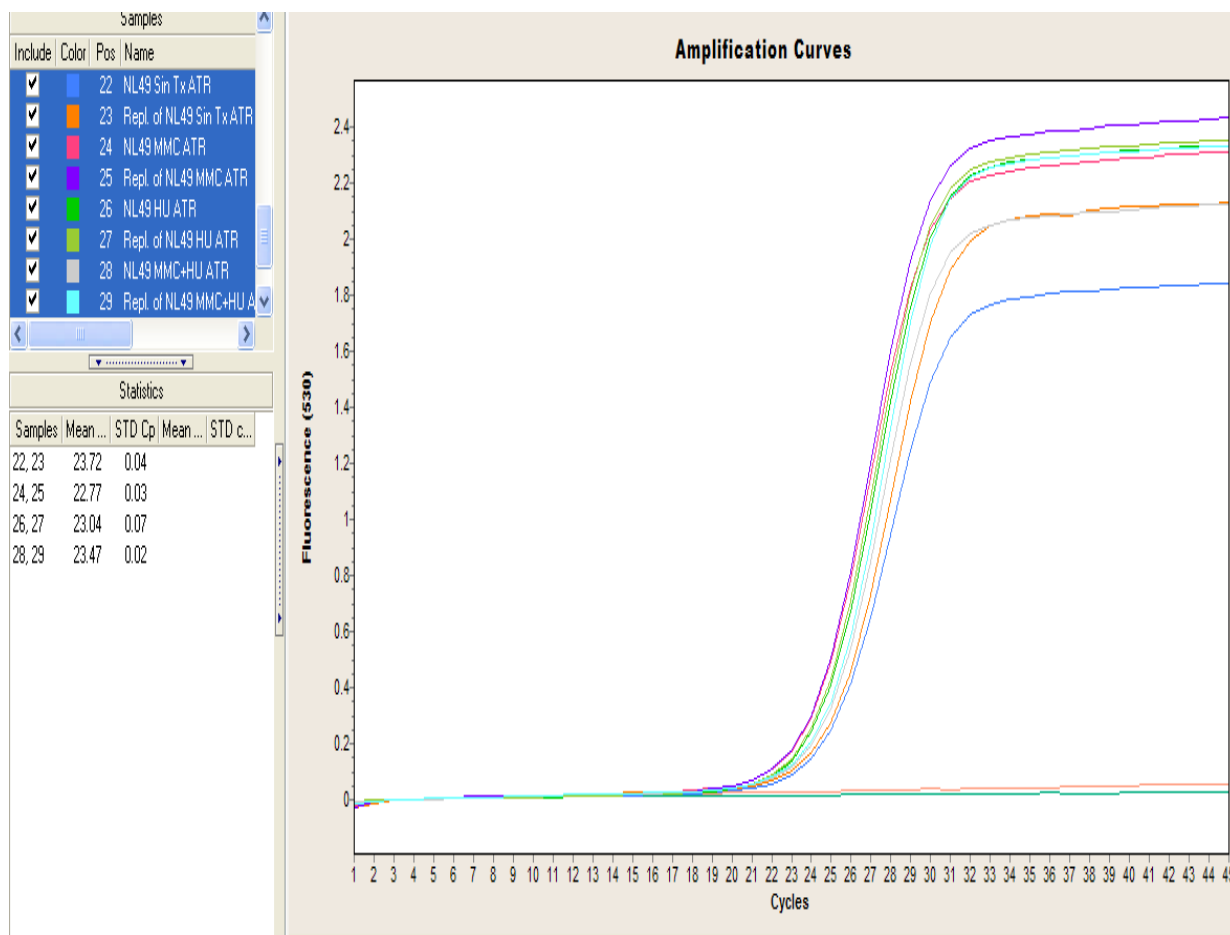


Figura 13. **Curvas de amplificación ATR representativas de la línea NL49.** Se observan las curvas de amplificación del gen *ATR* obtenidas a partir de células normales tratadas con MMC, HU y MMC+HU, así como de células sin tratamiento, se realizaron duplicados técnicos de cada una de las reacciones. A la izquierda de la figura se muestra los datos de C_p obtenidos y la desviación de las replicas técnicas.

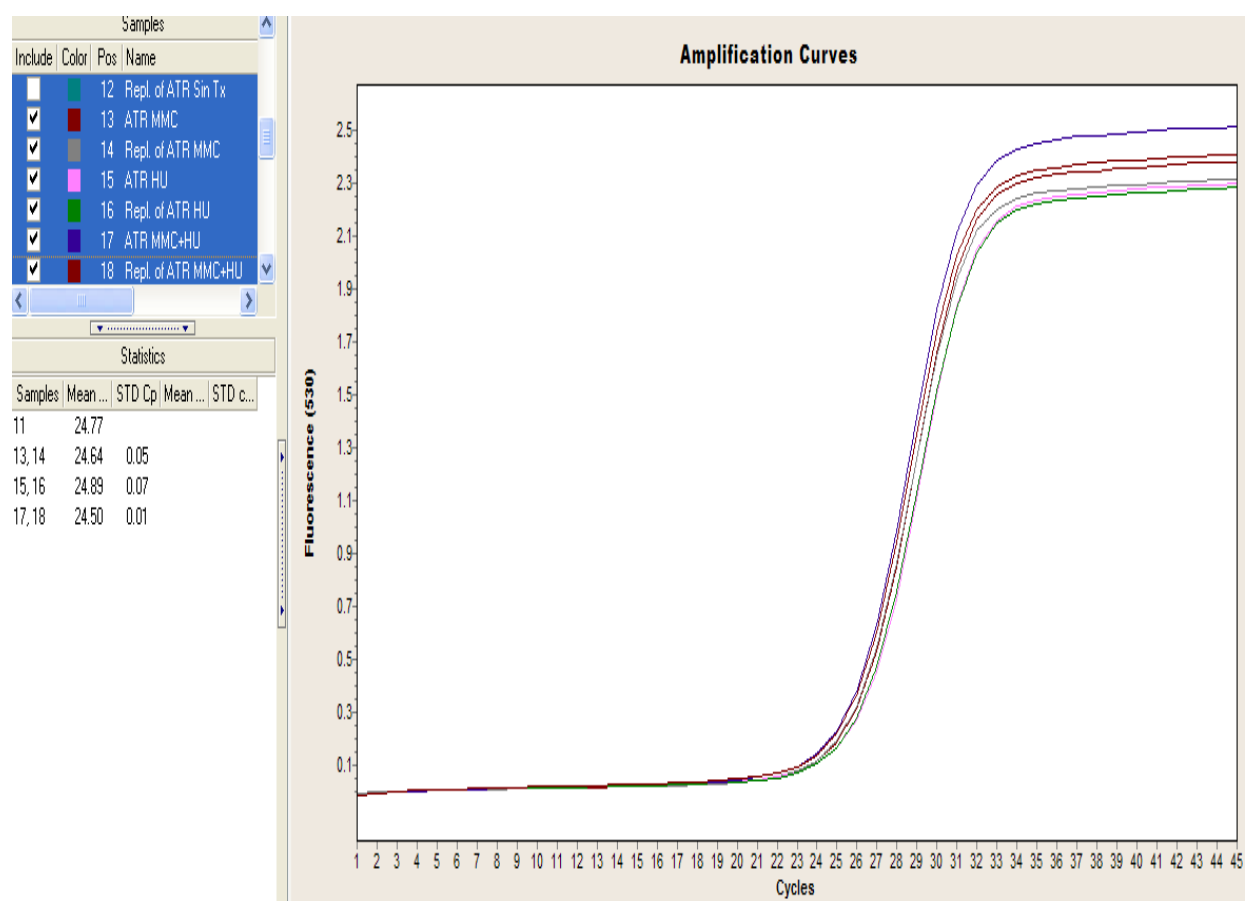


Figura 14. **Curvas de amplificación ATR** representativas de la línea VU817 (AF).

Se observan las curvas de amplificación del gen *ATR* obtenidas a partir de células AF-A tratadas con MMC, HU y MMC+HU, así como de células sin tratamiento., se realizaron duplicados técnicos de cada una de las reacciones. A la izquierda de la figura se muestra los datos de Cp obtenidos y la desviación de las replicas técnicas.

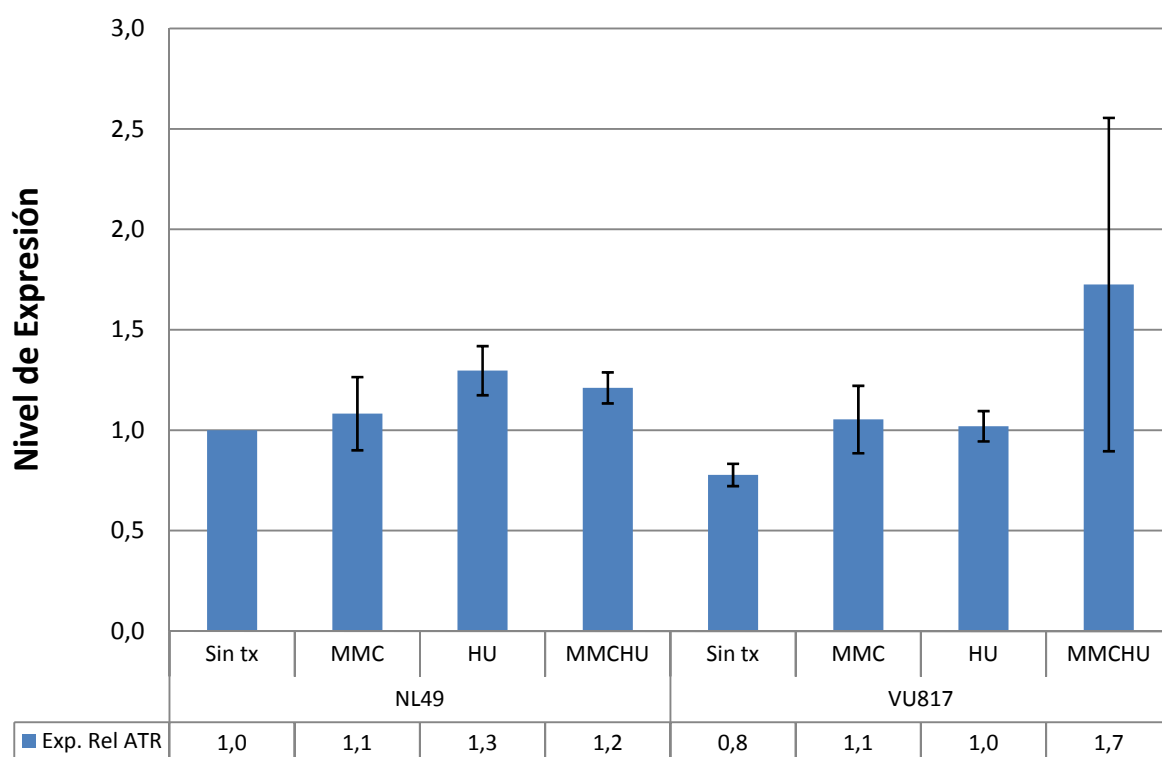


Figura 15. **Gráfica de expresión relativa de ATR.** Se muestran y grafican los promedios obtenidos después de realizar el análisis de expresión relativa para tres replicas biológicas. Los datos de expresión relativa fueron obtenidos usando como genes de referencia *7SL*, *B2M* y β -actina, y en relación a los niveles de expresión de las células normales (NL49) sin tratamiento. No existen diferencias significativas en la expresión de *ATR* en las células normales, ni en las células AF (VU817).

6.2.2. Expresión relativa de ATM

La expresión de *ATM* en la línea normal tratada con MMC, HU o MMC+HU no presentó diferencias significativas cuando se comparó fueron comparadas con el cultivo control, mientras que en la línea VU817 tratada con MMC se observó una sobreexpresión comparada con la expresión en células normales, pero sin diferencias significativas entre tratamientos, posiblemente debido a la gran desviación estándar (Figura 18). El efecto de la MMC concuerda con lo reportado por Yamamoto (2008), quien propone que la MMC puede estar incrementando la actividad del promotor de *ATM* vía el factor de transcripción E2F-1, el cual regularía la expresión de *ATM*.

Figura 16. **Curvas de amplificación *ATM* representativas de la línea NL49.** Se observan las curvas de amplificación del gen *ATM* obtenidas a partir de células normales tratadas con MMC, HU y MMC+HU, así como de células sin tratamiento, se realizaron duplicados técnicos de cada una de las reacciones. A la izquierda de la figura se muestra los datos de C_p obtenidos y la desviación de las replicas técnicas.

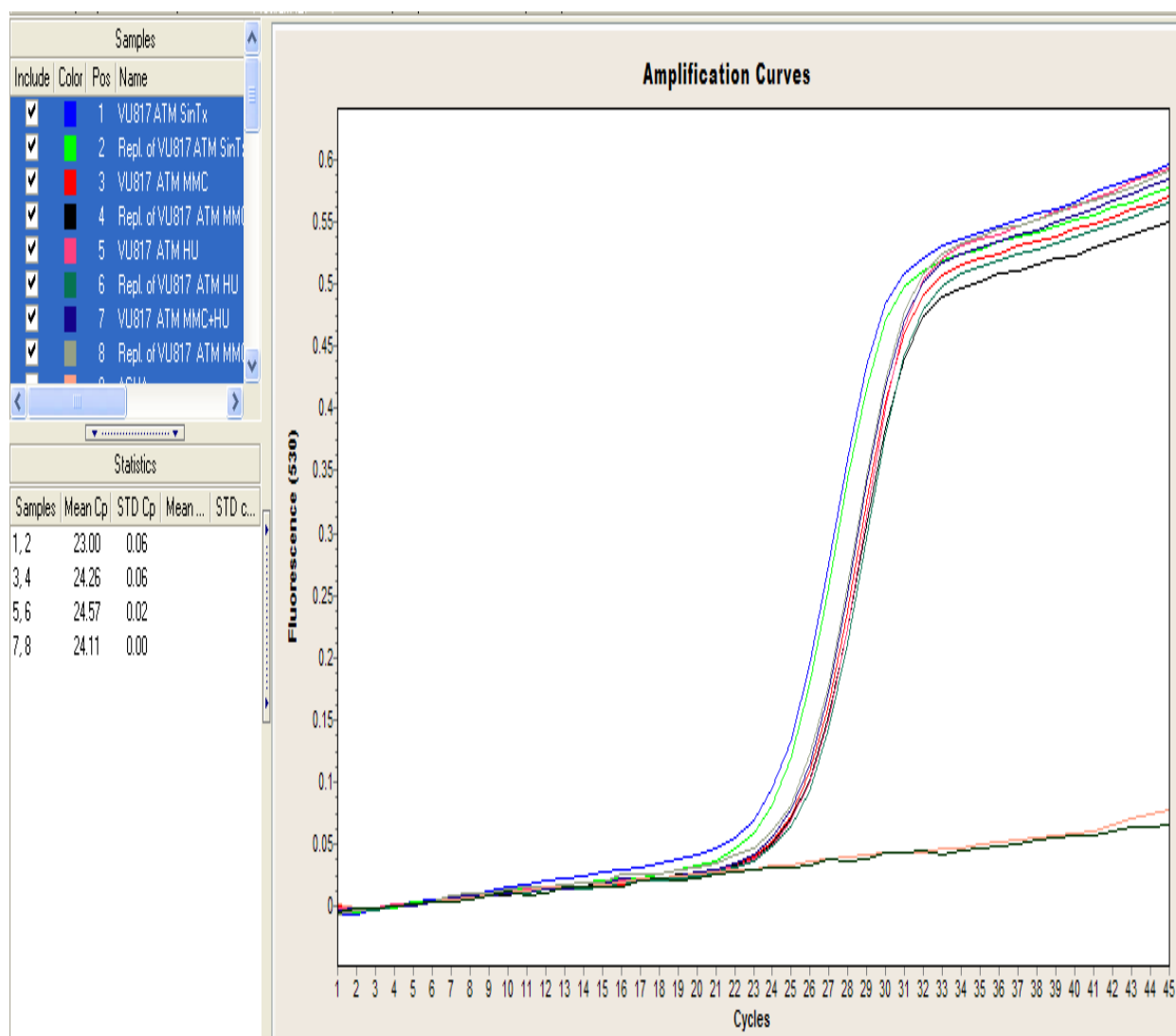
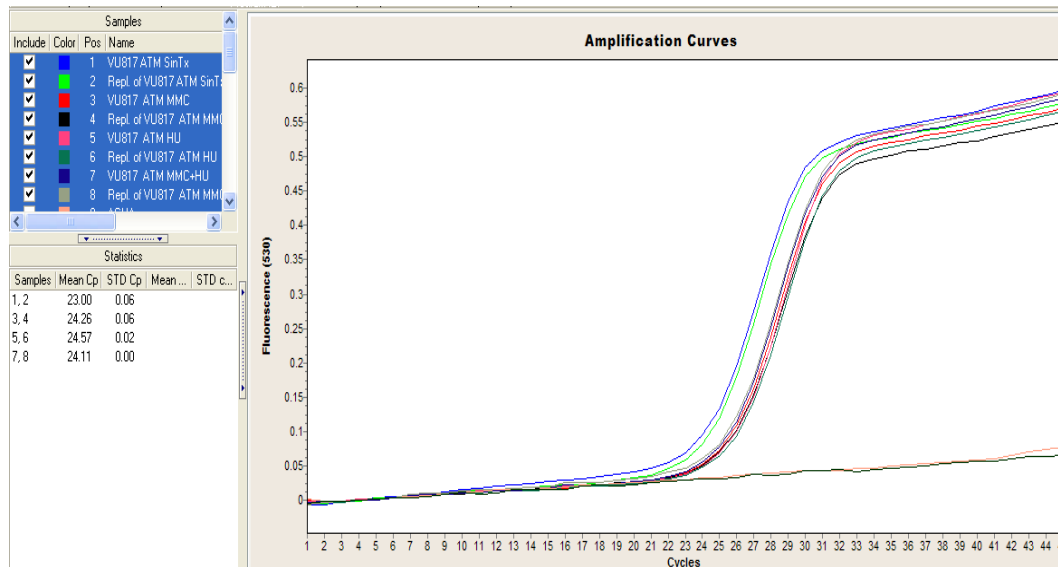


Figura 17. Curvas de amplificación *ATM* representativas de la línea VU817. Se



observan las curvas de amplificación del gen *ATM* obtenidas a partir de células AF-A tratadas con MMC, HU y MMC+HU, así como de células sin tratamiento, se realizaron duplicados técnicos de cada una de las reacciones. A la izquierda de la figura se muestra los datos de Cp obtenidos y la desviación de las replicas técnicas.

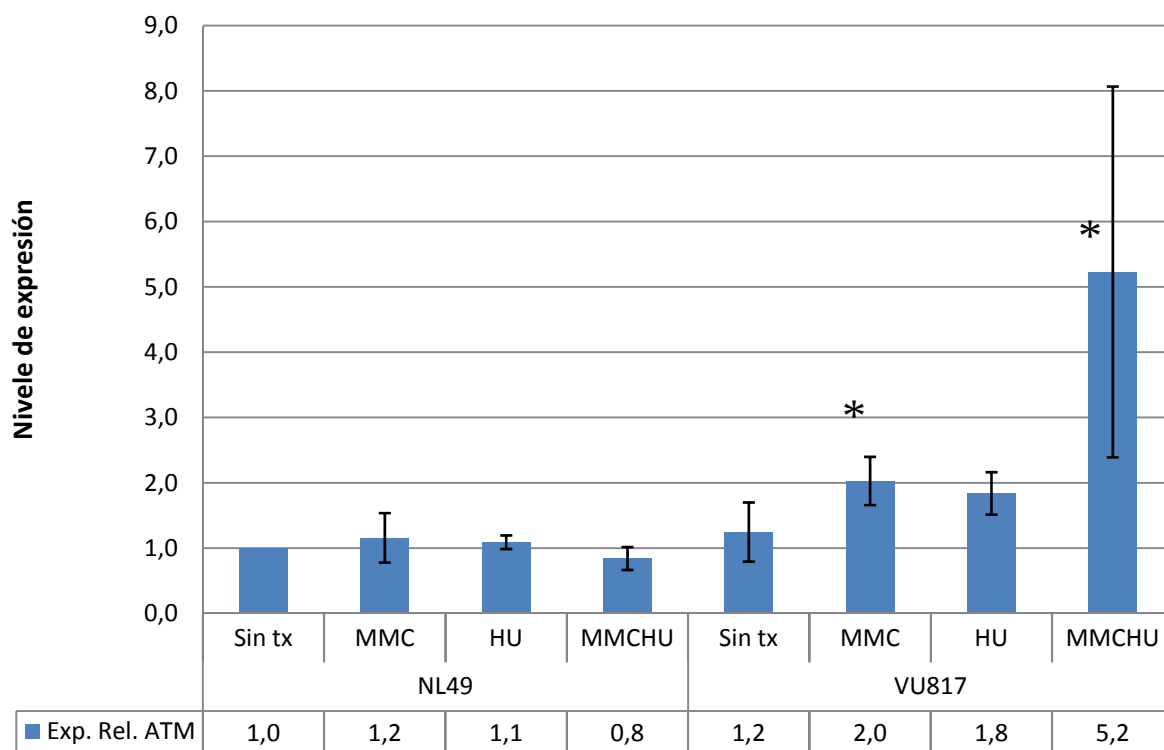


Figura 18. **Gráfica de expresión relativa de *ATM***. Se muestran los promedios obtenidos después de realizar el análisis de expresión relativa para tres replicas biológicas. Los datos de expresión relativa fueron obtenidos usando como genes de referencia *7SL*, *B2M* y *β -actina*, y en relación a los niveles de expresión de las células normales (NL49) sin tratamiento. No existen diferencias significativas en la expresión de *ATR* en las células normales. En las células AF (VU817) existen diferencias significativas entre las células tratadas con MMC y MM+HU cuando se comparan con las células sin tratamiento, pero no existen diferencias entre estos tratamientos, ni entre las células tratadas con HU y las células control.

* $p < 0.05$ en relación a sus células control sin tratamiento.

6.3. Análisis de activación de la proteína ATM en diferentes fases del ciclo celular por medio de citometría de flujo.

6.3.1. Análisis de distribución en el ciclo celular

En la figura 19 se observa que en la línea celular NL-49 no existen diferencias significativas entre tratamientos en relación a la distribución de las células en el ciclo celular, esto puede deberse a que los sistemas de reparación de las células normales han reparado el daño generado por la MMC, ya que el tiempo de exposición a HU no fue suficiente para arrestar en la fase S a un número de células suficientes para generar una diferencia significativa.

En las células AF-A en cambio, se observan dos grupos de tratamientos que desplazan la distribución (figura 20), esto puede deberse a que la MMC en células AF genera un arresto en el ciclo celular en fase G2, mostrando diferencias en el comportamiento, sin embargo al realizar el análisis estadístico estas diferencias no fueron significativas.

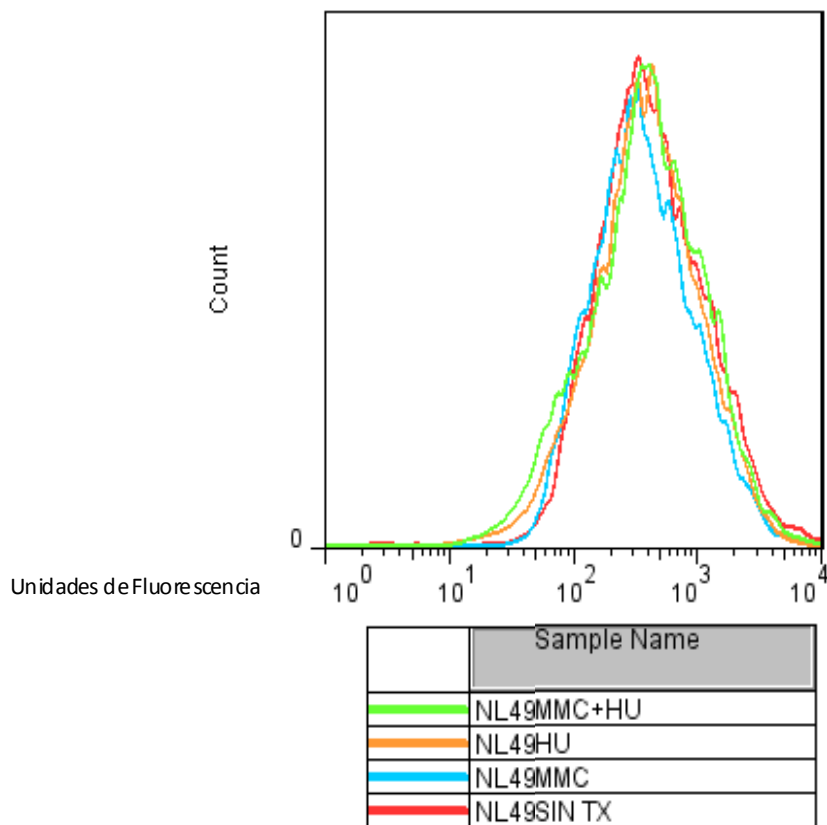


Figura 19. **Distribución de las células normales en el ciclo celular.** Se muestra una sobre-posición de los histogramas representativos de las células NL49 tratadas con MMC, HU y con MM+HU. Cada histograma muestra las células que se encuentran en G2 (CENPF +). No se observa diferencia entre los tratamientos y células control.

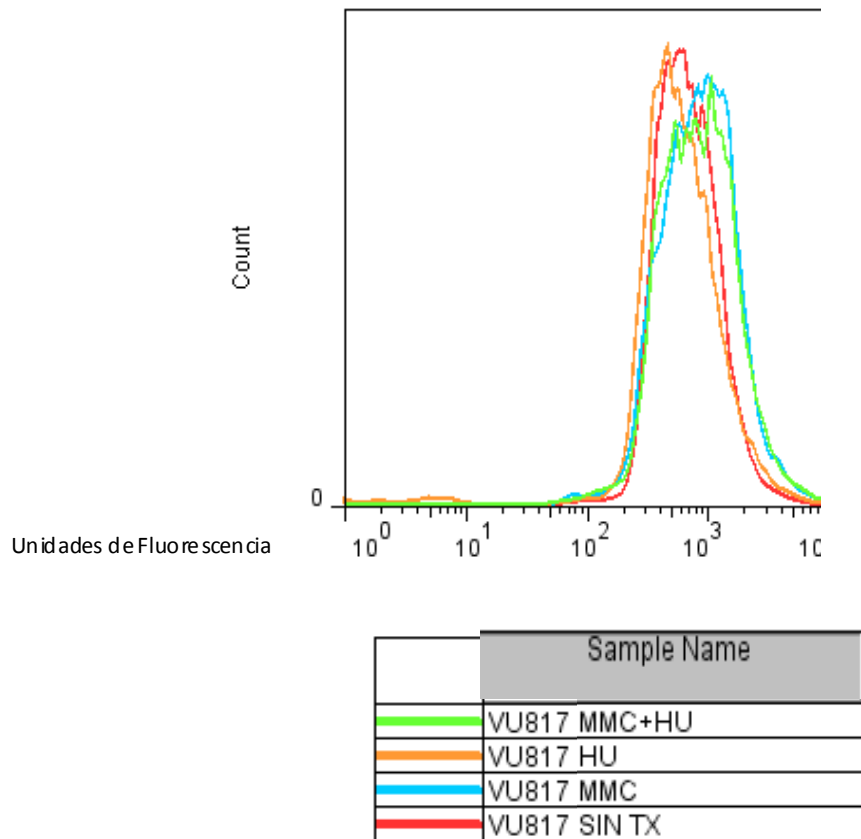


Figura 20. **Distribución de las células AF-A en el ciclo celular.** Se muestra una sobre-posición de los histogramas representativos de las células AF-A tratadas con MMC, HU y con MM+HU. Cada histograma muestra las células que se encuentran en G2 (CENPF +). Se observa una diferencia entre los tratamientos MMC y MMC+HU cuando se comparan con las células control, el desplazamiento de indica que existe un mayor número de células AF que se encuentran en G2/M.

6.3.2. Análisis de Activación de ATM

En la figura 21 se observa que en la línea celular NL49 no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos. Esto puede deberse a que el daño generado por la MMC es reparado por otra vía; como se ha reportado, las células reparan el daño causado utilizando la vía ATR-AF-BRCA para reparar los enlaces intercatenarios, mientras que el daño generado por HU en G2 podría estar activando esta misma vía de reparación o una vía alterna diferente a ATM.

Por otra parte se observa (figura 22) en la línea celular AF un aumento en la señal de ATM-P, mostrando dos grupos de respuesta, las células tratadas con MMC y las que no son tratadas con MMC. Esto se debe a que cuando las células no poseen los sistemas de reparación completos necesitan utilizar vías alternas para reparar el daño al ADN, en este caso, las células AF al ser deficientes de la vía AF-BRCA se vuelven hiperdependientes de la vía ATM.

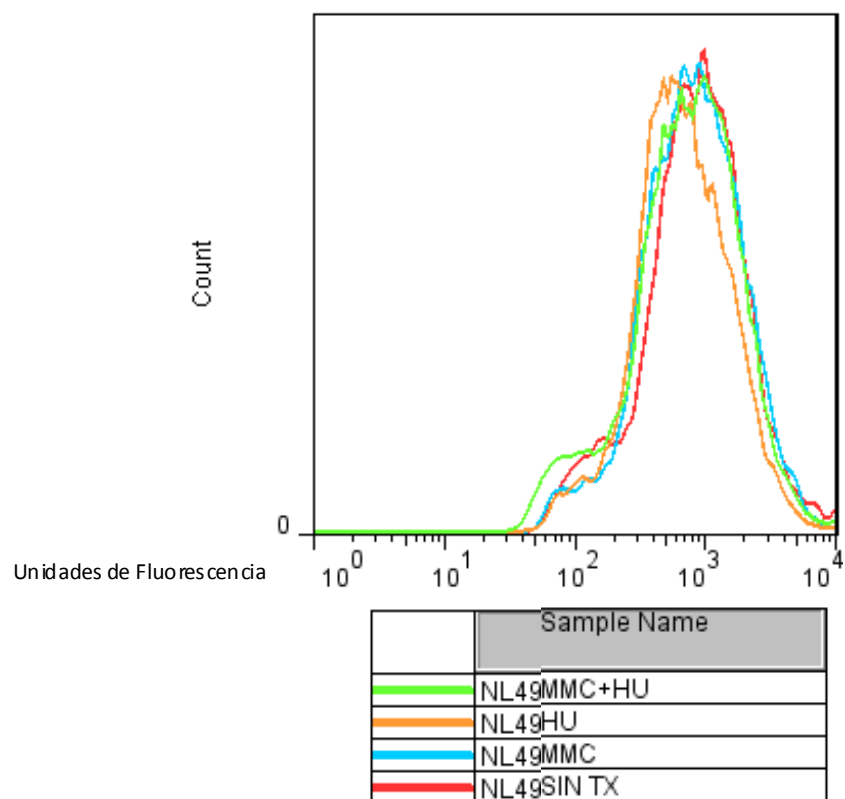


Figura 21. Activación de ATM en células Normales que se encuentran en G2/M.

Se muestran histogramas representativos de los tratamientos y el control de la línea celular normal (NL49). Se observa la señal para ATM-P (Ser 1918) de las células que se encuentran en G2/M. No se observan diferencias en la activación de ATM cuando se comparan los cultivos con tratamiento y los tratados.

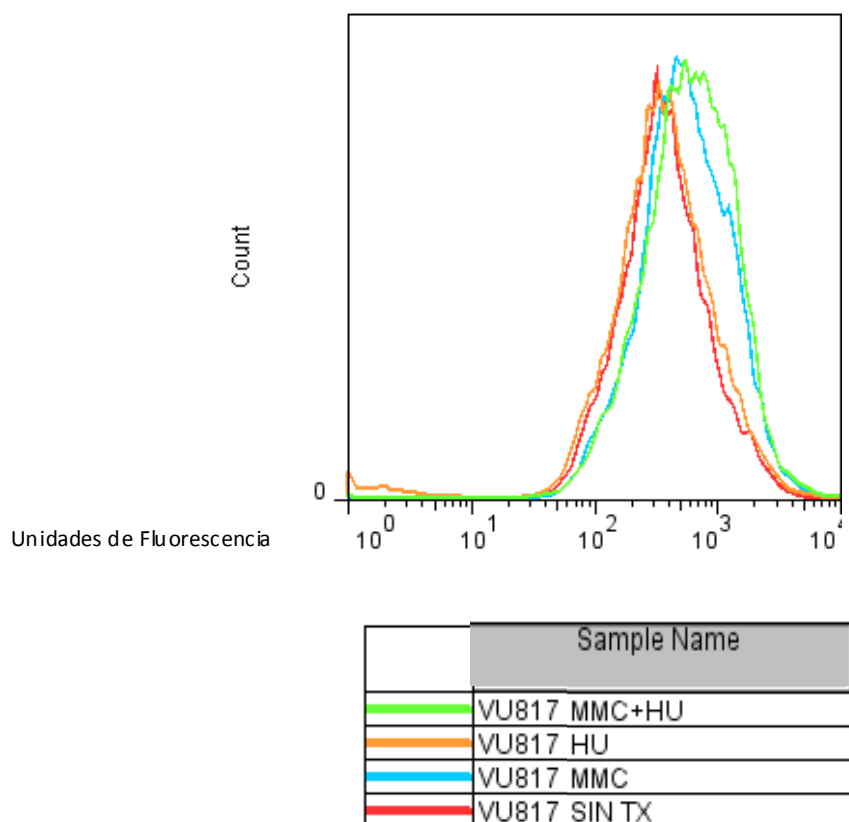


Figura 22. **Activación de ATM en células AF-A que se encuentran en G2/M.** Se muestran histogramas representativos de los tratamientos y el control sin tratamiento de la línea celular AF-A (Vu817). Se observa la señal para ATM-P (Ser 1918) de las células que se encuentran en G2/M. Se observa que las células tratadas con MMC y MMC+HU aumentan la señal de ATM-P. Sin embargo no se observa diferencias en la activación de ATM cuando se comparan los cultivos de MMC y MMC+HU, así como cuando se compara el cultivo control con el tratado con HU.

7. DISCUSIÓN

Daño cromosómico producido por Mitomicina C e Hidroxiurea en células normales y AF-A.

Los resultados obtenidos en el análisis de AC son concordantes con la bibliografía y con resultados previos obtenidos en el laboratorio, la diferencia entre las células sin tratamiento se debe a que las células AF, presentan AC espontáneas (Molina y Frías, 2006; de Winter & Joenje, 2009). Por otro lado la MMC generó un aumento significativo de AC. La sensibilidad de las células AF a los agentes generadores de enlaces intercatenarios ya se ha reportado y se utiliza como prueba diagnóstica para AF (Joenje, et al., 1995; Moustacchi, 2003; Molina y Frías, 2006; Pinto et al., 2009). En lo que se refiere a la respuesta de las células AF al tratamiento con HU se observó un incremento moderado cuando se aplica la HU sola, mientras que cuando se aplica sobre células previamente dañadas con MMC, se encontró una frecuencia significativamente mayor de AC, que está por arriba de la sumatoria de los tratamientos con HU y MMC solas. Este efecto ya se ha reportado previamente y confirma la potenciación del daño a las células AF por parte de la HU, pero no a las células normales (Martínez, *et al.*, 2008).

La HU podría interferir con la reparación post-replicativa del ADN por diferentes vías, una sería al abatir la generación de dNTPs necesarios para reparar las lesiones endógenas (Hansson & Hartley-Asp, 1981) lo cual podría explicar inclusive la elevación de AC en las células sin daño previo. Por otra parte, el tratamiento con HU de células

normales en fase G2 que previamente fueron tratadas con MMC, mostró un ligero aumento en la frecuencia de AC en relación a las células normales tratadas con MMC. En contraste, en las células AF el efecto observado fue la potenciación del daño, dejando a las células AF con el doble de AC causadas por la MMC. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente (Molina *et al.*, en proceso) y sugieren la existencia de algún proceso de reparación post-replicativo paralelo al que desarrolla la vía FANC/BRCA y el cual sería sensible a HU.

Determinación de los niveles de expresión del mensajero de los genes *ATR* y *ATM*, en células normales y células AF-A en respuesta a cada tratamiento.

En el análisis de expresión de *ATR* nos indica que no hay diferencias significativas en los niveles de expresión de las células control sin tratamiento al compararlos con los niveles de expresión de las células tratadas con HU o MMC o MMC+HU, esto ocurrió en ambas líneas celulares. No existen reportes previos que indiquen los patrones de expresión de *ATR* cuando las células se tratan con agentes generadores de enlaces intercatenarios, o con agentes inhibidores de la replicación, aunque se sabe que la respuesta ante los daños generados por los químicos usados es la activación de la proteína ATR (Andreassen, 2004, Cimprich, 2009). Nuestros resultados sugieren indican que es posible que la activación de la proteína pre-existente en las células sea suficiente para activar la vía AF en respuesta al daño generado por MMC, o bien para iniciar la respuesta al daño generado por HU.

Por otra parte hasta el momento no se ha reportado que la falta de la proteína FANC-A interfiera en la expresión o activación de *ATR*.

Al analizar los datos de expresión de *ATM* en la línea celular NI49, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control sin tratamiento, ni entre los diferentes tratamientos. Por otra parte, en las células AF VU817 se observaron diferencias significativas al comparar la expresión de *ATM* del control sin tratamiento con los tratamientos con MMC y MMC+HU; Con el tratamiento con HU sola, no se observó una diferencia significativa. El aumento en los niveles de expresión de *ATM* en células AF en respuesta a MMC, ya ha sido reportado previamente por Yamamoto (2005) y puede deberse a que la deficiencia de la vía AF, genera rupturas de doble cadena durante el proceso de reparación de los enlaces intercatenarios, algunas de las cuales no son reparadas (Sobeck, 2006). Un reporte previo de este efecto fue publicado por Gueven y colaboradores (2006), en el que reportaron que *ATM* aumenta su expresión en respuesta a radiación ionizante, la cual genera rupturas de doble cadena.

De esta manera, el incremento en la expresión de *ATM* por parte de las células AF-A, podría significar que en efecto, cuando la vía FANC/BRCA está afectada, las células AF buscan vías alternas para tratar de solucionar el problema de daño al ADN y una de las vías es la que involucra *ATM* (Kenedy, *et al.*, 2007). De esta manera las células con deficiencia en el gen *FANCA* serían hiperdependientes de esta vía paralela de reparación explicaría la expresión incrementada de *ATM*.

Detección de las diferencias de activación de la proteína ATM en células normales y células AF-A en diferentes fases del ciclo celular y en respuesta a MMC e HU.

En lo que respecta a la variación en el ciclo celular de las células normales con el tratamiento MMC, HU o MC+HU, no se observaron diferencias en el número de células en fase G2 en comparación con las células sin tratamiento. Esto puede deberse a que el daño generado a las células normales por la MMC fue reparado en la mayoría de las células exitosamente, liberándolas del arresto generado, o bien a que las células se han liberado del arresto de G2/M con cierto daño, lo cual se ha reportado que ocurre en líneas humanas inmortalizadas (Deckbar, *et al.*, 2005)

En las células AF tratadas con MMC y con MMC+HU se observa un aumento de células en G2 en relación a las células sin tratamiento. Sin embargo no se observaron cambios en las células tratadas con HU. Se sabe que la MMC provoca en las células AF un arresto en G2 lo cual explicaría el aumento de células en G2 en los tratamientos que contienen MMC. En las células normales no se encontraron diferencias en la fosforilación de ATM entre los diferentes tratamientos y el control, esto puede deberse a que la vía principal de reparación de las lesiones generadas es ATR (Andreassen, *et al.*, 2004; Cimprich, *et al.*, 2009) y al tener completa la vía FANC/BRCA que sigue la reparación de este tipo de daño, no necesita vías alternas, por lo cual la activación de ATM no se ve modificada;

En las células AF se observó un aumento en la fosforilación de ATM en la fase G2 del ciclo celular en respuesta los tratamientos con MMC y MMC+HU. El aumento en la fosforilación de ATM ya se ha reportado (Yamamoto, 2005), de igual manera que el

aumento en su mensajero; es posible que la fosforilación de ATM se deba a la generación de rupturas de doble cadena debidas a la deficiencia en la vía FANC/BRCA.

La cantidad de aberraciones cromosómicas observadas e el tratamiento MMC+HU en células AF es significativamente mayor a la generada por MMC, lo cual nos indica que la HU en G2 estaría alterando algún proceso de reparación en esta fase del ciclo celular. Sin embargo, se observa un aumento similar en la expresión del mensajero de *ATM*, así como en la activación de la proteína ATM, lo cual muestra que las células AF son hiperdependientes de la vía de ATM cuando se dañan con MMC. Un hallazgo importante de nuestro estudio fue que ni la transcripción ni la activación de ATM se vieron inhibidas por la hidroxurea lo cual podría sugerir que no es por esta vía por donde interviene la HU para generar la gran cantidad de daño cromosómico observado, o bien si es la vía de ATM la que está siendo alterada por el tratamiento con HU, la interferencia sería río abajo de esta vía señalización; una proteína candidata a ser inhibida es CHK2, la cual es una cinasa efectora que controla el ciclo celular y continúa la cascada de señalización iniciada por ATM. Al inactivarse CHK2, las células AF serían deficientes al reparar las rupturas de doble hebra generadas, lo cual podría explicar el daño cromosómico observado. Otra de las posibles proteínas involucradas podría ser la PIKK DNA-PK's la cual pertenece a la misma familia que ATM y se le asocia con el proceso de reparación de rupturas de doble hebra por unión de extremos no homólogos (Tomita, 2010).

Finalmente, nuestra hipótesis de que el incremento en el daño al ADN en las células AF provocado por la adición HU en G2 se debía a la disminución de la expresión o activación de ATM no se confirmó, ya que tanto los niveles de expresión del ARN mensajero de *ATM* así como la fosforilación de ATM no se vieron disminuidos con el tratamiento con HU. Estos resultados difieren con lo reportado por Kurose y colaboradores en 2006, quienes indican que la HU disminuye la activación de ATM. Es probable que la diferencia de resultados se deba a que las líneas celulares utilizadas son diferentes, ya que Kurose reporta la inhibición de la fosforilación de ATM únicamente en la línea leucémica HL60. Es probable que en líneas celulares normales así como líneas celulares AF la activación de ATM no se vea influenciada por la acción de HU en G2. El hecho de que se observa que la HU aplicada en G2 en células AF genera una potenciación del daño al ADN, pero no disminuye ni la expresión ni la activación de ATM, abre nuevas posibilidades de estudio para entender la interacción de la HU en las células normales y AF-A, para así contribuir al conocimiento básico de la anemia de Fanconi.

8. CONCLUSIONES

- 1) Las células AF-A tratadas con HU presentan un mayor número de aberraciones cromosómicas que las células normales.
- 2) El tratamiento MMC+HU tiene un efecto potenciador de daño en células AF, mientras que en las células normales el efecto es sumatorio. Esto sugiere que la HU inicia una respuesta de una vía que es HU-sensible y paralela
- 3) En las células AF los tratamientos con MMC aumentaron la expresión del ARN mensajero del gen *ATM*, así como la fosforilación de ATM, lo que indica que en ausencia de una vía normal FANC/BRCA, las células se apoyan en mecanismos paralelos de vigilancia y reparación del ADN
- 4) En las células AF en G2, el tratamiento con HU sola no mostró diferencias en fosforilación en Ser 1981 de ATM, ni se observó una reducción de esta activación de ATM cuando se tratan con MMC+HU, lo cual sugiere que la HU no está interfiriendo con la activación de esta cinasa.
- 5) Los datos obtenidos sugieren que la causa del aumento en el número de aberraciones cromosómicas dado por el tratamiento MMC+HU en la línea celular AF (VU817) no es debido a la inhibición de ATM, pero no descarta que ésta sea la vía afectada, por lo que la interferencia de la HU podría ser río abajo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Andreassen PR., D'Andrea AD. & Taniguchi T., "ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response", (2004), *Genes & Dev.*, **18**:1958-1963.

Abraham RT., "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases", (2001), *Genes & Dev.*, **15**: 2177-2196.

Araújo SJ., Nigg EA., & Wood RD., "Strong Functional Interactions of TFHIIH with XPC and XPG Human DNA Nucleotide Excision Repair, without a Preassembled Repairosome", (2001), *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 2281-2291.

Bogliolo M., Cabré O., Callen E., Castillo V, Creus A., Marcos R., Surrallés J., "The Fanconi anemia genome stability and tumor suppressor network", (2002), *Mutagenesis*, **17**: 529-538.

Bradbury JM. and Jackson SP., "The complex matter of DNA double-strand break detection", (2003), *Biochemical Society Transactions*, **31**: 40-44.

Brosh RM. & BohrVA., "Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases", (2007), *Nucleic Acids Res.*, **35**: 7527-7544.

Brown EJ., Baltimore D., "embryonic lethality disruption leads to chromosomal fragmentation and early ATR", (2000), *Genes & Dev* : 397-402.

Christmann M., Tomicic MT., Roos WP., Kaina B., "Mechanisms of human DNA repair: an update", (2003), *Toxicology*, **193**: 3-34.

Cimprich KA., Cortez D., "ATR: An Essential Regulator of Genome Integrity", (2008), *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **9**: 616–627.

Clarke AA., Gibson FA., Scott J., Myatt N., Rutherford TR., "Fanconi's anemia cell

lines show distinct mechanism of cell death in response to mitomycin C or agonistic anti-Fas antibodies”, (2004), *Haematologica*, **89**:11-20.

Collins NB., Wilson JB., Bush T., Thomashevski A., Roberts KJ., Jones NJ., Kupfer GM., “ATR-dependent phosphorylation of FANCA on serine 1449 after DNA damage is important for pathway function”, (2009), *blood*, **113**: 2181-2190.

de Winter JP., Van der Weel L., de Groot J., Stone S., Waisfisz Q., Arwert F., Scheper RJ., Kruyt FAE., Hoatlin ME., Joenje H., “The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANA, FANCC and FANCG”, (2000), *Human Molecular Genetics*, **9**:2665-2674.

de Winter JP., Joenje H., “The Genetic, Molecular Basis of Fanconi Anemia”, (2009), *Mutat res.*, **668**: 11-19.

Deckbar D., Birraux J., Krempler A., Tchouandong L., Beucher A., “Chromosome breakage after G2 checkpoint release”, (2007), *J Cell Biol.*, **176**: 749–755.

Esmer C., Sánchez S., Ramos S., Molina B., Frías S., Carnevale A., “DEB Test for Fanconi Anemia Detection in Patients With Atypical Phenotypes”, (2004), *Am J Med Genet.*, **124A**:35-39.

Frías S., Gómez L., Molina B., Rojas E., Ostrosky-Wegman P., Carnevale A., “Effect of hydroxyurea and normal plasma on DNA synthesis in lymphocytes from Fanconi anemia patients”, (1996), *Mutat Res.*, **25**:115-121.

García-Higuera I. & Taniguchi T., “Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway”, (2001), *Molecular Cell*, **7**: 249-262.

Gueven N., Fukao T., Luff J., Paterson C., Kay G., Kondo N., Lavin MF., “Regulation of the Atm promoter in vivo”, (2006), *Genes Chromosomes, Cancer*. **45**: 61-71.

Hansson K., Hartley-Asp B., "Potentiation by hydroxyurea in G2-prophase of thiotepa- and bleomycin-induced chromosomal aberrations in Chinese hamster cells", (1981), *Hereditas*, **94**: 21-27.

Harrigan JA., Wilson III DM., Prasad R., Opresko PL., Beck G., May A., Wilson SH., Bohr VA., "The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase β ", (2006), *Nucleic Acids Research*, **34**: 745–754.

Hoeijmakers JH., "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer", (2001), *Nature*, **411**: 366-374.

Hopfner KP., Putnam CD., Tainer JD., "DNA double-strand break repair from head to tail", (2002), *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**: 115–122.

Howlett NG., Taniguchi T., Durkin SG., D'Andrea AD., Glover TW., "The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability", (2005), *Human Molecular Genetics*, **14**: 693-701.

Ibañez A., Rio P., Casado JA., Bueren JA., Fernández-luna JL., Pipaón C., "Elevated levels of IL-1 β in Fanconi Anemia group A patients due to a constitutively active PI3K-AKT pathway are capable of promoting tumor cell proliferation", (2009), *Biochem. J.*, **422**: 161-170.

Ismail IH. & Hendzel MJ., "The γ -H2A.X: Is Just a Surrogate Marker of Double-Strand Breaks or Much More?", (2008), *Environ Mol Mutagen.*, **49**: 73-82.

Jackson SP., "Sensing and repairing DNA double-strand breaks", (2002), *Carcinogenesis*, **23**: 687-696.

Jiang X., Sun Y., Chen S., Roy K., Price BD., "The FATC Domains of PIKK Proteins

Are Functionally Equivalent and Participate in the Tip60-dependent Activation of DNA-PKcs and ATM”, (2006), *J. Biol. Chem.*, **23**:15741-15746.

Joenje H., Lo ten Foe JR., Oostra AB., van Berkel CG., Rooimans MA., Schroeder-Kurth T., Wegner RD., Gille JJ., Buchwald M., Arwert F., “Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype”, (1995), *Blood*, **86**: 2156-2160.

Kennedy RD., Chen CC., Stuckert P., Archila LM., De la Vega MA., Moreau LA, Shimamura A., D’Andrea AD., “Fanconi anemia pathway–deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated“, (2007), *J Clin Invest.*, **117**: 1440-1449.

Kinner A., Wu W., Staudt C., Iliakis G., “ γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin”, (2008), *Nucleic Acids Res.*, **36**: 5678-5694.

Kitao H., Yamamoto K., Matsushita N., Ohzeki M., Ishiai M., Takata M., “Functional Interplay between BRCA2/FancD1 and FancC in DNA Repair”, (2006), *J Biol Chem.*, **28**: 21312-21320.

Kotnis A., Du L., Liu C., Popov SW., Pan-Hammarström Q., “Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end”, (2009), *Phil. Trans. R. Soc. B*, **364**: 653-665.

Kurose A., Tanaka T., Huang X., Traganos F., Dai W., Darzynkiewicz Z., “Effects of Hydroxyurea and Aphidicolin on Phosphorylation of Ataxia Telangiectasia Mutated on Ser 1981 and Histone H2AX on Ser 139 in Relation to Cell Cycle Phase and Induction of Apoptosis”, (2006), *Cytometry*, **69**:212-221.

Lempiainen H. & Halazonetis TD., "Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks", (2009), *EMBO J.*, **28**: 3067:3073.

Martínez A., Hinz M., Gomez L., Molina B., Acuña H., Jones IM., Frías S., Coleman MA., "Differential expression of TP53 associated genes in Fanconi anemia cells after Mitomycin C and Hydroxyurea treatment", (2008), *Mutat Res.*, **656**: 1-7.

Matsuoka S., Rotman G., Ogawa A., Shiloh Y., Tamai K., Elledge SJ., "Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro", (2000), *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 10389-10394.

Matsuoka S., Ballif BA., Smogorzewska A., McDonald ER., Hurov KE., Luo J., Bakalarski CE., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi SP., Elledge SJ., "ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage", (2007), *Science*, **316**: 1160-1166.

McManus KJ. & Hendzel MJ., "ATM-depend DNA Damage-independent Mitotic Phosphorylation of H2AX in Normal Growing Mammalian Cells", (2005), *Mol boil Cell*, **16**: 5013-5025.

Meetei RA., Sechi S., Wallisch M., Yang D., Young MK., Joenje H., Hoatlin ME., Wang W., "A Multiprotein Nuclear Complex Connects Fanconi Anemia and Bloom Syndrome", (2003), *Mol Cell Biol.*, **23**: 3417-3426.

Moldovan GL. & D'Andrea AD., "How the Fanconi Anemia pathway guards the genome", (2009), *Annu Rev Genet.* **43**:223-249.

Molina B., Frias S., "Anemia de Fanconi. Fenotipo Clínico, Celular y Molecular", en "Tópicos de Genética", (2006), Universidad Autónoma del Edo. De México y la Sociedad Mexicana de Genética, México 1a. Edición.

Molina B., Gómez L., Hernández-Jardines A., Ortiz R., Marchetti F., Altamirano-Lozano M., Carnevale A., Frías S., "Hydroxyurea induces chromosomal aberrations in Fanconi anemia cells from complementation groups A, B, C, D1 and E", En proceso.

Moustacchi E., "Fanconi's anemia", (2003), Orphanet Encyclopedia, <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-FA.pdf>

Multani AS. & Chang S., "WRN at telomeres: implications for aging and cancer", (2007), *J Cell Sci.*, **120**: 713-72.

Ohashi A., Zdzienicka MZ., Chen J., Couch FJ., "Fanconi Anemia Complementation Group D" (FANCD2) Functions Independently of BRCA2- and RAD51-associated Homologous Recombination in Response to DNA Damage", (2005), *J Biol Chem.*, **280**: 14877-14883.

Pagano G., "Mitomycin C and Diepoxybutane action mechanisms and FANCC protein functions: further insights into the role for oxidative stress in Fanconi's anemia phenotype", (2000), *Carcinogenesis*, **21**: 1067-1068.

Pang Q., Keeble W., Christianson TA., Faulkner GR., Bagby GC., "FANCC interacts with Hsp 70 to protect hematopoietic cells from INF- γ /TNF- α -mediated cytotoxicity", (2001), *EMBO J.*, **20**:4478-4489.

Pang Q., Christianson TA., Keeble W., Koretsky T., Bagby GC., "The Anti-apoptotic Function of Hsp70 in the Interferon-inducible Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase-mediated Death Signaling Pathway Requires the Fanconi Anemia Protein, FANCC", (2002), *J Biol Chem.*, **51**:49638-49643.

Park WH., Margossian S., Horwitz AA., Simons AM., D'Andrea AD., Parvin JD.,

“Direct DNA Binding Activity of the Fanconi Anemia D2 Protein”, (2005), *J Biol Chem.*, **25**: 23593-53598.

Peiwen F., Jinhu Y., Weidong W., “New Advances in the DA Damage Response Network of Fanconi Anemia and BRCA Proteins”, (2005), *Cell Cycle*, **4**: 80-86.

Pfaffl MW., “A new Mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR”, (2001), *Nucleic Acids Res.*, **29**: 2002-2007.

Pfaffl MW., “Relative quantification” in “Real-Time PCR” Ed. Tevfik DM., (2006) Taylor & Francis Group.

Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G., “Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations”, (2000), *Mutagenesis*, **15**: 289-302.

Pichierri P. & Rosselli F., “Fanconi Anemia Proteins and the S Phase Checkpoint”, (2004), *Cell Cycle*, **3**: 698-700.

Qiao F., Moss A., Kupfer GM., “Fanconi Anemia Proteins Localize to Chromatin and the Nuclear Matrix in a DNA Damage- and Cell Cycle-regulated Manner”, (2001), *J Biol Chem.*, **276**: 23391–23396.

Ridet A., Guillouf C., Duchaud E., Cundari E., Fiore M., Moustacchi E., Rosselli F., “Deregulated Apoptosis Is a Hallmark of the Fanconi Anemia Syndrome”, (1997), *Cancer Res.*, **57**: 1722-1730.

Shieh SY., Ahn J., Tamai K., Taya Y., Prives C., “The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites”, (2000) , *Genes & Dev.*, **14**: 289-300.

Shiloh Y., “ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA

damage response and cellular homeostasis”, (2001), *Biochem Soc Trans.*, **29**: 661-666.

Sidorova JM., Li N., Folch A., Monnat Jr RJ., “The RecQ helicase WRN is required for normal replication fork progression after DNA damage or replication fork arrest”, (2008), *Cell Cycle*, **7**:796-807.

Smogorzewska A., Matsuoka S., Vinciguerra P., McDonald ER., Hurov KE., Luo J., Ballif BA., Gygi SP., Hofmann K., D’Andrea AD., “Identification of the FANCI Protein, a Monoubiquitinated FANCD2 Paralog Required for DNA Repair”, (2007), *Cell*, **129**: 289-301.

Sobeck A., Stone S., Costanzo V., de Graaf B., Reuter T., de Winter J., Wallisch M., Akkari Y., Olson S., Wang W., Joenje H., Christian JL., Lupardus PJ., Cimprich KA., Gautier J., Hoatlin ME., “Fanconi Anemia Proteins are Required to Prevent Accumulation of Replication-Associated DNA Double-Strand Breaks”, (2006), *Mol Cell Biol.*, **26**: 425-437.

Sobeck A., Stone S., Landais I., de Graaf B., Hoatlin ME., “The fanconi anemia protein FANCM is controlled by FANCD2 and the ATR/ATM pathways”, (2009), *J Biol Chem.*, **284**: 25560-25568.

Sy SMH., Huen MSY., Chen J., “PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair”, (2009), *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**: 7155-7160.

Tauchi H., Matsuura S., Kobayashi J., Sakamoto S., Komatsu K., “Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability”, (2002), *Oncogene*, **21**:8967-8980.

Thoms KM., Kuschal C., Emmert S., “Lessons learned from DNA repair defective syndromes”, (2007), *Exp. Dermatol.*, **16**: 532–544.

Tikoo S. & Sengupta S., “Time to bloom”, (2010), *Genome Integr.*, **1**:14.

Tomita M., “Involvement of DNA-PK and ATM in Radiation- and Heat-induced DNA Damage Recognition and Apoptotic Cell Death”, (2010). *J Radiat Res.*, **51**: 493-501.

Van Gent DC., Hoeijmakers JHJ., Kanaar., “Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection”, (2001), *Nat Rev Genet.*, **2**: 196-206.

van Vugt MATM., Gardino AK., Linding R., Ostheimer GJ., Reinhardt HC., “A Mitotic Phosphorylation Feedback Network Connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to Inactivate the G₂/M DNA Damage Checkpoint”, (2010) , *PLoS Biol* 8(1): e1000287.
doi:10.1371/journal.pbio.1000287.

Varon R., Vissinga C., Platzer M., Cerosaletti KM., Chrzanowska KH., Saar K., Beckmann G., Seemanova E., Cooper PR., Nowak NJ., Stumm M., Weemaes CMR., Gatti RA., Wilson RK., Digweed M., Rosenthal A., Sperling K., Concannon P., Reis A., “Nibrin, a Novel DNA Double-Strand Break Repair Protein, Is Mutated in Nijmegen Breakage Syndrome”. (1998), *Cell*, **93**:467-476.

Wegner RD., Gille JJ., Buchwald M., Arwert F., “Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype”,1995, *blood*, Vol. 86, pp 2156-2160
Wood RD., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T., “Human DNA Repair Genes”, (2001), *Science*, **291**: 1284-289.

Wood RD., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T., “Human DNA Repair Genes”, (2001), *Science*, **291**: 1284-1289.

Xia B., Sheng Q., Nakanishi K., Ohashi A., Wu J., Christ N., Liu X., Jasin M., Couch FJ., Livingston DM., “Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2”, (2006), *Mol Cell*, **22**: 719-729.

Xie J., Litman R., Wang S., Peng W., Guillemette S., Rooney T., Cantor SB., “Targeting the FANCD1-BRCA1 interaction promotes a switch from recombination to pol η -dependent bypass”, (2010), *Oncogene*, **29**: 2499-2508.

Yamamoto K., Nihirane A., Aglipay J., Sironi J., Arkin S., Lipton JM., Ouchi T., Liu JM., “Upregulated *ATM* Gene Expression and Activated DNA Crosslink-Induced Damage Response Checkpoint in Fanconi Anemia: Implications for Carcinogenesis”, (2008), *Mol Med.*, **14**: 167-174.

Yang J., Yu Y., Hamrick HE., Duerksen-Hughes PJ., “ATM,ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses”, (2003), *Carcinogenesis*, **24**:1571-1580.

Young DB., Jonnalagadda J., Gatei M., Jans DA., Meyn S., Khanna KK., “Identification of Domains of Ataxia-telangiectasia Mutated Required for Nuclear Localization and Chromatin Association”, (2005), *J. Biol. Chem.*, **280**: 27587-27594.

Zang F., Ma J., Wu J., Ye L., Cai., Xia B., Yu X., ““PALB” Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response”, (2009), *Current Biology*, **19**: 524-529.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 14 de diciembre de 2010, en la ciudad de México D. F. para optar al grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Biol. David Arturo Sosa Sánchez.

Dra. Sara Frías Vázquez

Dr. Mario César López Camarillo

Dra. Mavil López Csamichana

Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

M en C. Bertha Molina Álvarez

Dr. Mauricio Castañón Arreola.
