

112



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DEL EFECTO DE LA HIDROXIUREA EN LINFOBLASTOS DE ANEMIA DE FANCONI TRATADOS CON CATALASA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA PRESENTA: LORENZA LEGARRETA MONROY



DIRECTOR DE TESIS: BIOLOGA LAURA GOMEZ DAGUNA

2001

299335



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Determinación del efecto de la hidroxiiurea en linfoblastos de anemia
 de Fanconi tratados con catalasa."

realizado por Lorenza Legarreta Monroy

con número de cuenta 9550370-5 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Biol. Laura Gómez Laguna
 Propietario

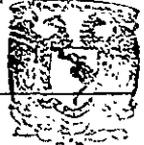
Propietario Dra. Sara Frías Vázquez

Propietario M. en C. Bertha Molina Alvarez

Suplente M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

Suplente Biol. Silvia Rosalía Sánchez Sandoval

FACULTAD DE CIENCIAS
 UNAM
 Consejo Departamental de Biología



Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGIA

A mis papás, por enseñarme que conocer y
aprender es lo más bonito de la vida
y porque gracias a ellos,
me hago mejor persona cada día

A mis abuelos, por las mejores tardes,
un buen cognac y por llenarme el alma.

Agradecimientos

Esta tesis no pudo haber sucedido sin el apoyo y la ayuda de muchísima gente, así que **gracias**:

A la UNAM, a la Facultad de Ciencias por su sabiduría.

A mis papás por su desesperación e infinita paciencia... ¡por fin!

A Luis y Sofía por compartir la vida conmigo (¡ni modo!).

A Lau, mi asesora, por tantas horas de discusión.

A mis sinodales, Bertha, Sara, Silvia y Lupita por sus sugerencias que tanto enriquecieron este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio Sandra, Bertha, Luz, Lupita, Chivis, Lau, Sara, Celia y Carlos por tantas risas.

A Adelaida Sarukhán por inspirarme para estudiar esta maravillosa disciplina.

A Roa, Rendón Carmen y Ceci por recordarme de qué estoy hecha y a dónde voy.

A Daniel por llevarme al límite de mis sueños.

A las florecitas: Isabel, Liliana, Tathali y Bárbara porque pudimos de puntillas tocar el universo.

A las otras florecitas Bris, Paloma, Maris.

A los abejorros Juan, Gabo, Luis, Enrico, Javier, Carlos, Omar, Tuchick y Santiago por darle significado al pastito.

A la Nena por la popularidad; a María Isabel y Gonzalo por el techo.

A Mariana Gutiérrez y al Gorrón.

Al Güero.

A mis primos y tíos por echarme tantas porras para que esto sucediera.

A mi tía Pilla por quererme tanto.

A mi tío Gayou, a Camacho, a mi tío Guillermo, por supuesto.

A Tomasita por consentirme todos estos años.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	2
I. Características clínicas de la anemia de Fanconi	2
II. Características citogenéticas de la anemia de Fanconi.	5
A. Inestabilidad cromosómica.	5
B. Heterogeneidad genética.	8
III. Características moleculares de la anemia de Fanconi.	10
IV. Hipótesis del defecto básico en anemia de Fanconi.	13
A. Reparación del DNA.	13
B. Sensibilidad al oxígeno.	15
C. Defectos en el ciclo celular y apoptosis.	16
D. Factores de crecimiento.	18
V. Ribonucleótido reductasa, hidroxiaurea y catalasa.	19
A. Ribonucleótido reductasa.	19
B. Hidroxiaurea.	19
C. Catalasa.	21
VI. Justificación.	22
VII. Objetivo.	24
VIII. Hipótesis.	24
Metodología	25
I. Prueba preliminar para determinar actividad de la catalasa	25
II. Población de estudio.	27
III. Cultivos celulares.	27
IV. Cosecha.	28
V. Elaboración de preparaciones.	29
VI. Análisis.	29

ÍNDICE

	Página
Resultados	31
I. Ensayo cometa	
II. Aberraciones cromosómicas	33
A. Frecuencia de aberraciones cromosómicas	33
B. Distribución de aberraciones cromosómicas	37
Discusión y conclusiones	39
I. Tratamientos independientes	39
II. Tratamientos combinados	41
Conclusiones	45
Abreviaturas	46
Bibliografía	47

RESUMEN

La anemia de Fanconi (AF) es un síndrome de inestabilidad cromosómica con hipersensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales como la mitomicina C (MMC). Presenta heterogeneidad genética y hasta el momento se han encontrado siete grupos de complementación (AF-A a AF-G), sin embargo el defecto básico del padecimiento aún no se conoce. Se sabe que al adicionar hidroxiiurea a cultivos AF en fase G_2 , se potencia la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC en el grupo de complementación AF-A y AF-B. La hidroxiiurea tiene dos actividades que podrían dar lugar a la potenciación de aberraciones cromosómicas: a) inhibición de síntesis de desoxirribonucleótidos en fase G_2 ; y b) generación de radicales libres mediante la formación de H_2O_2 . Por lo anterior, el objetivo fue determinar si el aumento de aberraciones cromosómicas producidas por la HU en la fase G_2 , en linfoblastos de anemia de Fanconi A y B se debe a la generación de radicales libres. Se utilizó a la catalasa (CAT) cuya función es detoxificar a la célula eliminando el H_2O_2 . Por lo tanto, si la HU induce potenciación de aberraciones cromosómicas por vía de generación de radicales libres, entonces la aplicación de CAT a cultivos tratados con MMC e HU disminuirá significativamente el número de aberraciones cromosómicas. Se realizaron cultivos con las líneas linfoblastoides AF-A (HSC72), AF-B (HSC230) y normal (NL-6846). Para cada línea se hicieron ocho cultivos: cuatro de ellos sin exposición a MMC y cuatro expuestos a 10 ng/ml de MMC por 24h. Todos los cultivos se lavaron dos veces con solución salina Hank's y se reincubaron por 24 hrs más para ser cosechados a las 48 hrs. Tres hrs antes de la cosecha se agregó HU+CAT para asegurar que los tratamientos fueran aplicados durante fase G_2 del ciclo celular. El experimento se realizó por triplicado y se analizó, en laminillas codificadas, el número y tipo de aberraciones cromosómicas en 50 metafases por tratamiento y por repetición. Los resultados corroboraron que la HU produce una potenciación del daño en las líneas AF-A y AF-B tratadas con MMC diferente a lo observado para células normales. La CAT produce una disminución no significativa en la frecuencia de AC en cultivos tratados con MMC y post-tratamiento con HU. Estos resultados sugieren que la potenciación del daño en presencia de MMC e HU en células AF no se debe a la generación de radicales libres, por lo que queda la posibilidad de estar relacionada con una deficiencia de dNTPs que produce la HU en fase G_2 donde se requieren para la reparación post-replicativa de DNA.

INTRODUCCIÓN

I. Características clínicas de la anemia de Fanconi:

En 1927 el Dr. Guido Fanconi describió el caso familiar de un padecimiento ahora conocido como anemia de Fanconi (AF). Esta enfermedad es hereditaria, autosómica recesiva y los pacientes presentan manifestaciones hematológicas. La alteración hematológica más común es una falla de la médula ósea roja que lleva al desarrollo de pancitopenia, es decir, una disminución en el número de todas las células sanguíneas. Esta condición se conoce como anemia aplásica y tiene un riesgo de presentarse en AF hasta del 98% (Alter, 1999). Existe una gran variabilidad en las manifestaciones clínicas de estos pacientes tanto intra como interfamiliar; alrededor de un 30% desarrollan anemia tardíamente y carecen de otras alteraciones clínicas, mientras que otros pacientes presentan anomalías congénitas severas (Auerbach *et al*, 1997a; Kupfer *et al*, 1997b; Alter, 1999). Entre las más comunes se encuentran: retraso en el crecimiento, hiperpigmentación en la piel, manchas café con leche ó áreas hipopigmentadas, microcefalia, microftalmia, anomalías esqueléticas principalmente en radio y/o pulgar, alteraciones genitales y renales (Tabla 1). En algunos casos estos pacientes presentan retraso mental. Todos tienen una alta predisposición a desarrollar neoplasias, ya sea hematológicas (leucemia mielocítica aguda generalmente) o carcinomas (orofaríngeos, gastrointestinales y ginecológicos principalmente) (Auerbach *et al*, 1997a; Alter, 1999).

La sobrevida de estos pacientes se ha incrementado con el tiempo en otros países, sin embargo en un estudio realizado en

México en 1999, se encontró una edad media de sobrevivencia de 12.44 ± 6.4 años (Esmer *et al*, 1999). Las mujeres con AF tienen fertilidad reducida aunque no ausente y los hombres presentan gónadas poco desarrolladas y espermatogénesis anormal por lo que la infertilidad es un problema más común en los varones (Alter, 1999).

Aunque la enfermedad es rara presentando una frecuencia de homocigotos de 1 en 360 000, se encuentra representada en todos los grupos étnicos y se ha reportado que 1 individuo en 300 es heterocigoto sano aunque actualmente se estima que hasta 0.5% de la población general es heterocigota para algún gen de AF (Auerbach *et al*, 1997a).

**Tabla 1. Anormalidades fenotípicas
en 955 pacientes con AF.**

Anormalidad	% de pacientes
Piel	60
Talla baja	57
Extremidades superiores	48
Hipogonadismo masculino	37
Hipogonadismo femenino	3
Cabeza	20
Oculares	26
Renales	23
Peso al nacer menor o igual a 2500g	12
Retraso en el desarrollo	13
Extremidades inferiores	8
Pabellón auricular	10
Reflejos incrementados	7
Otras anormalidades esqueléticas	6
Cardiopulmonares	6
Gastrointestinales	4
Otras anormalidades	5
Sin anormalidades	20
Talla baja únicamente	1
Piel únicamente	3
Talla baja y piel únicamente	4
Talla baja y/o piel	8

Tomada de Alter B, 1999.

II. Características citogenéticas de la anemia de Fanconi:

A. Inestabilidad cromosómica:

La AF está clasificada dentro de un grupo de síndromes denominados de inestabilidad cromosómica. Algunas de estas enfermedades son ataxia telangiectasia, xeroderma pigmentosa, síndrome de Cockayne y síndrome de Bloom. Los individuos con estos padecimientos tienen células con una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) espontáneas, presentan hipersensibilidad a mutágenos específicos y una elevada predisposición a desarrollar cáncer (Kupfer y D'Andrea, 1996).

En 1964 Schroeder y colaboradores descubrieron que los linfocitos de AF presentaban un elevado número de rupturas cromosómicas espontáneas. Más tarde, en 1973 Sasaki y Tonomura reportaron una alta sensibilidad de los linfocitos de AF a la mitomicina C (MMC) y mostaza nitrogenada. En la actualidad, está establecido que las células de AF presentan hipersensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales como la MMC, el diepoxibutano, el cis-platino y la mostaza nitrogenada. La MMC ha sido utilizada ampliamente para establecer el diagnóstico de la AF dada la hipersensibilidad de éstas células al clastógeno. Esta sustancia que fue aislada de la levadura *Streptomyces caespitosus* en forma de cristales azul-violeta, tiene un peso molecular de 334 daltones y es soluble en agua y solventes orgánicos (Gutiérrez L, 1979). Ha sido utilizada como antibiótico y agente antitumoral dado que inhibe la división celular tanto de bacterias como de células cancerosas (Lown J, 1979). La MMC (figura 1) es un agente alquilante bifuncional; cuando entra a la

célula, esta sustancia es activada por enzimas y se transforma dando lugar a metabolitos alquilantes altamente reactivos (Doroshov, 1992) que tienen la capacidad de formar uniones covalentes cruzadas y aductos en residuos de guanidinas dispuestas adyacentemente en el DNA. Esto lleva a la formación de enlaces cruzados tanto intra como intercadena que son los causantes de las aberraciones cromosómicas (figura 2) (Remers A, 1979; Kupfer *et al*, 1997b). Cuando se comparan con células de un individuo normal, las células de pacientes con AF pueden presentar hasta 30 veces más AC cuando el daño es inducido con MMC aunque hay una gran variabilidad en la respuesta a este agente (Frías *et al*, 1991).

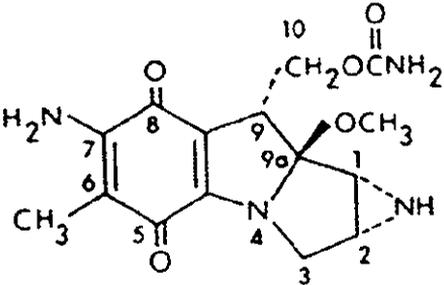


Figura 1. Estructura de la MMC.

El tipo de daño que se presenta en el DNA de pacientes con AF, tanto espontáneo como en presencia de agentes alquilantes, es primordialmente de tipo cromatídico y figuras de intercambio (figura 2). También se ha evaluado la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (SCE) en estas células y los resultados

demuestran que no hay diferencias en la frecuencia espontánea de SCE entre individuos AF e individuos normales, sin embargo, hay un aumento significativo en la frecuencia de SCE incluso con bajas concentraciones de MMC que demuestra la sensibilidad de estas células a este mutágeno (Novotná *et al*, 1979; Kano y Fujiwara, 1981). Por otro lado se ha observado una mayor frecuencia de endorreduplicación que en individuos normales (Norderson, 1977; Kubbies *et al*, 1985).

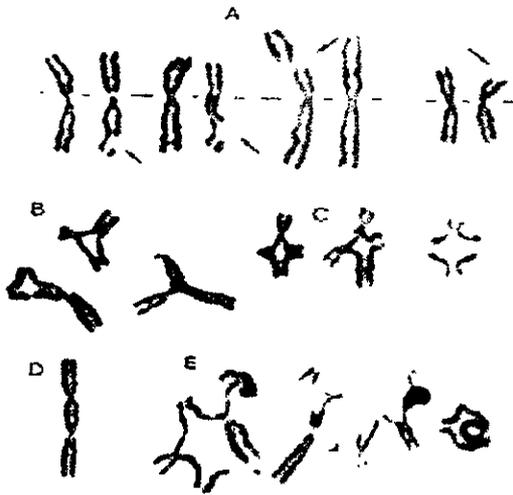


Figura 2. Aberraciones cromosómicas más comunes en anemia de Fanconi. A. rupturas cromatídicas, B. trirradios, C. tetradiradios, D. dicéntrico, E. otras.

B. Heterogeneidad genética:

Grupos de complementación:

En 1980 Zakrzewski y Sperling realizaron el primer estudio de hibridación celular con fibroblastos de dos pacientes con AF y encontraron complementación del fenotipo celular, por lo que se comprobó la existencia de heterogeneidad genética en esta enfermedad. Posteriormente, en 1985 Duckworth-Rysiecki *et al* llevaron a cabo experimentos de fusión celular con linfoblastos de seis pacientes no emparentados con diagnóstico de AF. El resultado de estos ensayos fueron células híbridas; tres de estas líneas celulares híbridas continuaron presentando la hipersensibilidad característica a agentes alquilantes bifuncionales y fueron asignadas a un grupo de complementación designado como AF-A, que se definió por la identidad funcional que tenía con la línea linfoblastoide de referencia HSC72. Las otras tres hibridaciones mostraron sensibilidad normal a estos agentes y fueron clasificadas como no-A ó AF-B dado que presentaron complementación funcional.

Posteriores experimentos de hibridación celular entre líneas de referencia y líneas de otros pacientes con AF (figura 3) mostraron que existen al menos ocho grupos de complementación denominados AF-A, AF-B, AF-C, AF-D1, AF-D2, AF-E, AF-F y AF-G (Joenje y Arwert, 2001). Los porcentajes de pacientes pertenecientes a cada grupo se muestran en la figura 4 (Faivre *et al*, 2000). Cada uno de estos grupos presenta mutaciones en genes distintos, se han clonado seis de los ocho genes responsables de la enfermedad y se encuentran en distintas localizaciones cromosómicas; y las mutaciones en estos genes tienen como

consecuencia un resultado fenotípico muy similar. A este fenómeno se le conoce con el nombre de heterogeneidad genética.

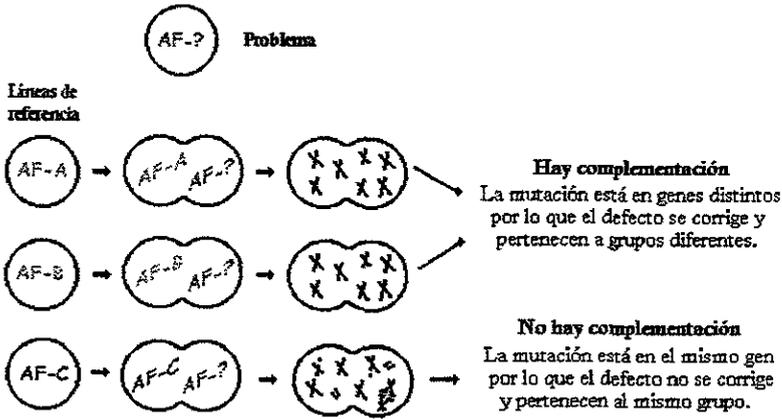


Figura 3. Representación esquemática de los experimentos de hibridación celular. Las células del individuo problema se fusionan con líneas de referencia de grupos de complementación ya identificados.

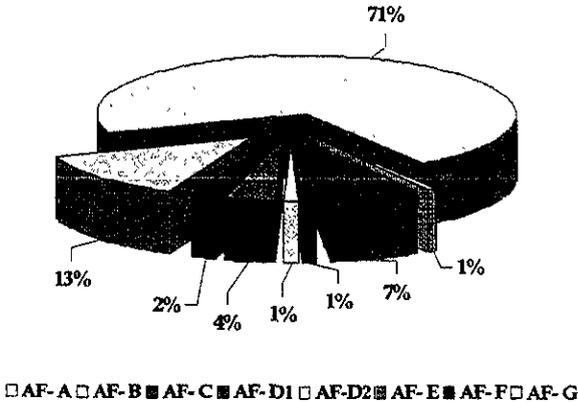


Figura 4. Porcentaje de pacientes pertenecientes a cada grupo de complementación. (Joenje y Patel, 2001).

III. Características moleculares:

De los ocho grupos de complementación que se conocen hasta el momento, se han clonado seis genes. El primero, *FANCA* pertenece al grupo AF-A y se localiza en el cromosoma 16q24.3 (Lo Ten Foe *et al*, 1996). El gen *FANCC* pertenece al grupo de complementación AF-C y se encuentra en el cromosoma 9q22.3 (Strathdee *et al*, 1992). *FANCD2* perteneciente al grupo AF-D2 está ubicado en el cromosoma 3p25.3 (Joenje y Arwert, 2001); el gen *FANCE* del grupo AF-E se localiza en el cromosoma 6p21.2-21.3 (Waisfisz *et al*, 1999b, De Winter *et al*, 2000b). *FANCF* está en 11p15 (De Winter *et al*, 2000a). Por último, el gen *FANCG* del grupo AF-G, se encuentra en el cromosoma 9p13 (De Winter *et al*, 1998).

FANCA fue clonado en 1996 y es un gen que comprende 4.3 kilobases, (Lo Ten Foe *et al*, 1996) está distribuido en un total de 43 exones y codifica para una proteína de 1455 aminoácidos (Wikjer *et al*, 1999). No tiene homología con ninguna proteína conocida y su función se ignora (Lo Ten Foe *et al*, 1996), sin embargo se han encontrado secuencias identificadas como señales de localización nuclear, es decir, ciertos aminoácidos presentes en el polipéptido le confieren la característica de translocar hacia el núcleo de la célula (Kupfer *et al*, 1997b). El primer gen que se logró aislar fue *FANCC* en 1992; consta de 14 exones y codifica para una proteína de 558 aminoácidos que se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (Strathdee *et al*, 1992, García-Higuera, 1999). El gen *FANCD2* clonado este año consta de 44 exones y el marco de lectura abierto predice una proteína nuclear de 1451 aminoácidos. Al igual que las otras proteínas de AF, no presenta dominios

conocidos y la función de la proteína permanece desconocida pero a diferencia de éstas FANCD2 sí está conservada en organismos como *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, (Timmers *et al*, 2001). *FANCE* tiene 1611 nucleótidos distribuidos en 10 exones que comprenden aproximadamente 15 kb y que codifican para una proteína de 536 aminoácidos que contiene dos señales de localización nuclear, pero carece de homología con otras proteínas conocidas (De Winter *et al*, 2000b). El gen *FANCF* codifica para una proteína de 374 aminoácidos y presenta homología con una proteína procarionte de unión a RNA, llamada ROM (De Winter *et al*, 2000a). Finalmente, el gen *FANCG* es idéntico a XRCC9 un gen que se cree, juega un papel en la reparación post-replicativa o está involucrado en puntos de restricción del ciclo celular (De Winter *et al*, 1998).

El análisis de mutaciones para los genes clonados ha revelado que *FANCA* es un gen altamente heterogéneo. Han sido encontradas decenas de mutaciones a lo largo de éste y se cree que muchas de ellas son polimorfismos. Se supone que la mayoría de las mutaciones asociadas con la enfermedad dan como resultado una proteína truncaada aunque no se conoce el significado fenotípico de todas. Hay una gran cantidad de deleciones intersticiales dentro de *FANCA* que resultan en la ausencia de uno a treinta exones del gen. También se han encontrado microdeleciones e inserciones que generalmente ocurren dentro de secuencias repetitivas codificantes en el DNA (Wikjer *et al*, 1999).

Por otro lado, se han descrito mutaciones de varios tipos (deleciones y sustituciones principalmente) en el gen *FANCC*. Dos de estos cambios son de especial importancia pues representan a más del 90% de los pacientes pertenecientes al grupo de

complementación AF-C; una en el exón 1 y otra en el exón 4. La mutación presente en el exón 1 es una delección de una guanina en la posición 322 (delG322) y produce un fenotipo leve de la enfermedad, mientras que la mutación del exón 4 es una sustitución de adenina por timina (IVS4+4 A>T) y resulta en un cuadro clínico severo asociado con la aparición temprana de anomalías hematológicas y baja sobrevivencia (Yamashita *et al*, 1996). Esta mutación ha sido encontrada únicamente en judíos Ashkenazi y descendientes de esta población en donde hay una frecuencia de heterocigotos de hasta el 1% (Auerbach, 1997b).

El gen *FANCD2* presenta varias mutaciones; una de ellas llama la atención dado que es un cambio de adenina a guanina en el nucleótido 376 que ocasiona sustitución de un aminoácido (S126G) y modifica el splicing ocasionando una inserción de 13 pb del intrón 5 en el RNA mensajero que genera un corrimiento del marco de lectura y da como resultado una proteína severamente truncada. Las demás mutaciones son delecciones, cambios sin sentido y de sentido erróneo que ocasionan ausencia de la proteína. Las mutaciones descritas en *FANCE* son sustituciones sin sentido que causan un producto protéico truncado. En *FANCF* se han descrito delecciones y sustituciones y todas resultan en ausencia de proteína. Dado el bajo número de pacientes pertenecientes a este grupo de complementación, no se ha podido establecer la correlación fenotípica de estas mutaciones (Faivre *et al*, 2000). Finalmente, el gen *FANCG* presenta varias mutaciones, algunas son delecciones mientras que otras son sustituciones y la mayoría se relacionan con un cuadro clínico severo de la enfermedad, aunque hay un pequeño grupo de mutaciones de sentido erróneo que presentan un fenotipo no severo (Auerbach *et al*, 1999).

Si bien no se sabe la función de ninguno de los productos génicos, hay algunas cuestiones conocidas. Kupfer *et al* en 1997a, Waisfisz *et al* en 1999a y García-Higuera *et al* en 1999 comprobaron, utilizando distintas metodologías, que las proteínas FANCA Y FANCG interaccionan directamente y FANCC de forma indirecta formando un complejo en el citoplasma que después transloca al núcleo de la célula. Una vez en el núcleo, FANCE y FANCF interactúan con el complejo mencionado, particularmente, FANCE interacciona con FANCC; y FANCF con FANCG (Medhurst *et al*, 2001; Joenje y Patel, 2001). Estos estudios demuestran que las proteínas encontradas de AF forman un complejo que activa a la proteína FANCD2 (Timmers *et al*, 2001; García-Higuera *et al* 2001). Al parecer, la forma activa de este polipéptido interactúa con la proteína BRCA1 pues coinmunoprecipitan y ambas se encuentran acumuladas en foci nucleares. La proteína BRCA1 es una proteína de susceptibilidad genética a cáncer de mama y funciona como agente de respuesta a daño de DNA (García-Higuera *et al*, 2001).

IV. Hipótesis del defecto básico en anemia de Fanconi

Pese a que no se conoce la función que desempeñan estas proteínas en la célula, se han propuesto varias explicaciones basadas en observaciones del fenotipo celular en AF:

A. Reparación del DNA

El hecho de que las células AF presentan AC espontáneas elevadas aunado al descubrimiento de que otros síndromes de inestabilidad cromosómica como xeroderma pigmentosa y

síndrome de Cockayne son causados por mutaciones en genes responsables de la reparación del DNA, han llevado a pensar que el defecto básico de la AF está dado por una deficiencia en la reparación. Ya desde 1973, Sasaki y Tonomura sugirieron que el aumento de AC que encontraron en células de pacientes con AF podía deberse a un defecto en el mecanismo de reparación de enlaces cruzados producidos por agentes alquilantes del DNA. Varios grupos de investigación a finales de los 70's y principios de los 80's realizaron ensayos para evaluar la reparación en células de AF. Los resultados de algunos investigadores apoyan la idea de un defecto en la reparación de enlaces cruzados (Kano y Fujiwara, 1981; Fujiwara, 1982), sin embargo otros investigadores no han encontrado evidencias que indiquen un defecto en la reparación en células de AF (Fornace *et al*, 1979). Estos experimentos fueron realizados con pacientes sin clasificar y con un número limitado de individuos y esta pudiera ser la razón por la que los resultados obtenidos a este respecto sean heterogéneos y controversiales.

Importantemente, las aberraciones encontradas en las células AF son en su mayoría, de tipo cromatídico (Sasaki y Tonomura, 1973) y éstas células presentan una prolongación de la fase G₂ del ciclo celular (Dutrillaux *et al*, 1982). Estas dos características han llevado a pensar que el defecto en la reparación es a nivel post-replicativo.

Finalmente, el reciente descubrimiento que el complejo de proteínas AF activa a FANCD2 y ésta a su vez se asocia con BRCA1 (García-Higuera *et al*, 2001), hace pensar cada vez más que el defecto básico de esta enfermedad está relacionado con la vigilancia de la integridad genómica y reparación de DNA. BRCA1 es parte de un complejo de vigilancia de integridad

genómica que está compuesto por proteínas con funciones que van desde supresores de tumor hasta proteínas de reparación de DNA (Wang *et al*, 2000).

B. Sensibilidad al oxígeno

Los niveles altos de oxígeno, afectan el tránsito de la fase G₂ en células normales, es decir, la toxicidad por oxígeno en células normales, es muy similar al comportamiento del ciclo celular en AF en cuanto al tránsito de la fase G₂ (Balin *et al*, 1978). Esta característica llevó al estudio del efecto del oxígeno en células AF, y en 1981, Joenje *et al* reportaron que el número de AC se ve aumentado en linfocitos AF expuestos a altas concentraciones de O₂ de una manera dosis-dependiente. También, Schindler y Hoehn en 1988, encontraron que el crecimiento de fibroblastos AF en presencia de altas concentraciones de oxígeno se ve inhibido y causa la acumulación de células en la fase S y G₂ /M del ciclo celular. En algunos estudios se ha encontrado una disminución de entre el 20 y 40% de superóxido dismutasa (enzima encargada de la detoxificación de especies reactivas de O₂) en eritrocitos de AF (Joenje *et al*, 1978), sin embargo estos resultados no son consistentes para todos los tipos celulares pues en leucocitos y fibroblastos los niveles de esta enzima son cercanos o iguales a los valores normales (Abeliovich y Cohen, 1978; Yoshimitsu *et al*, 1984). Otra cuestión importante es que muchos de los agentes alquilantes del DNA producen especies reactivas de oxígeno, por lo que se ha postulado que un posible defecto que explicaría la sensibilidad de AF a estos agentes sería la incapacidad para

procesar adecuadamente estos radicales libres (Buchwald y Moustacchi, 1998).

A pesar de estas evidencias, la sensibilidad al oxígeno se considera como un efecto secundario al defecto básico y no como la base del padecimiento pues no se ha encontrado mutaciones en las enzimas que se encargan de proteger a la célula contra el estrés oxidativo. Además, en 1993 Saito *et al* observaron que en presencia de altas concentraciones de oxígeno, no había inhibición de crecimiento en fibroblastos AF transformados con el virus SV40, mientras que en presencia de MMC sí se observó inhibición de crecimiento, lo que pone en evidencia que la sensibilidad a MMC es una característica intrínseca de las células mientras que la sensibilidad al oxígeno podría ser una consecuencia secundaria.

C. Defectos en el ciclo celular y apoptosis

Una de las características más importantes de las células AF es que presentan alteraciones en el ciclo celular, en particular en la fase G₂/M. Uno de los primeros estudios que evidenciaron este fenómeno fue el de Dutrillaux *et al* en 1982 en el que se encontró que mientras el número de mitosis en células normales aumentaba en el segundo ciclo de división, en células de AF sin tratamiento el número de mitosis decrecía continuamente. También se ha observado que el porcentaje de células de AF en G₂ es el doble cuando se compara con controles normales (30% vs 14%) (Seyschab *et al*, 1993). Por otro lado, se sabe que el porcentaje de células tratadas con mostaza nitrogenada que permanecen arrestadas en G₂ es mayor en las células AF que en los controles normales (Berger *et al*, 1993). Todos estos experimentos

confirmaron un hecho ahora bien conocido: las células de AF se detienen en la fase G₂/M del ciclo celular especialmente después de ser tratadas con algún mutágeno (Buchwald y Moustacchi, 1998; Kupfer *et al*, 1997b). Esta característica de las células de la AF incluso ha sido utilizada como método diagnóstico para la enfermedad, lo que hace evidente que el defecto en el ciclo celular es una característica tan intrínseca de éstas células como la sensibilidad a agentes alquilantes (Seyschab *et al*, 1995). Al parecer, la prolongación de la fase G₂ en células AF no se debe a un defecto en el punto de restricción que controla el tránsito de la fase G₂ a M dado que éste se ha estudiado en las líneas celulares AF-A, AF-C y AF-D y se encuentra normal (Heinrich *et al*, 1998).

Otro fenómeno del ciclo de vida de la célula que parece estar alterado en la AF es la apoptosis. En un estudio se encontró que aunque no hay diferencias en la apoptosis espontánea de células de AF comparadas con controles normales, los linfoblastos de los grupos AF-A, AF-B, AF-C y AF-D1 tratados con MMC presentan un mayor nivel de apoptosis y este comportamiento es dosis-dependiente. Cuando se introdujo el cDNA de *FANCC* a células pertenecientes al grupo AF-C, se vio una disminución en el nivel de apoptosis y en el porcentaje de células en G₂ (Kruyt *et al*, 1996). En contraste, en otros dos estudios se reportaron los resultados contrarios: los linfoblastos de los grupos AF-A a AF-D tienen altos niveles de apoptosis espontánea y no se observó ninguna diferencia con tratamiento de MMC y en este caso las células mueren por necrosis, no por apoptosis (Rosselli *et al*, 1995 y Ridet *et al*, 1997). En otro estudio, Marathi *et al* observaron en 1996 que cuando se introduce el cDNA a las células AF-C, éstas

corrigen el fenotipo en cuanto a la hipersensibilidad a MMC, apoptosis espontánea y respuesta en el ciclo celular.

Aunque los resultados encontrados hasta el momento son controversiales, está establecido que hay alteraciones en la apoptosis en AF. Las causas de estas desviaciones aún no son claras y pudieran ser intrínsecas o extrínsecas a la célula pero es necesario hacer más estudios acerca de este fenómeno para entender qué lo origina (Kruyt *et al*, 1996; Kupfer *et al*, 1997b; Buchwald y Moustacchi, 1998).

D. Factores de crecimiento

Se han encontrado anomalías en algunos factores de crecimiento en AF y se ha postulado que las alteraciones en estos pueden estar modulando la inestabilidad cromosómica y/o la sensibilidad a agentes alquilantes, sin embargo, el mecanismo preciso por el que pudieran hacerlo no se conoce. (Buchwald y Moustacchi, 1998).

Algunos autores han visto que hay una baja producción de algunos factores de crecimiento. En un estudio de 1992, Rosselli y colaboradores encontraron que los linfoblastos de AF producen la mitad de interleucina 6 (IL6) y cuando crecen en presencia de esta sustancia, la sensibilidad que presentan hacia la MMC es parcialmente corregida, al menos en los grupos AF-A, AF-B, AF-C, y AF-D. Además, encontraron altos niveles de factor de necrosis tumoral α (TNF α) en los mismos grupos de complementación (Rosselli *et al*, 1992; Rosselli *et al*, 1994) y por otro lado, se han observado anomalías en la producción de factor de necrosis κ B (NF- κ B) que pueden deberse al exceso en la producción de TNF α .

Ciertos estudios indican que las células AF no responden a la inducción de citocinas, mientras que otros estudios han demostrado que hay una hipersensibilidad a ciertos factores de crecimiento (Rathbun *et al*, 1997; Kupfer y D'Andrea, 1996).

V. Ribonucleótido reductasa, hidroxiiurea, y catalasa:

A. Ribonucleótido reductasa

La ribonucleótido reductasa (RNR) es una enzima que tiene la función de convertir los ribonucleótidos difosfato presentes en la célula a 2'desoxirribonucleótidos difosfato que después son transformados a 2'desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), la materia prima para la síntesis programada (replicación) y la no programada (reparación) de DNA (Voet y Voet, 1990; Yarbrow, 1992). Esta enzima está compuesta por cuatro subunidades ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$) que consisten en dos pares de dímeros, M1 y M2. El dímero M2 de la enzima contiene un grupo hierro no hemo y un radical tirosil que son esenciales para la actividad enzimática (Voet y Voet, 1990).

B. Hidroxiiurea

La hidroxiiurea (HU) fue sintetizada por primera vez en Alemania en el año de 1869. En un principio esta sustancia fue probada en animales y llevaba a la muerte; sin embargo, en 1963 Stearns *et al* encontraron que la HU actuaba contra la leucemia en ratones y a partir de este momento varios experimentos demostraron que la HU funciona contra una gran variedad de tumores. Se iniciaron investigaciones acerca de la actividad de la

sustancia mencionada y se observó que tiene la capacidad de inhibir la síntesis de DNA sin afectar la transcripción o traducción. Específicamente, la HU entra a la célula por difusión pasiva e inhibe a la enzima RNR inactivando a la subunidad M2 de la proteína sin unirse a ella. El radical libre que contiene la HU atrapa selectivamente al radical tirosil de la RNR; y aunque el centro de hierro no es modificado en lo absoluto, la enzima pierde su función (Yarbro, 1992; Voet y Voet, 1990). La actividad de la HU sobre la RNR tiene como consecuencia la inhibición de la síntesis de DNA y causa un desbalance en el acervo de dNTPs de la célula. Por esta razón la droga es tóxica únicamente en células que están activamente sintetizando DNA durante la exposición a la HU (Schilsky *et al*, 1992).

Frias y colaboradores en 1996 evaluaron el efecto de la HU en linfocitos AF de pacientes no clasificados y encontraron que éstas células presentan una inhibición de la síntesis del DNA significativamente mayor que los controles normales. Estos resultados ponen en evidencia una falla en el metabolismo de dNTPs que puede ir más allá de la replicación en fase S, pues la HU inhibe la formación de dNTPs necesarios también para la síntesis de reparación presente en G₂. Dado que hay evidencias que indican que en células AF está alterada la reparación que ocurre en G₂, se adicionó HU en esta fase del ciclo celular y se encontró una potenciación de AC en células de las líneas AF-A y AF-B tratadas previamente con MMC (Molina *et al*, datos no publicados). Este incremento de aberraciones puede deberse a la inhibición de la síntesis de dNTPs y/o a la generación de radicales libres que se producen como resultado de la actividad de la HU y que dañan al DNA. En particular, la HU genera peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

(figura 6) que puede dañar al DNA por sí mismo y posee el potencial de formar otras especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas (DeSesso *et al*, 1994).

C. Catalasa

La catalasa (CAT) es una enzima que se encuentra normalmente en las células dentro de los peroxisomas, está compuesta de cuatro subunidades iguales, cada una con un grupo hemo y un NADH y el peso molecular de todo el polipéptido es de 250 kDa. Es una de las enzimas más eficientes de la naturaleza y su función es detoxificar a la célula del H₂O₂ convirtiéndolo en agua y oxígeno molecular. Esta enzima trabaja en conjunto con la superóxido dismutasa (SOD) para eliminar las especies reactivas de oxígeno generadas dentro de la célula como productos secundarios de reacciones que ocurren comunmente (Voet y Voet, 1990).

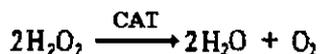
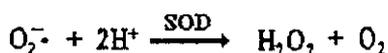


Figura 5. Acción de la SOD y la CAT para eliminar radicales libres de la célula.

Hay algunos estudios en donde se utilizó a la CAT en linfocitos humanos para evaluar (por medio de electroforesis unicelular) su efecto antioxidante y se observó que esta enzima es altamente eficiente cuando se agrega en presencia de especies reactivas de oxígeno (Anderson *et al*, 1994; Testoni *et al*, 1997). En

linfocitos de AF, Nordenson cuantificó AC después de tratar éstas células con CAT y/o SOD agregadas desde el comienzo del cultivo y encontró reducido el número de AC en células AF con la adición de SOD y aún en mayor proporción en cultivos con CAT. En otro estudio realizado con fibroblastos de AF se demostró que la CAT agregada al principio del cultivo, reduce significativamente el número de micronúcleos (marcador de daño cromosómico) que ocurren espontáneamente y con tratamiento de MMC (Raj y Heddle, 1980). La elevada cantidad de daño cromosómico observado en la AF puede deberse a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno o bien a un decremento en el potencial para atrapar estas especies reactivas y esto puede estar aunado a una falla en la reparación (Nordenson, 1977)

VI Justificación

Es importante entender el efecto de la HU sobre las células AF debido a que esta sustancia además de inhibir a la RNR y alterar los niveles de dNTPs, genera radicales libres (principalmente H_2O_2) (figura 6). Por lo anterior es importante determinar si el daño causado por la HU en fase G_2 a células tratadas con MMC está dado por falta de dNTPs necesarios para la reparación o por la producción de especies reactivas de oxígeno. Esta información además contribuirá a estudiar de manera específica la respuesta a CAT de las líneas celulares AF-A y AF-B y aportará conocimiento acerca del fenotipo celular de la AF.

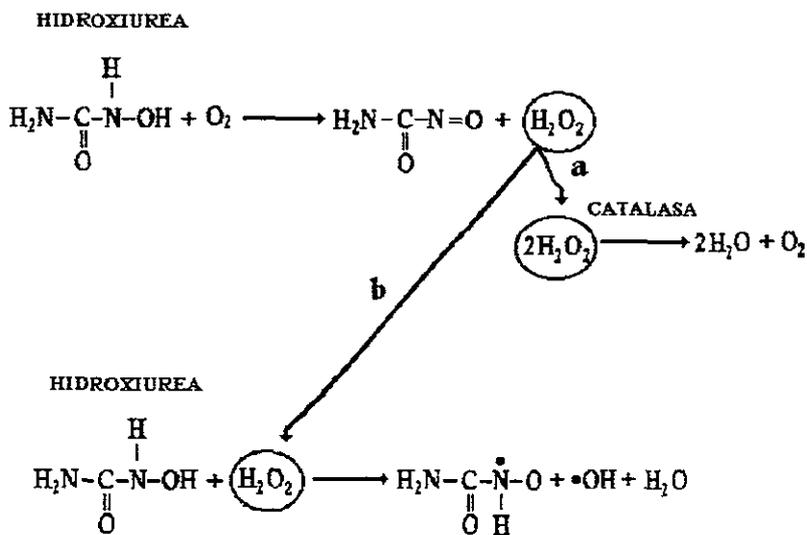


Figura 6. Producción de radicales libres en presencia de HU y O₂ con catalasa (a) y sin la enzima (b).

VII. Objetivo

Determinar si la potenciación en la frecuencia de AC inducida por la HU aplicada en fase G₂ a linfoblastos de AF-A y AF-B tratados con MMC, se debe a la generación de radicales libres.

VIII. Hipótesis

Si la catalasa produce una disminución de AC hasta los niveles inducidos por la MMC sólo, entonces la potenciación de daño producido por la HU a las células AF se debe a la generación de radicales libres.

METODOLOGÍA

I. Prueba preliminar para determinar la actividad de la catalasa

Dado que la CAT es una proteína que requiere condiciones específicas para su acción, realizamos un ensayo para validar su actividad en cultivos celulares, nuestro modelo experimental. Éste se realizó con linfocitos separados con Lymphoprep (Nycomed) de un total de 10 ml de sangre periférica y resuspendidos en 1 ml de medio RPMI (GIBCO). Inmediatamente, se determinó la viabilidad celular del cultivo por el método de exclusión con tinción dual (bromuro de etidio (BIORAD)/diacetato de fluoresceína). Los linfocitos presentaron una viabilidad mayor al 95% y fueron incubados a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Este cultivo se separó en viales con 500,000 células para cada uno de los siguientes tratamientos.

- a) Medio
- b) CAT 250 unidades/ml
- c) Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 80µM
- d) CAT + H₂O₂ 80µM
- e) H₂O₂ 40µM
- f) CAT + H₂O₂ 40µM
- g) H₂O₂ 20µM
- h) CAT + H₂O₂ 20µM
- i) H₂O₂ 5µM
- j) CAT + H₂O₂ 5µM

Las células fueron incubadas con los tratamientos anteriores por un lapso de 1 hr, y el daño al DNA se evaluó con la técnica de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa) de acuerdo con la metodología propuesta por Singh *et al* en 1988. Se prepararon las laminillas cubriéndolas con una capa de agarosa de punto de fusión regular (NMA) (GIBCO). Una vez que se secaron, se agregó 75µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) (BIO-RAD) mezclada con 5000 linfocitos, se dejaron solidificar sobre una superficie fría; finalmente se agregó una tercera capa con 75 µl de LMPA y nuevamente se dejaron solidificar. Posteriormente, las células fueron colocadas en solución de lisis pH 10 por 24 horas después de las cuales las laminillas fueron retiradas para colocarse en la cámara de electroforesis con buffer pH 13 por 20 min, esto con la finalidad de desenrollar el DNA; enseguida, los geles se corrieron a 25 volts con una corriente de 300 miliampers por 20 minutos bajo luz amarilla. Pasado este tiempo, las laminillas se lavaron tres veces por 5 min con buffer de neutralización pH 7.5, se escurrieron y fueron teñidas con 50 µl de bromuro de etidio IX (BIO-RAD). El análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia con un objetivo de 25X.

El ensayo se realizó por duplicado para cada una de los tratamientos. Se evaluaron 200 células por tratamiento y por repetición y se consideró el criterio de ausencia de daño (células sin cola donde no migra el DNA) o presencia de daño (células con cola donde hay migración de DNA).

II. Población de estudio:

Líneas celulares:

Se utilizaron las líneas linfoblastoides de los grupos de complementación AF-A (HSC-72) y AF-B (HSC-230) donadas por el Dr. Hans Joenje de la Universidad Libre de Holanda en Amsterdam y una línea linfoblastoide normal (NL-6846) transformada en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría por infección de linfocitos de un individuo normal con el virus Epstein-Barr

Las líneas linfoblastoides se cultivaron en cajas Falcon (NUNC) con medio RPMI (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (Hyclone) al 10%, L-glutamina (GIBCO) al 1%, piruvato de sodio (GIBCO) al 1%, aminoácidos no esenciales (GIBCO) al 1% y antibiótico/antimicótico (GIBCO) al 1%. El suero fetal bovino fue inactivado a 56°C por 30 min. Las líneas celulares se mantuvieron en incubación a 37°C y una atmósfera de CO₂ al 5%.

III. Cultivos celulares:

Al inicio del experimento, se hicieron viabilidades celulares por medio de exclusión con azul tripano (Sigma) en un hemocitómetro y sólo se utilizaron los cultivos con viabilidad igual o mayor al 90%.

Para cada línea linfoblastoide se sembraron ocho tratamientos en tubos estériles de 11 ml de capacidad (NUNC); cada tubo con 1,500,000 células en un volumen final de 5 ml de medio RPMI suplementado. Inmediatamente, a cuatro de los cultivos se les agregó MMC (Sigma) a una concentración de 10 ng/ml (figura 7). Después de 24 horas de tratamiento con este

mutágeno, se lavaron con solución salina Hank's (GIBCO) previamente calentada a 37°C. Se realizaron dos lavados a los cultivos con MMC y uno sólo a los cultivos sin MMC; las células fueron reincubados por 24 horas más con 5 ml de medio RPMI suplementado para ser cosechados a las 48 horas. Tres horas antes de la cosecha se agregó HU (2 mM) (Amersham), CAT (0.6 mg/ml) (Sigma) y ambas sustancias a los tubos correspondientes, como se muestra en la figura 7. Estos compuestos se agregaron en este tiempo para asegurar que las células obtenidas en metafase estuvieran expuestas a HU y CAT solamente durante la fase G₂ previa del ciclo celular. Este experimento se realizó por triplicado para cada una de las líneas celulares.

IV. Cosecha:

Los cultivos fueron expuestos a colcemida (Sigma) a una concentración de 0.0016 mg/ml por 1.5 horas para obtener células en metafase. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 400 g por 10 min, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular, se agregó 5 ml de solución hipotónica de KCl 0.075M (MERCK) y se incubaron a 37°C durante 20 min. Enseguida, las células se prefijaron agregando 1 ml de solución de Carnoy metanol:ácido acético 3:1 (MERCK) y se homogeneizó el cultivo. Los tubos se centrifugaron a 400 g por 10 min, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se fijó en agitación constante con solución de Carnoy. Finalmente, se procedió a dar de tres a cuatro lavados que consisten en centrifugar a los cultivos en las mismas condiciones, desechar el sobrenadante, resuspender el botón celular y agregar fijador limpio.

V. Elaboración de preparaciones:

Se hicieron preparaciones por medio de goteo del paquete celular en portaobjetos limpios y se fijaron a la flama con un mechero Bunsen. Se tiñeron con Wright (MERCK) al 25% y Giemsa (MERCK) al 12% en buffer de fosfatos.

VI. Análisis:

Las preparaciones fueron codificadas para hacer un análisis a ciegas por una persona ajena al estudio. Se analizaron 50 metafases por tratamiento, por línea celular y por repetición cuantificándose el número de AC por célula de los siguientes tipos: rupturas: cromosómicas y cromatídicas; fragmentos: céntricos y acéntricos; anillos, dicéntricos, figuras radiales y otras. Los gaps no fueron considerados.

Se obtuvieron las frecuencias de AC de cada tratamiento y se analizaron por medio de la U de Mann Whitney (M-W), prueba no paramétrica análoga a la t de Student, para hacer comparaciones pareadas entre tratamientos de la misma línea y entre los mismos tratamientos de diferentes líneas. Debido a que la frecuencia de AC puede ocultar particularidades de la población celular con algún tratamiento determinado, también se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov (K-S) para dos muestras independientes, basada en la comparación de frecuencias relativas acumuladas, (Sokal y Rohlf, 1995) y se compararon las distribuciones que se dan al agrupar a las células por su cantidad de aberraciones.

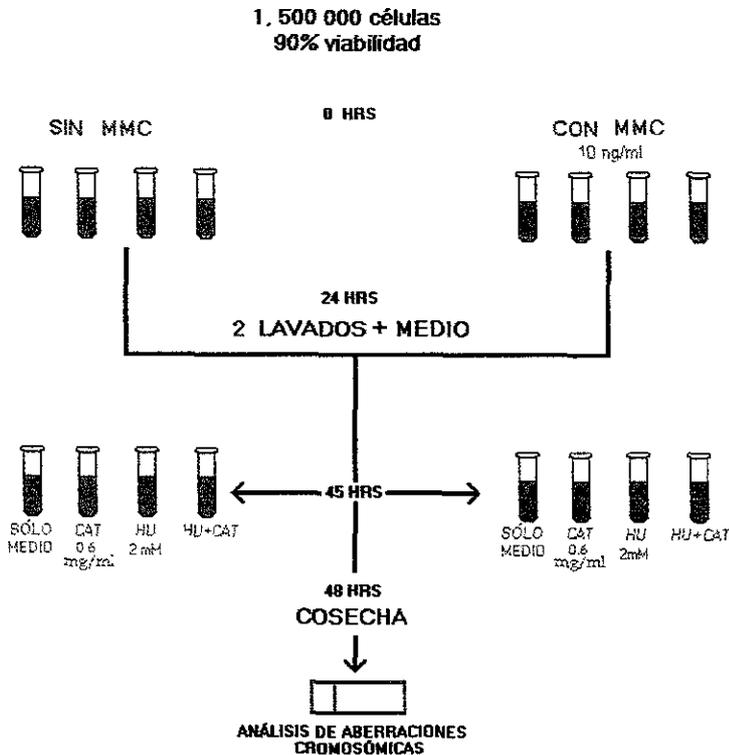


Figura 7. Esquema del experimento.
MMC (Mitomicina C); CAT (Catalasa); HU (Hidroxiurea).

- Los cultivos sin MMC fueron utilizados como control.
- El tratamiento con MMC se utilizó para evaluar la respuesta específica de las células AF en contraste con las normales.
- La CAT fue utilizada para evaluar si ésta produce daño a las células por sí sola, y para ver si el daño producido por la MMC e HU es corregido por la acción de esta enzima; específicamente para observar si corrige la potenciación de AC producida por estos agentes en AF-A y B.
- La HU fue utilizada para evaluar el daño que produce en fase G₂ y para corroborar la potenciación de AC en cultivos AF previamente tratados con MMC.

RESULTADOS

I. Ensayo cometa:

En las células sin tratamiento se observan los núcleos intactos ya que el DNA no migra cuando no hay daño (figura 8a). En los linfocitos tratados con H_2O_2 , se observa que el DNA dañado con rupturas de hebra doble y sencilla migra formando el cometa (figura 8b). Lo anterior indicó que el H_2O_2 causa daño al DNA de manera dosis-dependiente. Al agregar CAT (250 U/ml) se abate la toxicidad celular y esta enzima es capaz de reducir el daño al DNA a niveles basales en presencia de $5 \mu M$ de H_2O_2 (tabla 2).

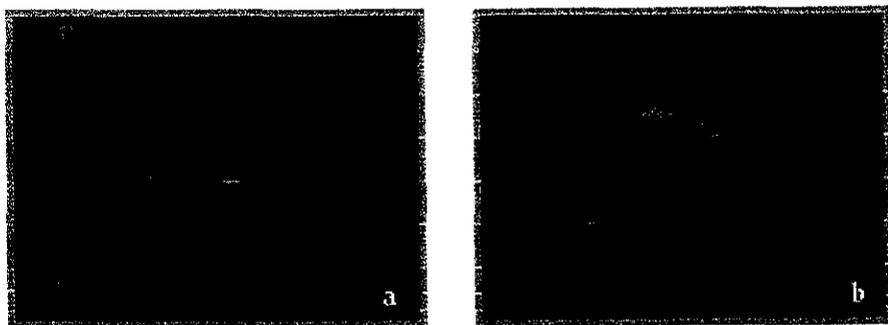


Figura 8. Ensayo cometa. a) Células sin tratamiento, b) Células tratadas con H_2O_2 .

Tabla 2. Efecto de la catalasa en células tratadas con H₂O₂.

Tratamiento	No. núcleos analizados	Núcleos sin daño
Medio	400	393/400
CAT	400	395/400
H ₂ O ₂ 80μM*	0*	—
Cat + H ₂ O ₂ 80μM	400	147/400
H ₂ O ₂ 40μM	3*	1/3
Cat + H ₂ O ₂ 40μM	400	345/400
H ₂ O ₂ 20μM	15*	0/15
Cat + H ₂ O ₂ 20μM	400	360/400
H ₂ O ₂ 5μM	51*	1/51
Cat + H ₂ O ₂ 5μM	400	391/400

*Debido a la toxicidad celular sólo se pudieron analizar los núcleos reportados.

II. Aberraciones cromosómicas

A. Frecuencia de AC

En el cultivo testigo, se puede ver que la frecuencia basal de AC en las líneas AF-A y AF-B es significativamente mayor a la obtenida en el cultivo normal ($p= 0.02$). Al comparar entre las dos líneas AF, la frecuencia de AC espontáneas en la línea AF-B es la más alta y también significativamente diferente a AF-A ($p= 0.02$) (figura 9, tablas 3-5).

El tratamiento con CAT produce una pequeña disminución en la frecuencia de AC en la línea normal y AF-B; esta diferencia es significativa sólo en AF-B ($p=0.03$); mientras que en la línea AF-A la CAT no tiene efecto sobre en la frecuencia de AC (figura 9; tablas 3-5).

La HU por si sola produce un incremento de AC comparado con el cultivo testigo para cada línea linfoblastoide. En la línea normal el daño se ve aumentado alrededor de cuatro veces, en AF-A es un poco mayor a una vez y en AF-B es de aproximadamente dos veces (figura 9, tablas 3-5), siendo todas estas diferencias significativas ($p=0.02$).

En el tratamiento de HU+CAT se observa una disminución no significativa de AC en las líneas normal y AF-B con respecto al cultivo con HU; en la línea AF-A no se observa ninguna disminución (figura 9, tablas 3-5).

El tratamiento con MMC tiene un efecto diferente en las células normales y en las AF; en la línea normal no hay diferencias entre las frecuencias de AC presentes en los cultivos sin tratamiento y aquellos tratados con MMC, mientras que en las células AF hay un aumento significativo de AC producido por este clastógeno

(figura 9, tablas 3-5). En la línea AF-A este aumento es de seis veces con respecto a su testigo ($p=0.01$) y en AF-B hay nueve veces más AC por célula con respecto a su testigo ($p=0.02$) y al comparar entre AF-A y AF-B también se encontró diferencia ($p=0.02$).

Cuando se adiciona CAT a los cultivos tratados con MMC, no se encuentra una diferencia en la frecuencia de AC comparada con sus tratamientos correspondientes de MMC en ninguna de las líneas celulares analizadas (figura 9, tablas 3-5).

En el cultivo al que se adicionó MMC+HU se encontraron las frecuencias de AC más altas en todas las líneas celulares con respecto a su testigo. La frecuencia de estos tratamientos combinados es 40% mayor que la frecuencia encontrada con la sumatoria de los tratamientos individuales en la línea normal; en AF-A este incremento es del 150% y en AF-B es del 80% poniéndose en evidencia una potenciación de daño en la línea AF-A y AF-B. El incremento presente en la línea normal es significativamente menor al de ambas líneas de AF ($p=0.02$). Comparando la potenciación de AC, también se encontró diferencia significativa entre la línea AF-A y la línea AF-B ($p=0.02$) (figura 9, tablas 3-5).

Al adicionar CAT a los cultivos con MMC+HU puede verse una pequeña disminución en la frecuencia de AC en las tres líneas celulares con relación al cultivo que presenta MMC+HU (figura 9, tablas 3-5); sin embargo, esta diferencia es significativa sólo en la línea normal ($p=0.02$); y en AF-A y AF-B no hay diferencias ($p=0.13$). Al comparar las frecuencias entre líneas, se encontró que las tres son significativamente diferentes ($p=0.02$).

Tabla 3. Línea linfoblastoide normal NL-6846.

Tratamiento	1° Réplica	2° Réplica	3° Réplica	Promedio	Desv.Std.
TESTIGO	0.10	0.04	0.02	0.05	0.04
CAT	0.08	0.02	0.00	0.03	0.04
HU	0.28	0.34	0.20	0.27	0.07
HU + CAT	0.22	0.06	0.18	0.15	0.08
MMC	0.02	0.06	0.06	0.05	0.02
MMC + CAT	0.02	0.02	0.08	0.04	0.03
MMC+HU	0.42	0.46	0.42	0.43	0.02
MMC+HU+CAT	0.38	0.38	0.40	0.38	0.01

Tabla 4. Línea linfoblastoide AF-A HSC-72.

Tratamiento	1° Réplica	2° Réplica	3° Réplica	Promedio	Desv.Std.
TESTIGO	0.30	0.26	0.30	0.28	0.02
CAT	0.20	0.32	0.30	0.27	0.06
HU	0.42	0.72	0.76	0.63	0.19
HU + CAT	0.72	0.58	0.72	0.67	0.08
MMC	1.58	2.30	2.08	1.98	0.37
MMC + CAT	2.40	1.94	1.64	1.99	0.38
MMC + HU	5.12	6.94	7.48	6.51	1.24
MMC+HU+CAT	5.68	4.16	5.50	5.11	0.83

Tabla 5. Línea linfoblastoide AF-B HSC-230.

Tratamiento	1° Réplica	2° Réplica	3° Réplica	Promedio	Desv.Std.
TESTIGO	0.56	0.36	0.42	0.45	0.10
CAT	0.24	0.34	0.36	0.31	0.06
HU	1.42	1.78	1.42	1.54	0.21
HU + CAT	0.98	1.54	1.28	1.27	0.28
MMC	5.28	4.42	4.46	4.72	0.49
MMC + CAT	5.62	4.24	3.36	4.41	1.14
MMC + HU	12.38	11.64	10.24	11.42	1.09
MMC+HU+CAT	10.46	10.82	8.46	9.91	1.27

En las tablas se presentan las frecuencias de aberraciones cromosómicas por célula de 50 células analizadas para cada tratamiento.

CAT (Catalasa 0.6 mg/ml), HU (Hidroxiurea 2mM), MMC (Mitomicina C 10ng/ml)

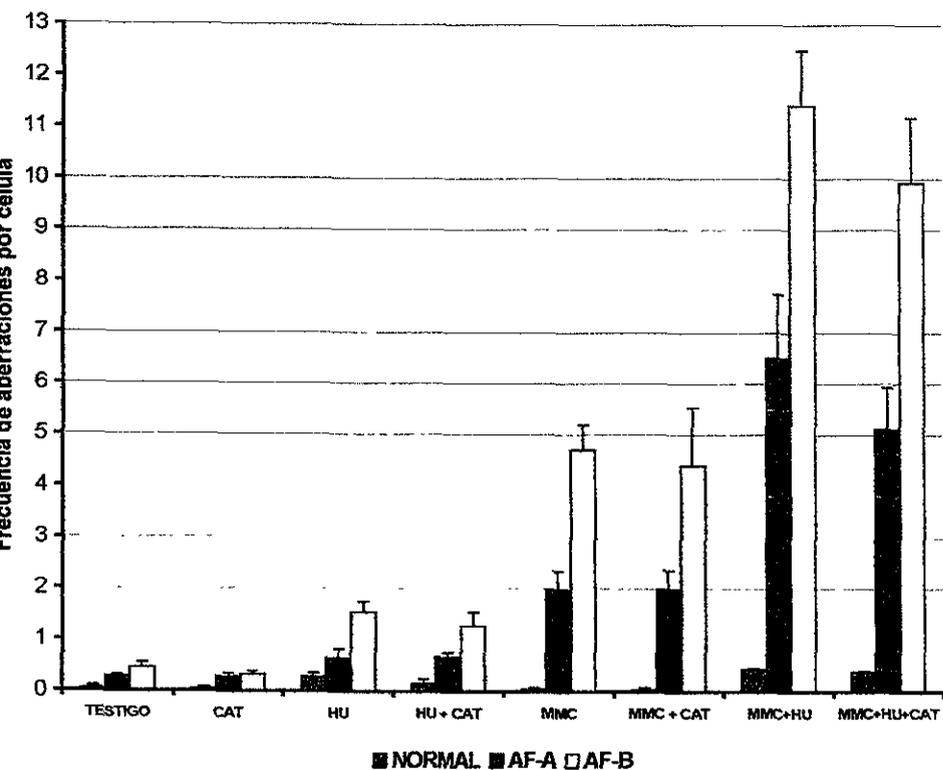


Figura 9. Efecto de la catalasa sobre la potenciación de AC con MMC+HU.
 CAT (Catalasa 0.6mg/ml), HU (Hidroxiurea 2mM),
 MMC (Mitomicina C 10 ng/ml)

B. Distribución de AC

Para poner en evidencia el comportamiento de las poblaciones celulares AF en contraste con las normales en algunos de los tratamientos, se agrupó el número de células con respecto a su número de AC.

En el cultivo sin tratamiento puede verse que las tres poblaciones celulares presentan la mayor parte de las células con cero AC, y muy pocas células tienen entre cuatro y cinco AC por lo que estas tres líneas celulares no son diferentes entre ellas (figura 10a).

En el cultivo con MMC se observa que hay mayor número de células con considerablemente más aberraciones en las líneas AF que las observadas en el cultivo normal. Las líneas AF se comportan de manera similar entre ellas por lo que el análisis estadístico de la distribución reveló que no hay diferencias ($p=0.32$) y que ambas líneas celulares AF son diferentes a la normal ($p=0.009$) (figura 10b).

Con el tratamiento combinado de MMC+HU (figura 10c) no hay diferencias entre la línea AF-A y AF-B, y sí hay diferencias con la línea normal ($p=0.009$) (figura 10c) y al agregar catalasa (MMC+HU+CAT), nuevamente, la población de células normales es diferente a ambas poblaciones celulares AF ($p<0.05$) y no hay diferencia entre AF-A y AF-B (figura 10d). En presencia de CAT no hay menor número de células con mucho daño por lo que no es diferente al cultivo MMC+HU en ninguna línea celular (figura 10c y d).

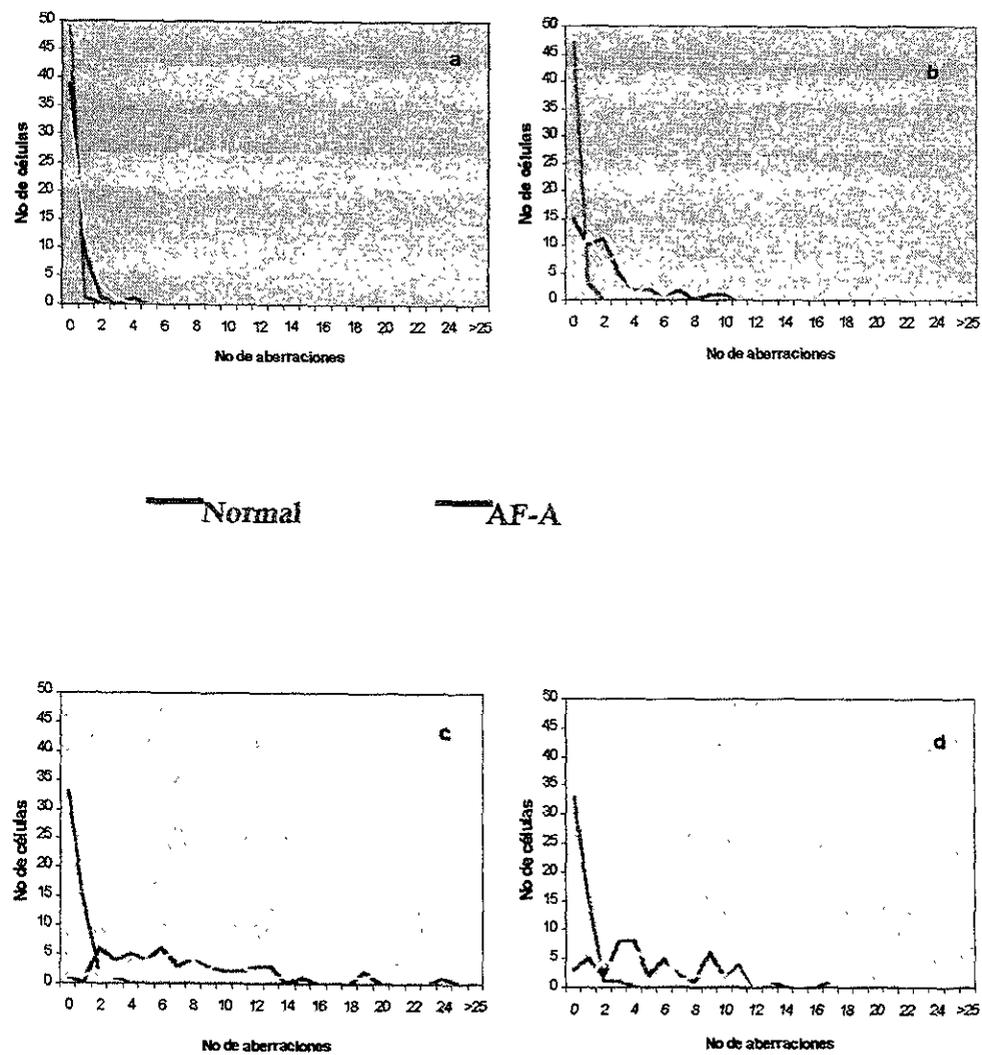


Figura 10. Distribución de AC. a) Sin tratamiento, b) MMC, c) MMC+HU, d) MMC+HU+CAT.

DISCUSIÓN

I. Tratamientos independientes:

El presente trabajo se realizó con el fin de probar si la potenciación de AC que produce la hidroxiiurea en linfoblastos de AF de los grupos de complementación AF-A y AF-B tratados con MMC, se debe a la liberación de radicales libres (H_2O_2).

En el cultivo testigo las líneas AF tienen una mayor frecuencia de AC espontáneas que la línea normal lo cual está de acuerdo con lo reportado desde 1964 por Schroeder y colaboradores pues la inestabilidad cromosómica caracteriza a éstas células. Al analizar la frecuencia de AC se obtienen diferencias significativas entre las tres líneas celulares ($p=0.02$); sin embargo la frecuencia de AC espontáneas no es suficiente para distinguir el fenotipo celular de la enfermedad con respecto al fenotipo normal, ni para distinguir entre distintos grupos de complementación dado que, bajo ciertas circunstancias, algunos individuos que no presentan la AF pueden tener elevadas frecuencias de AC y también es muy variable la frecuencia espontánea de AC entre pacientes AF. El análisis de la distribución de AC no demostró diferencia entre las tres líneas celulares para daño espontáneo reflejando la necesidad de utilizar clastógenos específicos como la MMC para hacer un diagnóstico definitivo del padecimiento.

En el cultivo con CAT la frecuencia de AC es semejante al cultivo sin tratamiento y sólo hay reducción significativa en AF-B lo cual está de acuerdo con lo reportado por Nordenson en 1977, quien utilizó CAT y SOD en linfocitos de sangre periférica de pacientes de grupo de complementación desconocido y encontró

reducciones significativas en el número de AC en los cultivos a los que les adicionó CAT con relación a los cultivos sin tratamiento. En un segundo estudio, se reportó el efecto de la CAT y SOD sobre cultivos de fibroblastos de pacientes con AF de grupo de complementación desconocido evaluado con el método de micronúcleos (marcador de daño cromosómico); los autores encontraron una reducción de daño en cultivos con CAT (Raj y Heddle, 1980). El no encontrar disminuciones significativas del daño basal en presencia de CAT en las líneas AF-A y normal en el presente estudio, probablemente radica en la metodología ya que en los trabajos anteriores se agregó la enzima al momento de la siembra y permaneció en el cultivo hasta la cosecha, mientras que en este estudio los cultivos estuvieron en presencia de CAT sólo durante G_2 , en un periodo de 3 horas previas a la cosecha. Llama la atención que este tiempo fue suficiente para disminuir la frecuencia de AC en la línea AF-B probablemente porque esta línea presenta las frecuencias de AC basales más altas encontradas, su valor es semejante al reportado por Nordenson en linfocitos AF sin clasificar, y parte del daño basal se puede deber a radicales libres.

Cuando las células normales son tratadas con MMC a una concentración de 10 ng/ml, no presentan diferencias con el cultivo testigo. Se ha visto tanto en nuestro laboratorio como en otros trabajos, que la respuesta de células normales a este mutágeno es altamente variable con frecuencias que van desde 0.01 hasta 0.26 AC por célula (Latt *et al*, 1975; Sasaki y Tonomura, 1973; datos no publicados de nuestro laboratorio) y aunque los valores encontrados en este estudio corresponden a un nivel bajo de daño, caen dentro de los rangos observados. En ambas líneas celulares AF hay un aumento significativo en el número de AC por la

hipersensibilidad de estas células a la MMC, como se puso en evidencia desde 1973 por Sasaki y Tonomura, y esta sustancia alquilante es ahora una de las principales herramientas diagnósticas para la enfermedad (Auerbach *et al*, 1997a; Seyschab, 1995). El análisis de las frecuencias reveló que no sólo hay diferencias entre la línea normal y las AF, sino que también las líneas AF-A y AF-B son significativamente distintas, lo que indica que estos dos grupos de complementación se comportan de manera diferente en cuanto a la sensibilidad que presentan a la MMC; sin embargo, al analizar el número de células con respecto a la cantidad de AC en estas dos líneas, puede verse que las poblaciones celulares de AF tienen una distribución similar entre ellas y completamente distinta a la normal cuando son tratadas con este mutágeno (figura 10) lo que refleja su característica de hipersensibilidad a MMC en contraste a células normales.

La HU es una molécula con la capacidad de inhibir a la RNR, por tanto produce deficiencia de dNTPs y, agregada en G₂ puede inhibir los procesos normales de reparación o bien liberar radicales libres que dañan al DNA en esta fase. En nuestro estudio encontramos aumento de AC en las tres líneas celulares como se ha observado por otros autores (Kihlman y Andersson, 1985), sin embargo el mecanismo por el cual se producen estas AC aún se desconoce.

II. Tratamientos combinados:

Al agregar CAT a los cultivos previamente tratados con MMC no presentan reducción de daño cromosómico en ninguna línea celular contrario a lo reportado anteriormente por Raj y

Heddle en 1980, que al tratar células normales y AF con CAT encuentran una disminución de daño cromosómico. Como se mencionó anteriormente estos autores agregan la enzima al comienzo del experimento simultáneamente a la adición de MMC de manera que la CAT ejerce su actividad a todo lo largo del cultivo y se sabe que la MMC genera radicales libres que podrían neutralizarse por la CAT. En este estudio se agregó la MMC que dañó al DNA durante 24 horas después de las cuales se lavaron los cultivos y 21 horas después de este lavado se agregó la CAT sólo durante 3 horas en la fase G₂ de las células cosechadas en mitosis. El daño que ocasionó la MMC fue anterior a la protección que pudiera haber ejercido la CAT y resulta difícil que ésta pueda corregir el daño *a posteriori* dado que la vida media de la mayoría de los radicales libres es muy corta (DeSesso, 1994).

En los cultivos con HU+CAT se encontró una pequeña *disminución no significativa en la cantidad de AC en las líneas normal y AF-B y no así en AF-A*. Si la HU produce radicales libres que dañan al DNA (DeSesso *et al*, 1994) y la CAT tiene la capacidad de transformarlos a metabolitos no tóxicos, esperaríamos una *disminución de AC al agregar esta enzima en las tres líneas celulares*. El hecho de no encontrar grandes diferencias entre estos tratamientos sugiere que el daño producido por la HU no fue causado principalmente por la formación de (radicales libres), sino que pudiera asociarse a la poca disponibilidad de dNTPs que hay en la célula en G₂ mientras la HU está actuando.

Cuando las células son tratadas con MMC e HU se produce un aumento significativo en el número de AC que en AF-A corresponde a 150%, en AF-B es de 80% y en la línea normal es de 40%, poniéndose en evidencia una *potenciación de daño para AF-A*

y una respuesta intermedia en AF-B. La línea AF-B es la más sensible tanto a la acción de la HU como a la de la MMC por separado; sin embargo, la combinación de estas sustancias causa casi el doble de la sumatoria de los tratamientos independientes en AF-B; y en AF-A este valor es dos y media veces mayor. Es importante tener en cuenta que el gen mutado en el grupo de complementación AF-A es diferente al que está alterado en AF-B y los resultados probablemente sean consecuencia de la función de la proteína alterada en la célula.

Se ha reportado que cuando la HU es aplicada en combinación con otros mutágenos, hay un sinergismo de AC tanto en linfocitos humanos normales como en células vegetales (Kihlman y Andersson, 1985; Mateos *et al*, 1989). Aún con estas evidencias, no se conoce el mecanismo mediante el cual se presenta este aumento de daño cromosómico. Los autores anteriores sugieren, que el daño producido por HU durante G₂ en células previamente tratadas con agentes alquilantes se debe a una alteración en el aporte de dNTPs que se requieren en esta fase del ciclo celular para llevar a cabo la reparación (Kihlman y Andersson, 1985; Mateos *et al*, 1989). El aumento de AC observado para las líneas AF y normales, podría deberse a la misma causa ya que un desbalance en las concentraciones de dNTPs durante la síntesis de DNA lleva a mutagénesis y rupturas cromosómicas (Snyder, 1984) y dado que se ha postulado que el defecto básico en la AF podría estar en la reparación post-replicativa estas células resultaron ser las más afectadas.

Otro de los mecanismos que puede causar el daño observado en las líneas AF estudiadas, es la presencia de H₂O₂ generado por la HU al reaccionar con el O₂; sin embargo al agregar

CAT *simultáneamente* con la HU en cultivos tratados previamente con MMC, se produce una disminución significativa sólo en la línea normal al comparar este tratamiento con MMC+HU. Esta reducción, aunque significativa, no llega a los niveles basales de AC, por lo que el daño que produce la HU no es causado en su totalidad por radicales libres. La adición de CAT en estos cultivos para líneas AF produce una reducción no significativa de la frecuencia de AC lo que demuestra que la potenciación observada en cultivos AF con MMC e HU no es causada principalmente por la producción de H₂O₂ y sus derivados oxidativos, aunque éstos pueden jugar un papel secundario como causa de daño cromosómico.

CONCLUSIONES

- La HU a una concentración 2mM causa aberraciones cromosómicas en las tres líneas celulares cuando agregada durante la fase G₂ del ciclo celular.
- En presencia de MMC, la HU produce una potenciación de AC, principalmente en AF-A y respuesta intermedia en AF-B.
- La línea AF-B presenta más AC que AF-A, sin embargo el aumento de AC en los tratamientos con MMC+HU es mayor en AF-A.
- La CAT no reduce significativamente el daño producido por la HU en las líneas celulares AF por lo tanto la HU no produce potenciación de daño cromosómico por medio de liberación de H₂O₂.

ABREVIATURAS

AC	aberraciones cromosómicas
AF	anemia de Fanconi
BRCA1	cáncer de mama 1
CAT	catalasa
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleótidos
HU	hidroxiurea
MMC	mitomicina C
NF- κ B	factor de necrosis κ B
RNA	ácido ribonucleico
RNR	ribonucleótido reductasa
SCE	intercambio de cromátidas hermanas
SOD	superóxido dismutasa
TNF α	factor de necrosis tumoral α

BIBLIOGRAFÍA

Abeliovich D y Cohen M. (1978) Normal activity of phosphorylase, superoxide dismutase and catalase in skin fibroblast cultures from Fanconi's anemia patients. *Isr J Med Sci* 14: 284-287.

Alter B. (1999). Clinical Features and Diagnosis of Fanconi's anemia. In: Schrezenmeier H. and Bacigalupo A. Aplastic Anemia. Cambridge University Press. UK.

Anderson D, Yu T, Phillips B, Schmezer. (1994) The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 307: 261-271.

Auerbach A, Buchwald M, Joenje H. (1997a). Fanconi anemia. en: Vogelstein B y Kinzler KW. *The Genetic Basis of Human Cancer*. Mc Graw Hill. U.S.A pp 317-332.

Auerbach A. (1997b) Fanconi anemia: genetic testing in Ashkenazi Jews. *Genet. Test* 1 (1): 27-33.

Auerbach A, Greenbaum J, Batish S, Levrán O, Giampietro P, Verlander P. (1999) The Fanconi anemia gene *FANCG*: spectrum of mutations and comparative phenotypic consequences. 11th International Fanconi anemia Scientific Symposium.

Balin A, Goodman D, Rasmussen H, Cristofalo V. (1978) Oxygen-sensitive stages of the cell cycle of human diploid cells. *J. Cell Biol.* 78: 390-400.

Berger R, Le Coniat M, Gendron M. (1993) Fanconi anemia Chromosome breakage and cell cycle studies. *Cytogenet Cell Genet* 69: 13-16.

Buchwald M y Moustacchi E. (1998) Is Fanconi anemia caused by a defect in the processing of DNA damage? *Mutat Res* 408:75-90.

DeSesso J, Scialli A, Goeringer G. (1994) D-Mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits. *Teratology* 49: 248-259.

De Winter J, Waisfisz Q, van Berkel C, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk J, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M and Joenje H. (1998) The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nature Genetics* 20: 281-283.

De Winter J, Rooimans M, van der Weel L, van Berkel C, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk J, Arwert F, Mathew C, Scheper R, Hoatlin M, Buchwald M, Joenje H. (2000a) The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nature Genetics* 24: 15-16.

De Winter J, Léveillé F, van Berkel C, Rooimans M, van der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan N, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater P, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk J, Mathew G, Digweed M, Buchwald M, Joenje J. (2000b) Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1306-1308.

Doroshov J. (1992) Reductive activation of mitomycin C: A delicate balance. *Journal of the National Cancer Institute* 84 (15): 1138-1139.

Duckworth-Rysiecki G, Cornish K, Clarke C, Buchwald M. (1985) Identification of two complementation groups in Fanconi anaemia. *Somat Cell Mol Genet* 11: 228-230.

Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux A, Buriot D, Prieur M. (1982) The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Human Genetics.* 62: 327-332.

Esmer M, Carnevale A, Molina B, Cruz R, Sánchez S, Gómez, L, Frías S. (1999) Variabilidad clínica y citogenética en doce familias mexicanas con anemia de Fanconi y su relación con el grupo de complementación al que pertenecen. *La Revista de Investigación Científica.* 51: 273-283.

Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee M, vanWeel-Sipman, Havenga C, Morgan N, De Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, de Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckman E, Mathew C. (2000) Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. *Blood.* 96: 4064-4070.

Frías S, Mendoza S, Molina B, Carnevale A. (1991) Effect of mitomycin C and bromodeoxyuridine on Fanconi anemia lymphocytes. *Ann Génét* 34:

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

Fornace A, Little J, Weichselbaum R. (1979) DNA repair in a Fanconi's anemia fibroblast cell strain. *Biochimica et Biophysica Acta* 561: 99-109.

Fujiwara Y. (1982) Defective repair of mitomycin C crosslinks in Fanconi's anemia and loss in confluent normal and xeroderma pigmentosum cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 699: 217-225.

García-Higuera I, Kuang Y, Näf D, Wasik J, D'Andrea A. (1999) Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex. *Molec Cell Biol* 19: 4866-4873.

García-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn S, Timmers C, Henja J, Grompe M, D'Andrea A (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular Cell* 7: 249-262.

Gutiérrez L. (1979) Mitomycin C in Childhood Cancer a Review en: Carter S and Crooke S Mitomycin C. Current Status and New Developments. Academic Press. New York, EUA.

Heinrich M, Hoatlin M, Zigler A, Silvery K, Bakke A, Keeble W, Reifsteck C, Grompe M, Brown M, Magenis E, Olson S, Bagby G. (1998) DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood* 91: 275-287.

Joenje H, Eriksson A, Frants R, Arewrt F, Houwen B. (1978) Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in Fanconi's anaemia. *Lancet* I: 204.

Joenje H, Arwert F, Eriksson A, de Koning J, Oostra A. (1981) Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature* 290: 142-143.

Joenje H and Awert F. (2001) Connecting Fanconi anemia to BRCA1. *Nature Medicine* 7:406-407.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Joenje H y Patel K. (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nature Reviews Genetics* 2:446-457.

Kano Y, Fujiwara Y. (1981) Roles of interstrand crosslinking agents and its repair in the induction of sister-chromatid exchange and higher induction in Fanconi's anemia cells. *Mutat Res* 81: 365-375.

Kihlman B and Andersson H. (1985) Synergistic enhancement of the frequency of chromatid aberrations in cultured human lymphocytes by combinations of inhibitors of DNA repair. *Mutat Res* 150: 313-325.

Kruyt F, Dijkmans L, van den Berg T, Joenje H. (1996) Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 87: 938-948.

Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch P. (1985) Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent endomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet.* 37: 1022-1030.

Kupfer G and D'Andrea A. (1996) The effect of the Fanconi anemia polypeptide, FAC, upon p53 induction and G₂ checkpoint regulation. *Blood* 88: 1019-1025.

Kupfer G, Näf D, Suliman A, Pulsipher M, D'Andrea A. (1997a) The Fanconi anemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex. *Nature Genetics.* 17: 487-490

Kupfer G, Näf D, and D'Andrea A. (1997b) Molecular Biology of Fanconi anemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 11(6):1045-1060.

Latt S, Stetten G, Juergens L, Buchanan G, Gerald P. (1975) Induction of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. *PNAS* 72: 4066-4070.

Lo Ten Foe J, Rooimans M, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wikjer M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen D, Savoia A, Cheng N, van Berkel C, Strunk M, Gille J, Pals G, Kruyt F, Pronk J, Arwert F, Buchwald M, Joenje H. (1996). Expression cloning of a major Fanconi anaemia gene, *FAA*. *Nature Genetics* 14: 320-323.

Lown J. (1979) The Molecular Mechanism of Antitumor Action of the Mitomycins en Carter S and Crooke S Mitomycin C. *Current Status and New Developments.* Academic Press. New York, EUA.

Mateos S, Piñero J, Ortiz T, Cortés F. (1989) G₂ effects of DNA-repair inhibitors on chromatid type aberrations in root-tip cells treated with maleic hydrazide and mitomycin C. *Mutat Res* 226: 115-120.

Marathi U, Howell S, Ashmun R, Brent T. (1996) The Fanconi anemia complementation group C protein corrects DNA interstrand cross-link specific apoptosis. *Blood* 88:2298-2305.

Medhurst A, Huber P, Waisfisz Q, De Winter J, Mathew C. (2001). Direct interaction of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway. *Human Molecular Genetics* 4:423-429.

Nordenson I. (1977) Effect of Superoxide Dismutase and Catalase on Spontaneously Occurring Chromosome Breaks in Patients with Fanconi's Anemia. *Hereditas* 86:147-150.

Novotná B, Goetz P, Surkova N. (1979) Effects of Alkylating Agents on Lymphocytes From Controls and From Patients With Fanconi's Anemia. *Human Genetics* 49: 41-50.

Raj AS y Heddle J. (1980) The effect of superoxide dismutase, catalase, and L-cysteine on spontaneous and on mitomycin C induced chromosomal breakage in Fanconi's anemia and normal fibroblasts as measured by the micronucleus method. *Mutat Res* 78: 59-66.

Rathbun K, Faulkner G, Ostroski M, Christianson T, Hughes G, Jones G, Cahn R, Maziarz R, Royle G, Keeble W, Heinrich M, Grompe M, Tower P, and Bagby G. (1997) Inactivation of the Fanconi anemia group C gene augments interferon- γ -induced apoptotic responses in hematopoietic cells. *Blood* 90: 974-985.

Remers A. (1979) Mitomycin C and Analog Development en: Carter S and Crooke S Mitomycin C. Current Status and New Developments. Academic Press. New York, EUA.

Ridet A, Guillof E, Duchaud E, Cundari E, Fiore M, Moustacchi E, Rosselli F. (1997) Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. *Cancer Research* 57: 1722-1730.

Rosselli F, Sanceau J, Wietzerbin J, Moustacchi E. (1992) Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6. *Human Genetics* 89:42-48.

Rosselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J, Moustacchi E. (1994) Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia: II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha. *Blood* 83: 42-48.

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

Saito H, Hammond A, Moses R. (1993) Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells. *Mutat Res* 249: 127-132.

Sasaki M y Tonomura A. (1973). A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA crosslinking agents. *Cancer Research* 33: 1829-1836.

Schilsky R, Ratain M, Vokes E, Vogelzang N, Anderson J, Peterson B. (1992) Laboratory and clinical studies of biochemical modulation by hydroxyurea. *Seminars in Oncology* 3 Suppl. 9: 84-89.

Schindler D y Hoehn H. (1988) Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Human Genetics* 43: 429-435.

Schroeder T, Anshütz F, Knopp A. (1964) Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy. *Human Genetics* 1: 194-196.

Seyschab H, Sun Y, Friedl R, Schindler D, Hoehn H. (1993) G₂ phase cell cycle disturbance as a manifestation of genetic cell damage. *Human Genetics* 92: 61-68.

Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, Schroeder-Kurth T. (1995) Comparative evaluation of diepoxibutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 85: 2233-2237.

Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.

Snyder R. (1984) Deoxyribonucleoside triphosphate pools in human diploid fibroblasts and their modulation by hydroxyurea and deoxynucleosides. *Biochemical Pharmacology* 33: 1515-1518.

Sokal R y Rohlf J. (1995) *Biometry*. Third Edition. W.H. Freeman and Company. USA. pp 423-439.

Stearns B, Losee K, Bernstein J. (1963) A new type of potential antitumor agent. *J Med Chem* 6: 201.

Strathdee C, Gavish H, Shannon W, Buchwald M. (1992) Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 357: 3-434.

Testoni M, Bolzán A, Bianchi M, Bianchi N. (1997) Effects of antioxidants on streptonigrin-induced damage and clastogenesis in CHO cells. *Mutat Res* 373: 201-206.

Timmers C, Taniguchi T, Henja J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea A, Moses R, Grompe M. (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, *FANCD2*. *Molecular Cell* 7: 241-248.

Voet D and Voet J. (1990) *Biochemistry*. John Wiley & Sons. U.S.A. pp. 10, 752-754.

Waisfisz Q, De Winter J, Kruyt F, de Groot J, van der Weel L, Dijkmans L, Zhi Y, Arwert F, Scheper R, Youssoufian H, Hoatlin M, Joenje H. (1999a) A physical complex of the Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 and FANCA. *PNAS* 96:10320-10325.

Waisfisz Q, Saar K, Morgan N, Altay C, Leegwater P, De Winter J, Komatsu K, Evans G, Wegner R, Reis A, Joenje H, Arwert, Mathew C, Pronk J, Digweed M. (1999b) Chromosomal localization of the Fanconi anemia *FANCA* gene. 11th International Fanconi anemia Scientific Symposium. pp 22.

Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge S, Qin J. (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes and Development* 14: 927-939.

Wikjer M, Morgan N, Herterich S, van Berkel C, Tipping A, Gross H, Gille J, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, van Weel M, Ortega J, Schuler D, Samochatova E, Karwacki M, Bekassy A, Abecasis M, Ebell W, Kwee M, de Ravel T, Mathew C, *et al.* (1999) Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Human Genetics* 7(1): 52-9.

Yamashita T, Wu N, Kupfer G, Corless C, Joenje H, Grompe M, D'Andrea A. (1996) Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood* 87(10): 4424-32.

Yarbro J. (1992) Mechanism of action of hydroxyurea. *Seminars in Oncology* 19, Suppl. 9: 1-10.

Yoshimitsu K, Kobayashi Y, Usui T. (1984) Decreased superoxide dismutase activity of erythrocytes and leucocytes in Fanconi's anemia. *Acta Haematol* 72: 208-210.

Zakrzewski S y Sperling K. (1980) Genetic heterogeneity of Fanconi's Anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum Genet.* 56:81-84.