

00346

1



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DE LA MITOMICINA-C, LA HIDROXIUREA Y EL
PLASMA HUMANO NORMAL EN LA SINTESIS DE ADN DE
LINFOCITOS DE PACIENTES CON ANEMIA DE FANCON.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS
BIOLOGIA CELULAR**
P R E S E N T A :
BIOL. LAURA GOMEZ LAGUNA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ



MEXICO, D. F.

FEBRERO 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
el contenido de mi trabajo respecto
NOMBRE: Laura Gomez Laguna
FECHA: 4 MARZO 2003
FIRMA: Laura H

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría en colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la Dirección de la Dra. Sara Frías Vázquez.

B

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sara Frias Vázquez por haber dirigido esta tesis y por su tolerancia, amistad y dedicación para transmitir los conocimientos.

A los revisores de esta tesis Dr. Miguel Betancourt, Dra. Alessandra Carnevale, Dra. Patricia Ostrosky, Dr. Pedro Morales, Dr. Mario Atamirano y C. Dra. Bertha Molina, por compartir su valioso tiempo y conocimientos para mejorar este trabajo.

A mis compañeras de trabajo Bertha, Sandra, Silvia, Luz, Angélica, Angy, Celia y Carlos tan tolerantes y alegres que hacen un ambiente laboral envidiable por los otros laboratorios.

Al resto de mis amigos y amigas (no hay tanta hoja) entre los que destaca Lilian Mayagoitia por sus consejos y apoyo moral.

A mis padres y hermanos, Sol, Mer, Carmen, Fran, Lili, Oli, David, Angy y Omar por su infinito amor y confianza.

A mis Arturos, uno por ser la inspiración y el otro el motivo.

ÍNDICE	1
1 RESUMEN	2
2 INTRODUCCIÓN	4
2.1 Definición y características clínicas de AF.	4
2.2 Características Citogenéticas.	6
2.3 Grupos de complementación.	8
2.4 Otras alteraciones del fenotipo celular AF.	12
2.5 Síntesis de desoxirribonucleótidos.	20
2.6 Ribonucleotido Reductasa	23
2.7 Hidroxiurea	24
3 JUSTIFICACIÓN	27
4 OBJETIVO	28
5 HIPÓTESIS	28
6 METODOLOGIA.	29
6.1 Población de estudio.	29
6.2 Cultivo de linfocitos.	30
6.3 Cosecha de linfocitos.	31
6.4 Autorradiografía.	31
6.5 Análisis.	32
7 RESULTADOS.	34
7.1 Cultivos sin tratamiento.	34
7.2 Tratamiento con MMC.	34
7.3 Tratamiento con HU.	39
7.4 Tratamiento con plasma humano normal.	39
7.5 Cultivos tratados con MMC y luego HU.	44
7.6 Cultivos tratados con MMC y luego plasma.	44
7.7 Cultivos tratados con HU y plasma.	49
7.8 Efecto del plasma en cultivos tratados con MMC-HU	49
8 DISCUSIÓN	54
8.1 Efecto de la MMC.	54
8.2 Efecto de la HU.	56
8.3 Efecto de la MMC y la HU	61
8.4 Efecto del plasma humano normal.	62
9 CONCLUSIONES	65
10 APORTACIONES	66
11 REFERENCIAS	67

1 RESUMEN

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva que pertenece a los síndromes de inestabilidad cromosómica. Las células de estos pacientes son hipersensibles a los agentes alquilantes bifuncionales como la Mitomicina-C (MMC). Una característica inherente de estas células es su fase G2 del ciclo celular alargada que es cuando se realiza la reparación postreplicativa, aunque también hay evidencias que muestran alteración en la fase S como respuesta al daño producido por los agentes alquilantes bifuncionales. Esta alteración podría deberse a un desequilibrio de la reserva de nucleótidos ya que en cultivos de linfocitos de estos pacientes hay reducción del daño al agregarles purinas. Los nucleótidos disponibles para replicar el ADN durante la fase S y para reparar son dependientes de la acción de la ribonucleótido reductasa la cual puede ser inhibida con hidroxiaurea (HU). Por otra parte, en estudios previos se observó que el plasma normal es capaz de disminuir la frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por la MMC en linfocitos de pacientes con AF. Por lo anterior, se investigó el efecto de la MMC, de la HU y del plasma humano normal sobre la síntesis de ADN, en cultivos de linfocitos de cuatro pacientes con anemia de Fanconi y en cuatro controles normales. Para cada individuo se sembraron 32 cultivos, la mitad se trataron con MMC por 24 horas, la otra mitad estuvo sin MMC, después de este tiempo, se lavaron y ambos lotes se reincubaron de la siguiente manera: a) con solo medio. b) medio+HU. c) medio+plasma y d) medio+HU+plasma, dentro de las siguientes 24 horas se hicieron cosechas cada 6 horas y las preparaciones se procesaron por la técnica de autorradiografía, se

analizaron 2000 células por cada tratamiento y se registró el número de núcleos que incorporaron timidina tritiada (T3H). Los resultados indican que las células de sujetos con AF son hipersensibles a la MMC y a la HU ya que hay una disminución significativa del número de células que incorporaron T3H en cultivos tratados con estos agentes comparados con los cultivos de células normales. La hipersensibilidad a la HU no se había reportado anteriormente y podría ser una característica adicional del fenotipo de las células AF. El plasma normal produce incremento del número de células con síntesis de ADN tanto en células normales como de anemia de Fanconi, en estas últimas en la cosecha de 24 horas del cultivo de células tratadas con HU+plasma, el plasma contribuye a la recuperación de la población celular con síntesis de ADN y se pierde la diferencia entre las células AF con y sin tratamiento con HU.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La anemia de Fanconi (AF) fue descrita por primera vez por Guido Fanconi en 1917, desde entonces a la fecha se ha observado que en estos pacientes son muy variables las alteraciones clínicas y el desarrollo de la enfermedad (Gordon-Smith y Rutherford, 1989; Joenje y Patel, 2001).

La AF es una enfermedad autosómica recesiva, con una frecuencia aproximada de uno de cada 300 000 individuos y está considerada dentro del grupo de los síndromes de inestabilidad cromosómica por presentar aberraciones cromosómicas espontáneas, sensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales, alto riesgo al desarrollo de neoplasias, anomalías constitucionales y malformaciones congénitas (Timme y Moses, 1988).

La característica clínica clásica del padecimiento es la pancitopenia que se produce por una falla progresiva en la médula ósea, lo cual afecta a todos los elementos celulares y da como resultado la aparición de anemia, leucopenia y trombocitopenia. La anemia se establece entre los 5 y 9 años de edad, aunque hay quienes la presentan al año e incluso puede ocurrir en la adolescencia o en edad adulta.

Otro signo muy común es la hiperpigmentación de la piel, la cual puede ser generalizada, o bien presentarse solo manchas café oscuro

de tamaño variable principalmente en el tronco. También puede haber zonas pequeñas de hipopigmentación o manchas café con leche.

Las malformaciones congénitas se presentan en aproximadamente el 60% de los casos según los datos clínicos de 370 pacientes incluidos en el registro internacional de AF. Entre las malformaciones congénitas más frecuentes se encuentran las anomalías esqueléticas, en las que principalmente están afectados el radio y el pulgar, éste último puede estar ausente, rudimentario, trifalángico o carecer del primer metacarpiano y su ausencia se puede asociar con la falta de radio en uno o en ambos brazos. Otras alteraciones esqueléticas son la microcefalia, micrognatia, microftalmia, cambios en los centros de osificación, adelgazamiento de las falanges, maduración esquelética retrasada y osteoporosis (Auerbach *et al*, 1989).

Algunos pacientes presentan alteraciones renales que consisten en riñones malformados, hipoplásicos o pélvicos, hidronefrosis y/o cistitis renal congénita. En el sexo masculino es frecuente la hipoplasia genital y la criptorquidia. Es común que estos pacientes presenten bajo peso al nacimiento y retraso en el crecimiento.

Por lo general los pacientes no tienen problemas neurológicos, aunque hay algunos que presentan hiperreflexia que puede estar acompañada de retraso mental y también se han presentado pacientes con ptosis, estrabismo, nistagmus y/o sordera (Harris y Hirschhorn, 1989).

Los pacientes con AF tienen alto riesgo de desarrollar neoplasias, la más frecuente es la leucemia mieloblástica aguda,

seguida por la leucemia monoblástica, la eritroleucemia y la leucemia aguda no linfoblástica. A pesar de que la susceptibilidad a cambios malignos está confinada principalmente al sistema hematopoyético, también se ha descrito cáncer del sistema gastrointestinal y carcinoma hepatocelular (Harris y Hirschhorn, 1989; McKusick, 1994). Al menos el 20% de los pacientes desarrollan cancer y el promedio de edades para cada tipo es de 15 años para la leucemia, 16 para los tumores de hígado y 23 para otros tumores, sin embargo muchos pacientes mueren de otras causas antes de que puedan desarrollar cancer (D'Andrea y Grompe, 1997).

2.2 CARACTERÍSTICAS CITOGÉNÉTICAS.

Las células AF presentan inestabilidad cromosómica, la cual se observó por primera vez en 1964 por Schroeder y colaboradores quienes encontraron que en los linfocitos de estos pacientes los cromosomas presentaban de manera espontánea rupturas cromatídicas y figuras de intercambio (Schroeder *et al.*, 1964). Este daño basal se puede incrementar varias veces por tratamiento de las células con agentes alquilantes bifuncionales como la mitomicina-C (MMC), el diepoxibutano (DEB), la mostaza de nitrógeno y el 8-metoxipsoralen activado con luz ultravioleta (8-MOP+UV) entre otros (Sasaki y Tonomura, 1973; Novotná *et al.*, 1979).

La MMC es un agente alquilante bifuncional que requiere de activación metabólica para producir enlaces cruzados entre los oxígenos 6 de dos guaninas adyacentes y genera enlaces cruzados inter e intrahebra en la molécula de ADN, también produce especies

reactivas de oxígeno tales como superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxil los cuales pueden formar aductos por sí mismos sobre el ADN (Gutiérrez, 1979).

La MMC es ampliamente utilizada para inducir aberraciones en células AF, se aplica a concentraciones que van de 10 a 100 ng/ml de cultivo, la cantidad de aberraciones y la sobrevida celular son dependientes de la concentración. La hipersensibilidad de las células AF a la MMC es un marcador para el síndrome, por lo que se utiliza para el diagnóstico de la enfermedad ya que esta característica celular se puede observar antes del establecimiento de la pancitopenia (Cervenka y Hirsch 1983; Frias *et al*, 1984), sin embargo; algunos autores recomiendan hacer el diagnóstico con DEB. Este clastógeno forma los enlaces cruzados entre los nitrógenos 7 de dos guaninas adyacentes en las hebras de ADN, se utiliza a concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 ug/ml de cultivo y produce un incremento significativo de aberraciones cromosómicas con respecto al valor basal y más aún con respecto al incremento producido en células normales (Cervenka y Hirsch 1983).

Las aberraciones cromosómicas más frecuentes del fenotipo celular de AF son las rupturas cromatídicas y las figuras de intercambio, lo que indica que éstas deben ocurrir después de la síntesis de ADN, en las fases S/G2 del ciclo celular. Con menor frecuencia se observan rupturas y fragmentos cromosómicos que también se hacen evidentes si se analizan micronucleos. Otra alteración frecuente que se puede observar en los cultivos de células AF es la alta frecuencia de endorreduplicación (Dutrillaux *et al*, 1979).

2.3 GRUPOS DE COMPLEMENTACIÓN.

Son varios los genes responsables de la AF, esta heterogeneidad genética se puso de manifiesto al estudiar células de diferentes pacientes con AF por construcción de híbridos somáticos haciendo fusión celular con polietilén glicol. Hasta el momento se han encontrado ocho grupos de complementación designados como AF-A a AF-G (Joenje *et al*, 2000) y la división de la AF-D en dos subgrupos: AF-D1 y AF-D2 (Timmers *et al*, 2001).

El primer gen AF clonado fue el del grupo de complementación C (*FANCC*) se localizó en el cromosoma 9q22.3; los ADNc que complementaron el defecto en este grupo, tienen un marco de lectura abierto de 1674 pares de bases que codifican una proteína de 558 aminoácidos, para la cual no se ha encontrado homología con alguna otra proteína conocida. Los estudios de inmunofluorescencia con un antisuero para este polipéptido mostraron que esta proteína se localiza en el citoplasma y el núcleo (Yamashita *et al*, 1994).

El análisis de la estructura de la región codificadora del gen *FANCC* mostró que hay 14 exones con un rango de tamaño de 53 a 204 pares de bases (Gibson *et al*, 1993a) y se han descrito varias mutaciones en el gen:

-La transición de T a C en la base 1661 que resulta en una sustitución de la leucina 554 en prolina (L554P) en el exón 14 (Gavish *et al*, 1993).

-En el exón 6 se encontró una mutación sin sentido que produce el salto de un exón (R185X) y el cambio de asparagina por valina (D195V) (Gibson *et al*, 1993b).

-Un corrimiento de marco de lectura por una delección de G (322delG) en el exón uno y en este mismo exón la sustitución de glicina por un codón de término (Q13X).

-Una mutación en el intrón 4 (IVS4+4AaT) que afecta un sitio de corte y empalme del ARNm del gen, esta mutación es la más frecuente entre los individuos que pertenecen a este grupo de complementación (Verlander *et al*, 1994).

Mas tarde, se localizó el gen del grupo de complementación A sobre el cromosoma 16q24.3 por análisis de ligamiento, (Pronk *et al*, 1995) y se aislaron los cDNA correspondientes al gen, el cual tiene un marco de lectura abierto de 4365 pares de bases que codifica para una proteína de 1455 aminoácidos con dominios de localización nuclear (Lo Ten Foe *et al*, 1996).

El gen *FANCA* tiene 43 exones de 34 a 188 pares de bases, en clonas de cDNA se observaron tres eventos de corte y empalme, que resultan en la pérdida del exón 37, en una delección de 23 pares de bases en la región 5' del exón 41 y una inserción GCAG en el extremo 3' también del exón 41 (Ianzano, *et al*, 1997). El análisis de polimorfismos conformacionales de una sola hebra de DNA de 97 pacientes no relacionados con mutación en el gen *FANCA* dio 85 bandas variantes, 45 probablemente son polimorfismos benignos, y los 40 restantes pueden ser mutaciones patogénicas, 17 de estas son microdelecciones/microinserciones asociadas con secuencias repetidas

cortas, por lo que se sugiere que este gen es hipermutable y que el mecanismo principal generador de mutaciones es el de mal apareamiento por deslizamiento de hebra (Levran *et al*, 1997).

El grupo de complementación AF-D se encontró por transferencia cromosómica mediada por microcélulas, había complementación del fenotipo celular cuando las clonas tenían el cromosoma 3 humano, específicamente la región entre 3p22 y 3p26 (Whitney *et al*, 1995). El análisis de mutaciones de este gen entre líneas designadas para el grupo de complementación D mostró heterogeneidad, ya que mientras en la línea PD20 se presentaron mutaciones bialélicas, no se observó ninguna en la línea HSC62 y al realizar fusión celular hay complementación entre las dos líneas, por lo anterior a la línea HSC62 se le designó *FANCD1* y a la línea PD20 *FANCD2*, el gen clonado de esta última codifica para una proteína nuclear de 1451 aminoácidos y tiene dos isoformas, (Timmers *et al*, 2001).

El gen *FANCE* del grupo AF-E se encontró en el cromosoma 6p21-22, el gen aislado codifica una proteína de 536 aminoácidos con dos regiones potenciales de localización nuclear (De Winter *et al*, 2000a).

FANCF del grupo AF-F se localizó en el cromosoma 11p15 y codifica un polipéptido de 374 aminoácidos con homología a una proteína procarionte de unión a RNA (De Winter *et al*, 2000b).

El gen *FANCG* del grupo AF-G, se localizó en el cromosoma 9p13 y es idéntico al gen *XRCC9* (De Winter *et al*, 1998). La proteína codificada por este gen se localiza en citoplasma y núcleo, forma un complejo molecular con la proteína *FANCA*, *in vivo* e *in vitro*. El

complejo FANCA/FANCG está presente en células normales y de los grupos D y E, no se encuentra en los grupos A y G, y esta en niveles bajos en los grupos B, C y F (Waisfisz *et al*; 1999).

Aunque se han clonado seis genes responsables de la AF, de los ocho grupos de complementación descritos hasta la fecha, la función de las proteínas que codifican aún se desconoce. Las evidencias muestran que FANCA, FANCC y FANCG, forman un complejo que se localiza en la matriz nuclear y en la cromatina y el tratamiento con MMC resulta en un incremento de estas proteínas (Qiao *et al*, 2001); también se encontró que las proteínas FANCE y FANCF participan en el complejo mencionado (Medhurst *et al*, 2001). Este complejo nuclear se puede observar intacto en células del grupo de complementación D, lo que indica que FANCD2 y probablemente FANCD1 participan después de las otras proteínas AF conocidas, la proteína FANCD2 colocaliza y coprecipita con la proteína de cáncer de mama 1 (BRCA1) implicada en vías de respuesta a daño al ADN (García-Higuera *et al* 2001).

La prevalencia de los diferentes grupos de complementación en un estudio de 245 pacientes AF de diferentes nacionalidades y analizados por al menos dos de las siguientes técnicas: fusión celular, detección de al menos un alelo mutante, y ausencia de la proteína FANCA, FANCF o FANCG sobre Western Blot, mostró que el 70.2% pertenecen al grupo AF-A, 0.4% al grupo AF-B, 13.9% al grupo AF-C, 1% al grupo AF-D, 2% al grupo AF-E, 2.5% al grupo AF-F y 9.8% al grupo G (Faivre *et al*, 2000).

La correlación entre el grupo de complementación AF y las alteraciones clínicas y predisposición a cáncer, mostró que el grupo G era el más afectado y con mayor riesgo al desarrollo de neoplasias (Favre, 2000).

2.4 OTRAS ALTERACIONES DEL FENOTIPO CELULAR AF

El defecto básico en la AF se desconoce hasta la fecha, una de las primeras propuestas debido a las características citogenéticas mencionadas con anterioridad ha sido la de una falla en la reparación del ADN. (Poon *et al*; 1974; Fujiwara *et al*; 1977; Dutrillaux *et al*; 1979), sin embargo el fenotipo celular de AF presenta otras alteraciones y se desconoce como una falla en reparación podrían llevar a ellas, por lo que hay varias propuestas del defecto básico.

SENSIBILIDAD A RADICALES LIBRES

Algunos autores han encontrado hipersensibilidad de las células AF a los radicales libres de oxígeno comparadas con las células normales (Joenje *et al*, 1981; Dallapiccola *et al*, 1985; Schindler y Hoehn, 1988).

Los agentes que dañan el ADN y que son dependientes de oxígeno son: el radical libre superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical libre hidroxilo y el oxígeno no molecular. Estos radicales se forman como resultado del metabolismo normal del oxígeno y pueden producir daño cromosómico ya sea por interacción directa con la cromatina o por iniciar lipoperoxidación cuyos productos interactúan

con la cromatina, o bien por interferir con las enzimas de reparación del ADN directamente o a través de los productos de lipoperoxidación.

En condiciones normales los sistemas de defensa antioxidantes de la célula, que consisten en enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasa y atrapadores de radicales libres de bajo peso molecular, evitan la acumulación de los productos del metabolismo del oxígeno y protegen el genoma aún en condiciones hiperoxigénicas moderadas, lo cual no ocurre en las células AF (Nordenson, 1978, Guille *et al*, 1987).

Joenje y colaboradores en 1981, observaron que en linfocitos AF de cuatro pacientes, hay una correlación positiva de la frecuencia de aberraciones cromosómicas con la tensión de oxígeno. Además se han encontrado pacientes de AF con deficiencia de SOD, esto sugirió que la condición de AF podría estar relacionada con una deficiencia en esta enzima, sin embargo al adicionar SOD a células en cultivo, se reducen las rupturas espontáneas e inducidas con MMC tanto en células normales como de AF, y la adición de catalasa a los cultivos de AF produce una mayor reducción del daño cromosómico que lo observado con SOD (Sudharsan y Haddle, 1980).

Por los hallazgos anteriores se sugirió que el defecto básico en las células de AF radicaba en su incapacidad de eliminar los radicales libres de oxígeno, sin embargo en líneas celulares de AF inmortalizadas, la sensibilidad a radicales libres se pierde, conservándose la hipersensibilidad a la MMC (Saito *et al*, 1993).

ALTERACIONES DEL CICLO CELULAR

Una característica inherente de las células AF es su tránsito lento por la fase G2 del ciclo celular (Dutrillaux *et al*, 1982; Kubbies *et al*, 1985), este detenimiento en la fase G2 es más evidente cuando las células se tratan con agentes alquilantes bifuncionales como la MMC y el DEB; esta característica es tan constante que se ha sugerido para establecer el diagnóstico AF (Seyschab *et al*, 1995).

El defecto en la progresión del ciclo celular por la pausa prolongada de las células en fase G2 y la reducida proliferación celular en AF llevó a la propuesta de que hay una falla en el ciclo celular, específicamente en el punto de restricción G2/M; sin embargo no se ha demostrado un mecanismo alterado en este punto de restricción (Johnstone *et al*, 1997; Heinrich *et al*, 1998).

El polipeptido FANCC probablemente tiene alguna participación en la regulación del ciclo celular, la expresión de este se incrementa al final de la fase S, alcanza su máximo en G2/M y declina durante la mitosis. La mayor cantidad de FANCC en la célula coexiste con la mayor cantidad de cdc2 fosforilada y por coimmunoprecipitación, se encontró que la proteína no mutada se une a cdc2. La proteína FANCC normal, se une a cdc2 por la región carboxilo terminal y corrige la anomalía en G2 del ciclo celular, sin embargo aún no se conoce la finalidad de esta unión (Kupfer *et al*, 1997).

En células eucariontes varios agentes que causan daño al ADN determinan que la célula se detenga en la fase G2, lo cual está mediado por el complejo de ciclina B1/cdc2 que funciona en un mecanismo de retroalimentación dependiente de daño al ADN en el

punto de restricción G2-M, ya que se requiere de la integridad del material genético antes de progresar a mitosis. En las células AF que presentan un tiempo largo en G2, probablemente por una falla en la reparación del ADN la unión FANCC/cdc2 podría tener un papel en el retraso del ciclo celular (Kruyt *et al*, 1997).

También se han encontrado alteraciones en la fase de síntesis del ADN en las células AF. Classen y colaboradores estudiaron la síntesis de ADN en fibroblastos de pacientes con AF y normales; encontraron que con 12 ng de MMC, no hubo efecto en la síntesis replicativa del ADN en células normales, mientras que en los fibroblastos de AF se redujo la síntesis aún después de 24 y 48 horas del tratamiento con el mutageno. Esta reducción se debió a un decremento en el número de células que entraron a fase S, ya que la timidina tritiada incorporada por las células que sintetizaron ADN fue la misma en todas las muestras. Los autores señalaron que la disminución de la síntesis replicativa por MMC no se debió a un efecto de inhibición por las lesiones no reparadas, sino a un bloqueo en la progresión del ciclo celular (Classen *et al*, 1986).

En cultivos de células de AF tratadas con 8-MOP+UV; la tasa de síntesis semiconservativa empieza a recuperarse 4 horas después del tratamiento, las células normales y las de la línea AF-B se recuperan totalmente a las 10 horas, mientras que las células de AF-A en este mismo tiempo no muestran recuperación (Moustacchi *et al*, 1987).

En otro estudio del ciclo celular realizado con la línea AF-C y una línea normal, se utilizaron diferentes concentraciones de MMC para producir la misma cantidad de daño sobre el ADN de las dos líneas

celulares y se encontró que después del tratamiento con MMC había cantidades equivalentes de células en fase G2/M en ambas líneas, por lo que la prolongada pausa de las células de AF después del tratamiento con agentes alquilantes es un resultado secundario al daño excesivo causado por estos agentes y no una falla en el punto de restricción G2/M. Aunado a esto se observó que en los cultivos de AF había una disminución significativa de células en fase S y un ligero incremento en G1/S, mientras que las células normales, presentaron una acumulación en fase S y una reducción significativa de células en G1/S. Sin embargo al investigar una posible falla en el punto de restricción de la fase S con la ayuda de HU que inhibe la formación de dNTPs necesarios para la síntesis de ADN, no se encontró alteración ya que se acumulan igual número de células en fase G1/S en células de AF-C y normales tratadas con HU (Heinrich *et al*, 1998).

Sala-Trepat y colaboradores observaron la transición del ciclo celular en células normales y en cuatro grupos de complementación AF (A,B,C,D1), después del tratamiento con 8-MOP+UV, las células normales detienen su progresión por la fase S, mientras que las células AF son ineficientes para detenerse en fase S y la síntesis continúa a pesar de la presencia de daño. El hecho de que la replicación no se detenga indica que debe haber síntesis sobre la hebra del ADN antes y después del daño, lo que lleva a la acumulación de brechas y rupturas que aún pueden ser reparadas en la fase G2, así la acumulación de las células AF en la fase G2 sería una consecuencia del control ineficiente observado durante la transición por la fase S (Sala-trepat *et al*, 2000).

En un análisis realizado mediante autorradiografía, se analizó la síntesis replicativa después del tratamiento con 8-MOP+UV y se encontró que las células normales disminuyen la incorporación de T3H y las células AF (grupos A;B;C y D1) no, lo que indicó que las células AF presentan "Síntesis de ADN resistente a daño", particularmente la falla para detener o retrasar la síntesis de ADN replicativa se da por agentes alquilantes bifuncionales (Centurion *et al*, 2000).

ALTERACION DE CITOCINAS.

La adición de IL6 al medio de cultivo también aumenta la resistencia de las células AF a la citotoxicidad de la MMC, y se ha observado que la liberación de esta interleucina al medio es baja en células AF, sin embargo al adicionar un anticuerpo anti-IL6 al medio condicionado por células normales y probar su efecto sobre células AF, se observó que no se inhibe completamente la protección por lo que debe haber otros factores que contribuyen a ella en el medio condicionado normal (Rosselli *et al*, 1992).

Además de esta baja producción de IL6, hay una sobreproducción del factor de necrosis tumoral alfa, ambas citocinas tienen un papel tanto en el control de mecanismos del desarrollo como en la respuesta del organismo a situaciones de estrés como infecciones, daño celular y cáncer (Roselli *et al*, 1994).

ALTERACIONES EN APOPTOSIS

Las células de AF tienen una frecuencia de muerte celular espontánea ligeramente más elevada que la observada en células normales. En las líneas celulares AF-C y D, la proteína p53 involucrada en el control de la apoptosis está reducida después de tratar a las células con radiación gamma, MMC o UV-B (Rosselli *et al*, 1995).

Las caspasas son proteínas que median la respuesta de apoptosis y se encontró que la actividad de la caspasa 3 está alterada en AF, no por escasez de proteína sino porque su activación no se realiza adecuadamente; la proteína FANCC actúa como interruptor en un paso anterior a la activación de las caspasas que llevan a la célula a apoptosis (Guillouf *et al*, 1999).

El fenotipo celular alterado en AF puede complementarse o aproximarse a la normalidad por tres mecanismos comunes: uno es la cocultivación de células normales con células AF tratadas con MMC, donde se observa restauración parcial de la cantidad de aberraciones cromosómicas que se producen por este agente en las células de AF (Zakrzewski y Sperling, 1980; Carnevale y Frias, 1985); otro mecanismo es por adición de medio condicionado por células normales, esto disminuye la hipersensibilidad al efecto citotóxico producido por MMC en células AF y produce disminución de las aberraciones cromosómicas (Frias *et al*, 1992; Rosselli *et al*, 1992). Por último, en nuestro laboratorio se ha observado que la adición de plasma normal corrige parcialmente la frecuencia de aberraciones cromosómicas causadas por MMC en células de AF (Carnevale y Frias, 1985; Frias *et al*, 1986). El mecanismo por el cual se

complementan las células de AF se desconoce, podría ser a través de las citocinas que liberan las células normales o algún otro factor como dNTPs.

ALTERACION EN LA RESERVA DE dNTPs.

Se ha probado que la adenina incrementa significativamente la sobrevivencia de las células AF después del tratamiento con MMC y no tiene ningún efecto sin MMC, inclusive con altas concentraciones de adenina que ya son tóxicas para las células normales y producen incremento del daño causado por la MMC, en las células AF aún conserva el efecto de incrementar la sobrevivencia celular, esto sugiere un requerimiento preferencial de purinas en AF. Además, se ha observado que las células AF son más sensibles a la acción citotóxica de los análogos de purina 6-MP y 6TG, esta acción citotóxica puede ser el resultado de una mayor incorporación de estos análogos en el ADN de la células AF. Esta alteración en la reserva de purinas puede estar relacionada con el defecto bioquímico básico de AF (Frazelle *et al*, 1981).

El requerimiento de purinas por las células AF es más marcado cuando está dañado su ADN, esto está acorde con la hipótesis de que el defecto básico en AF está en la reparación del ADN, ya que las purinas son sustratos y recursos de energía en este proceso.

La adenosina puede incrementar la reparación de lesiones en el ADN, lo que sugiere que la deficiencia pudiera estar relacionada con un nivel bajo de ATP, sin embargo el análisis bioquímico no lo demuestra y sí se ha demostrado que las células AF tienen niveles

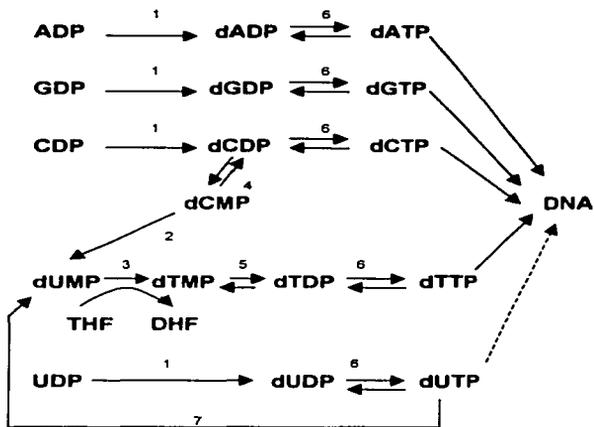
menores de NAD⁺ con respecto a los cultivos normales. Es probable que el nivel bajo de NAD⁺ derive de una alteración en su vía de síntesis la cual pudiera ser temporalmente mejorada por el incremento en el nivel de ATP al tratar a las células con adenosina (Berger *et al*, 1982), ya que en células de AF la adenosina disminuye la frecuencia de aberraciones cromosómicas en más del 50% y la niacinamida también produce disminución pero en menor proporción (Pincheira y López, 1988).

La síntesis de ADN tanto de reparación como de replicación dependen en gran medida de la concentración de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) por lo que la alteración de la cantidad de purinas podría traer fallas en ambos mecanismos (Kundel *et al*, 1982).

2.5 SINTESIS DE DESOXIRRIBONUCLEOTIDOS

La producción de dNTPs está estrictamente regulada y se puede dar por síntesis *de novo* y de rescate de productos de degradación.

En la síntesis *de novo* participan varias enzimas: la ribonucleótido reductasa (RR), la dCMP desaminasa, la timidilato sintetasa, la dUTPasa y las desoxirribonucleótido cinasas (Figura 1).



- 1 Ribonucleótido reductasa
 - 2 dCMP deaminasa
 - 3 dTMP sintetasa
 - 4 CMP cinasa
 - 5 Timidilato cinasa
 - 6 Nucleósido difosfato cinasa
 - 7 dUTPasa
- THF, tetrahidrofolato; DHF dihidrofolato.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 1. Síntesis *de novo* de los desoxirribonucleótidos

Los dNTPs se sintetizan a partir de ribonucleótidos difosfato por reducción del carbono 2 del azúcar y las enzimas que catalizan esta reacción son llamadas ribonucleótido reductasas y se conocen tres tipos:

1. Las que contienen Fe (III) no hemo en su sitio activo.
2. Las que utilizan cofactores 5-desoxiadenosilcobalamina (coenzima B12) y
3. Las dependientes de manganeso.

Las 3 se encuentran en procariontes y con excepción de especies unicelulares, todos los eucariontes tienen la variedad uno (Reichard, 1988).

Las síntesis de los cuatro dNTPs en las cantidades requeridas para la síntesis de ADN se logra por un mecanismo de retroalimentación ya que el mantenimiento de las cantidades intracelulares de dNTPs es esencial para el crecimiento normal de la célula. Una alteración en el balance es mutagénico, ya que la probabilidad de que un dNTP sea incorporado erróneamente en la cadena creciente de ADN se incrementa con su concentración relativa a los otros dNTPs (Reichard y Ehernberg, 1983).

La cantidad específica de dNTP en la célula no ha sido bien establecida ya que los reportes de varios laboratorios son diferentes incluso con la misma línea celular. Las variaciones en la concentración dependen del estado del ciclo celular en el que se encuentre la célula. Hay mayor cantidad en S y G2 y menos en G0, usualmente hay mas pirimidinas que purinas. Los dNTP se sintetizan en el citoplasma (la

localización de la RR es citoplásmica), y deben entrar al núcleo antes y durante la fase S, la envoltura nuclear no tiene barreras para ellos y además tiene proteínas que se unen a ellos con alta afinidad (Reichard, 1988).

2 RIBONUCLEOTIDO REDUCTASA

La enzima Ribonucleótido Reductasa (RR) tiene una estructura general de α_2, β_2 donde las α_2 son dos subunidades idénticas denominadas M1 en eucariontes y B1 en bacterias. Las β_2 llamadas M2 y B2 en los organismos correspondientes, forman un dímero cuya secuencia de aminoácidos demuestra un alto grado de homología en varias especies incluyendo eucariontes, bacterias y virus ya que es el que contiene el centro de radical tirosil hierro necesario para la actividad de la enzima.

Le enzima que mejor se conoce es la de E. coli, en la cual las dos subunidades B1 (160Kd) y las dos B2(78Kd) juntas forman el sitio activo de la enzima. Cada subunidad B1 contiene un par sulfhidrilo con actividad redox y 2 sitios de unión a efectores independientes que controlan la actividad catalítica de la enzima y la especificidad al sustrato. Cada una de las subunidades B2 tienen un Fe III no hemo y juntas forman un grupo Fe-O-Fe que interactúa con la tirosina 122 sobre una de la subunidades B2 para formar un radical libre tirosil poco usual, por eso la enzima tiene solo un sitio catalítico activo (Voet y Voet, 1990).

El mecanismo de reacción de RR ocurre vía un proceso mediado por el radical libre en el cual los equivalentes reducidos se suplen por formación de un enlace disulfuro en la enzima; un aspecto importante de la enzima es su habilidad para mantener normalmente el estado de radical altamente reactivo indefinidamente.

La actividad de la enzima puede inhibirse con hidroxiourea (HU) pero se puede restaurar *in vitro* por la simple adición de Fe II y ácido ascórbico en presencia de oxígeno, sin embargo *in vivo* la regeneración del radical requiere de 4 proteínas y de oxígeno:

1. Flavin oxidoreductasa dependiente de NADPH, la cual participa en la generación del radical tirosil y libera al ión superóxido.
2. Superóxido dismutasa que elimina el radical superóxido.
3. Catalasa para completar el proceso de detoxificación del radical oxígeno por convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
4. Una proteína cuya función se desconoce pero que puede ser reemplazada *in vitro* por Fe II (Voet y Voet, 1990).

2.7 HIDROXIUREA

La HU se sintetizó en 1869 y al probarse en animales produjo leucopenia, anemia y muerte; posteriormente se demostró su actividad en varios tumores por su habilidad para inhibir la síntesis de ADN y por su efecto sinérgico con otras drogas anticancerígenas. Las células expuestas a este agente, progresan en su ciclo celular y se acumulan en fase S, de tal forma que a las 24 horas se puede encontrar el 86%

en fase S, y pueden detenerse en esta fase hasta que mueren (Yarbro, 1992).

Específicamente, la HU destruye el radical tirosil de la RR por lo que se ha utilizado como herramienta para estudiar el efecto del decremento de dNTPs sobre la síntesis de ADN, al interaccionar la HU con la RR, detiene la síntesis de ADN a los pocos minutos, principalmente produce disminución de los nucleótidos de purina ya que el dTTP se puede incrementar (este incremento no se da por aumento en la síntesis de este nucleótido sino como resultado del bloqueo de su utilización y la importación de éste). Los cultivos celulares con tratamiento prolongado de HU pueden producir resistencia a la droga por el incremento de la actividad del dímero M2, ya sea por aumento de transcripción y/o por amplificación génica (Yarbro, 1992).

Durante la síntesis de ADN, la célula debe ir formando *de novo* los dNTPs, por lo cual en presencia de la HU se inhibe fuertemente este proceso, con respecto a la reparación hay reportes que sugieren que la HU no produce efecto y otros contradictorios, dependiendo de las condiciones experimentales ya que para reparar poco daño los precursores preexistentes pueden ser suficientes (Friedberg y Hanawalt, 1981).

La inhibición de la síntesis de ADN por HU tiene varias consecuencias: transporte de dNTPs del medio al interior de la célula, decremento de purinas, aparición de hebras cortas de ADN similares a los fragmentos de Okasaki (al tratarse las células con este agente en

fase S), muerte celular y rupturas en el ADN maduro que se asume inducen procesos de reparación en el ADN (Reichard, 1988).

3 JUSTIFICACION:

En trabajos previos realizados en el laboratorio de citogenética del Instituto Nacional de Pediatría se encontró que el plasma humano normal disminuyó la frecuencia de aberraciones cromosómicas de linfocitos de pacientes AF tratados con MMC. Esta disminución podría deberse ya sea a que el plasma contiene factores que participan en la reparación del ADN o bien, que promueven la división celular y hacen que proliferen las células con menor daño. Por otra parte existen evidencias de que las células AF presentan disminución del daño al adicionarles dNTPs, esto puede indicar un desequilibrio en la reserva de nucleótidos y la adición de plasma permite aminorar esta falla, sin embargo para estudiar una posible alteración en la reserva de dNTPs es adecuado utilizar la HU porque interfiere con la función de la RR que es la enzima encargada de la síntesis de los dNTPs. Dado que la disminución del daño producido por la MMC al adicionar plasma a los cultivos AF se observó en metafase, en este trabajo se determinará en la fase S del ciclo celular la respuesta a la MMC, al plasma y a la HU.

4 OBJETIVO

Investigar el efecto de la adición de HU y de plasma humano normal en la síntesis replicativa de ADN de cultivos de linfocitos AF tratados con MMC.

5 HIPOTESIS

5.1 Si las células AF son más sensibles a la acción de la HU que las células normales, entonces el número de células en síntesis de ADN será significativamente menor en cultivos AF comparado con los cultivos de células normales.

5.2 Si el plasma humano normal, es capaz de corregir el daño conferido por MMC y/o HU, entonces se observará una recuperación del número de células con síntesis de ADN cuando se adiciona plasma normal.

6 METODOLOGIA:

6.1 POBLACION DE ESTUDIO

Se estudiaron cuatro pacientes con diagnostico clínico y citogenético compatible con AF:

El paciente 1: femenino de 14 años, inició la pancitopenia a los 8 años de edad, presenta hipoplasia de pulgar izquierdo, hipoplasia renal y talla normal; En el estudio citogenético se encontraron 0.72 aberraciones cromosómicas por célula (ab/cel) como basal y 5.8 ab/cel con 80 ng de MMC.

El paciente 2: femenino de 12 años de edad, con pancitopenia desde los 6 años, presenta microcefalia, luxación congénita de cadera, hiperlordosis lumbar, xifoescoliosis, hiperpigmentación de la piel y retraso en el crecimiento. El estudio citogenético mostró una frecuencia basal de 0.2 ab/cel y con 80 ng de MMC 6.05 ab/cel.

El paciente 3: masculino de 18 años, hermano de la paciente 2, inició la pancitopenia a los 10 años, presenta microcefalia, hipoacusia, hiperpigmentación de la piel, manchas café con leche y talla baja. Citogenéticamente presentó 0.52 ab/cel y con 80 ng de MMC 6.62 ab/cel.

El paciente 4: masculino de 4 años, con hipoplasia radial bilateral, ausencia de pulgar izquierdo, retraso psicomotor moderado y talla baja. A nivel citogenético se reportaron 1.2 ab/cel y con 40 ng de MMC 2.26 ab/cel, con 80 ng de MMC no hubo proliferación del cultivo celular.

Se incluyeron también a cuatro adultos jóvenes sanos que colaboraron voluntariamente con el estudio, NL-1 y NL-2 mujeres y los NL-3 y NL-4 varones.

6.2 CULTIVO DE LINFOCITOS

Se obtuvo muestra de sangre periférica con una jeringa previamente heparinizada de los cuatro pacientes con AF y de los cuatro individuos normales. De cada sujeto se hicieron 32 cultivos de linfocitos en tubos estériles de 11 ml con 4.5 ml de medio McCoy's 5A modificado (GIBCO), 0.1 ml de fitohemaglutinina (GIBCO), 0.02 ml de antibiótico (penicilina-estreptomicina) (GIBCO) y 0.4 ml de sangre, se incubaron a 37°C.

Los cultivos de cada individuo se dividieron en dos grupos: con MMC y sin MMC.

A cada uno de los 16 cultivos del primer grupo se les agregaron 40 ng/ml de MMC (Sigma), a las 24 horas de incubación y a las 48 horas se lavaron dos veces con solución isotónica de NaCl al 0.9% para tener un tratamiento de 24 horas con MMC. Se reincubaron con cuatro diferentes tratamientos:

1. Cuatro tubos con 5 ml de medio McCoy's.
2. Cuatro tubos con 5 ml de medio McCoy's más HU [0.002 M] (Amersham).
3. Cuatro tubos con 4.5 ml de medio McCoy's y 0.5 ml de plasma humano normal fresco.

4. Cuatro tubos con 4.5 ml de medio McCoy's más HU [0.002M] y 0.5 ml de plasma humano normal.

Los 16 cultivos del segundo grupo aunque no tenían MMC, también se lavaron a las 54 horas con solución isotónica una sola vez y se reincubaron en las mismas condiciones que los anteriores.

6.3 COSECHA

Se realizaron cosechas de cada tratamiento a las 6, 12, 18 y 24 horas después de la reincubación; dos horas antes de cada cosecha se dio un pulso de 1 uCi/ml de timidina metil 3H (T3H) con una actividad de 6.70 Ci/mmol (Amersham).

Una vez transcurrido el tiempo de T3H, se centrifugaron los cultivos a 400 g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante, se incubó el paquete celular 10 minutos con solución hipotónica de KCl 0.075 M (Merck), se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se fijó el paquete celular con metanol - ácido acético 3:1 (Merck), se dejaron reposar 10 minutos después de los cuales, se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante tantas veces como fue necesario hasta obtener un paquete celular blanco y el sobrenadante transparente.

Las laminillas se prepararon por goteo del material celular en portaobjetos fríos y se dejaron secar al aire.

6.4 AUTORADIOGRAFIA

En un cuarto oscuro con luz roja de seguridad (Filtro Kodak Wratten No. 2 con bombilla de 15 volts) se fundió la emulsión

fotográfica NTB 2 (Kodak) en baño María a 40°C, se preparó una solución 1:1 de NTB 2 y agua destilada tibia, se sumergieron las laminillas con el material celular en esta solución una por una por 2 o 3 segundos, se dejaron secar al aire y se guardaron a 4°C en la oscuridad por 7 días.

Revelado y fijación:

En el cuarto oscuro, se colocaron las laminillas en revelador D19 (Kodak) por 3 minutos, se transfirieron a un baño de paro (ácido acético 1.79% y sulfato de sodio anhidro 4.5%) por 3 minutos y luego a fijador ácido (Kodak), se dejaron 3 minutos y se lavaron en agua corriente por 10 minutos. Las laminillas se tiñeron con Giemsa (Merck) al 10% en amortiguador de fosfatos pH 6.8 durante 3 minutos.

6.5 ANALISIS

Las laminillas fueron codificadas por una persona ajena al estudio para hacer el análisis en ciego. Se contaron 2000 núcleos para cada tipo de tratamiento, por cada tiempo de cosecha y por individuo. Los núcleos marcados con gránulos de plata indicaron la incorporación de T3H por síntesis de ADN y se consideraron marcados aquellos que por lo menos tuvieran el doble de marca que la observada de fondo en una área igual a la ocupada por el núcleo.

Para comparar los resultados del número de núcleos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) múltiple tipo III con tres factores: 1) estado de salud (AF o normal); 2) tratamientos (testigo, plasma, MMC, MMC+ plasma, HU, HU+ plasma, MMC+HU, MMC+HU+ plasma) y 3) tiempo de cosecha (6, 12, 18 y 24). Las comparaciones particulares de

pares de tratamientos se realizaron por medio de la prueba de Student-Newman-Keuls, donde se utilizó el valor de LSD (diferencia mínima significativa) obtenido de la ANOVA (Sokal y Rohlf 1969).

7 RESULTADOS

El análisis se realizó en 2000 núcleos de cada tratamiento y se registraron solo aquellos que tenían marca por incorporación de T3H, la marca nuclear fue principalmente de dos tipos, una marca densa en donde el núcleo quedó cubierto completamente por los gránulos de plata y una marca escasa, donde los gránulos de plata se observan dispersos. Los cultivos con HU solo presentaron núcleos con esta última marca tanto en células normales como de AF (figura2).

7.1 CULTIVOS TESTIGOS

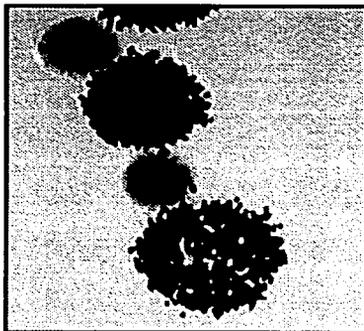
En los cultivos sin tratamiento el número de núcleos marcados no fue significativamente diferente entre cada tiempo de cosecha y representó aproximadamente el 50% de las células analizadas. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre las curvas formadas por los datos de las cuatro cosechas de cultivos AF y los normales (cuadro1).

7.2 TRATAMIENTO CON MMC

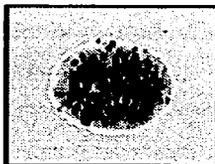
En cultivos normales con MMC se observó una curva sin variación en los cuatro tiempos de cosecha, lo que indica que la MMC no tiene efecto en la tasa de síntesis de las células normales.

En los cultivos AF se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) del número de células marcadas por síntesis de ADN, esta disminución fue de aproximadamente 8% en la cosecha de 6 horas y alcanzó un 54% en la cosecha de 24 horas (cuadro 2, figura 3).

A



B



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Tipos de núcleos observados tanto en células normales como de AF.

A) núcleos sin marca que no tuvieron síntesis de ADN y núcleos densamente marcados por incorporación de la timidina tritiada durante la síntesis del ADN, esta marca fue típica de cultivos sin HU.

B) núcleo con escasa marca característica de cultivos con HU.

COSECHA

	NL 1	NL 2	NL 3	NL 4	Prom.	\pm	σ
6 hs	942	210	876	853	720	\pm	342.3
12 hs	941	478	974	1039	858	\pm	256.6
18 hs	1090	950	944	1098	1020	\pm	85.0
24 hs	1067	992	964	1011	1008	\pm	43.5
	AF 1	AF 2	AF 3	AF 4	Prom.	\pm	σ
6 hs	975	915	707	847	861	\pm	115.2
12 hs	824	784	906	946	865	\pm	74.1
18 hs	923	1067	998	1067	1013	\pm	68.7
24 hs	956	1088	1065	941	1012	\pm	74.7

Cuadro 1; No. de núcleos con marca obtenidos de los cultivos testigo, no hay diferencia significativa entre los individuos, ni entre los tiempos de cosecha, ni entre cultivos normales y de AF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COSECHA

	NL 1	NL 2	NL 3	NL 4	Prom.	σ
6 hs	866	875	854	1080	919	\pm 107.8
12 hs	995	872	1025	926	954	\pm 68.9
18 hs	964	912	955	1018	962	\pm 43.5
24 hs	1018	880	915	862	919	\pm 69.7
	AF 1	AF 2	AF 3	AF 4	Prom.	σ
6 hs	734	957	708	780	795	\pm 112.2
12 hs	710	765	610	648	683	\pm 68.3
18 hs	639	994	507	536	669	\pm 223.9
24 hs	501	769	161	432	466	\pm 249.8

Cuadro 2; No. de núcleos con marca obtenidos de los cultivos de linfocitos tratados por 24 horas con MMC, el tiempo de cosecha representa las horas después de retirar la MMC. Hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cultivos normales y de AF.

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

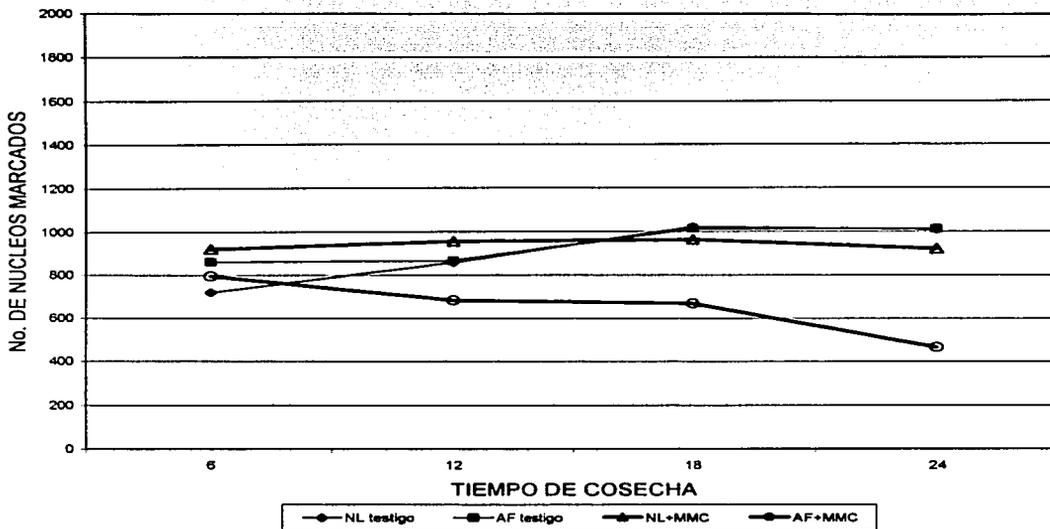


Figura 3. Efecto de la MMC: En los cultivos AF se observa una disminución significativa ($p < 0.05$) del número de núcleos que incorporaron T3H por síntesis de ADN comparados con los núcleos obtenidos en los cultivos testigos y con los observados de cultivos normales, ya que la MMC no afectó la tasa de síntesis de las células normales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.3 TRATAMIENTO CON HU

Se observaron dos efectos, uno sobre la densidad de marca y otro sobre el número de núcleos marcados. La HU produjo una evidente disminución de la densidad de marca, esta escasa incorporación de T3H indicó que las células empezaron la síntesis y pararon, esto se observó tanto en linfocitos de individuos normales como AF (figura 2B).

En cuanto al número de núcleos marcados en cultivos de células normales hubo una ligera variación no significativa con respecto a la curva sin tratamiento probablemente debida al bloqueo de la síntesis, mientras que en los cultivos de células AF se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) en el número de núcleos marcados, que a las 6 horas fue del 90% y en la cosecha de 24 horas aún permanecía con un 34% de disminución con respecto al cultivo sin tratamiento (cuadro 3, figura 4).

7.4 TRATAMIENTO CON PLASMA HUMANO NORMAL.

La adición de plasma humano normal a los cultivos produjo un incremento en el número de núcleos que realizaron síntesis de ADN comparados con el cultivo testigo, tanto en células normales como de AF y fue estadísticamente significativo solo en células normales ($p < 0.05$) (cuadro 4, figura 5).

COSECHA

	NL 1	NL 2	NL 3	NL 4	Prom.		σ
6 hs	510	617	723	645	624	±	88.1
12 hs	745	968	1113	881	927	±	154.4
18 hs	886	1317	1242	1081	1131	±	191.0
24 hs	813	1056	1193	993	1013	±	157.7
	AF 1	AF 2	AF 3	AF 4	Prom.		σ
6 hs	19	238	55	19	83	±	104.9
12 hs	311	542	392	187	358	±	148.8
18 hs	745	912	472	90	555	±	359.0
24 hs	817	1147	553	140	664	±	425.7

Cuadro 3; No. de núcleos con marca obtenidos de los cultivos de linfocitos tratados con HU, el tiempo de cosecha representa las horas de tratamiento con esta sustancia, hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cultivos normales y de AF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

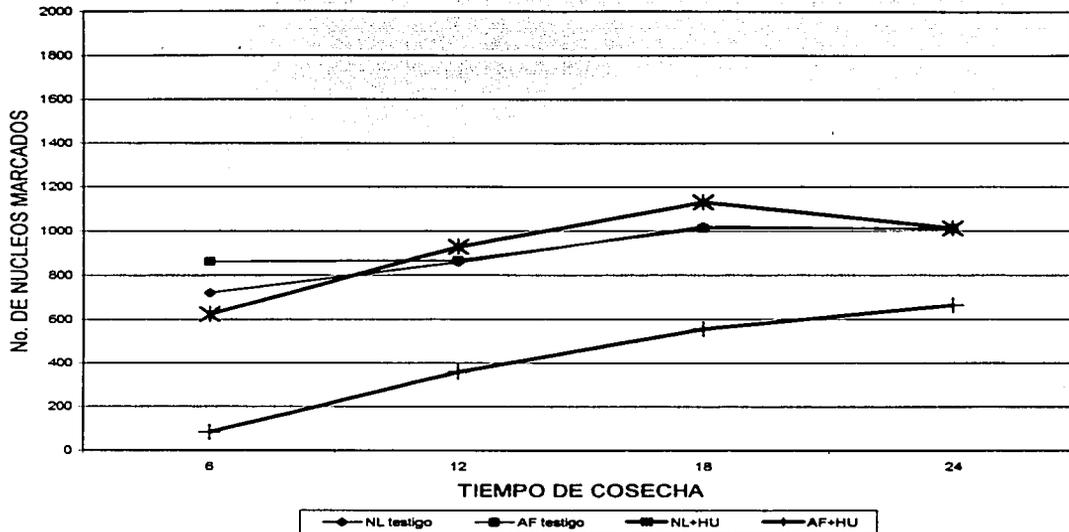


Figura 4. Efecto de la HU: la tasa de síntesis de las células normales no se afecta con la HU, mientras que las células de AF muestran sensibilidad a esta, ya que disminuye significativamente ($p < 0.05$) el número de núcleos que entraron a la fase S, con respecto a los cultivos testigos y a los normales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COSECHA	NL 1	NL 2	NL 3	NL 4	Prom.	σ
6 hs	1071	844	1075	650	910	\pm 204.2
12 hs	1237	870	1162	923	1048	\pm 178.9
18 hs	1274	1069	1207	880	1107	\pm 174.0
24 hs	1276	1086	1091	952	1101	\pm 133.1
	AF 1	AF 2	AF 3	AF 4	Prom.	σ
6 hs	900	950	627	948	856	\pm 154.6
12 hs	1071	967	878	1011	982	\pm 81.2
18 hs	1050	1032	1009	1112	1050	\pm 44.1
24 hs	1002	1128	1089	916	1034	\pm 94.5

Cuadro 4; No. de núcleos con marca obtenidos de los cultivos de linfocitos tratados con plasma, el tiempo de tratamiento corresponde al tiempo de cosecha, no se encontraron diferencias significativas.

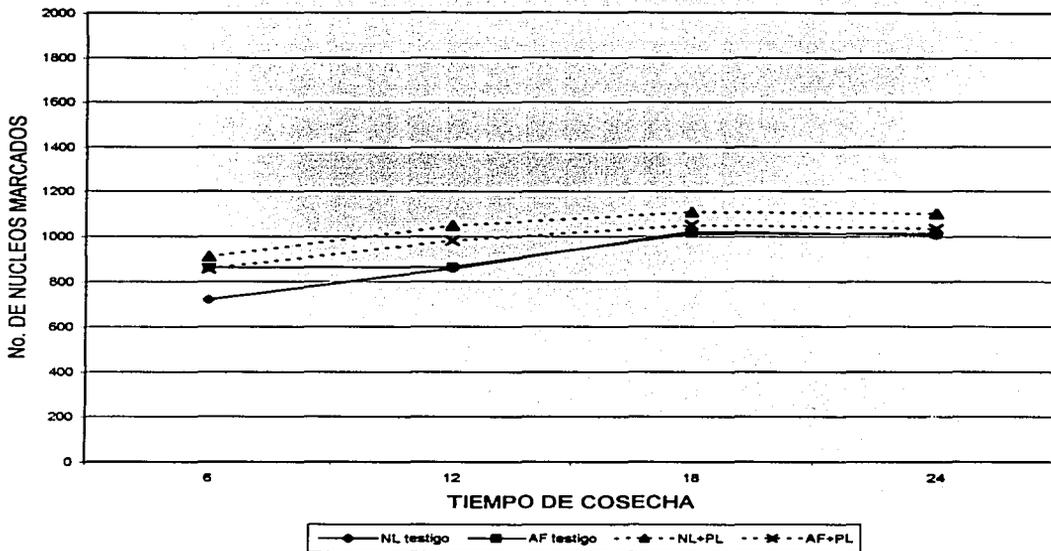


Figura 5 Efecto del plasma: El plasma incrementa el número de nucleos marcados pero no es preferencial para los cultivos de AF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.5 CULTIVOS TRATADOS CON MMC Y POSTERIORMENTE CON HU.

Con respecto a los cultivos normales tratados con sólo MMC (cuadro 2), los cultivos MMC-HU, presentaron una disminución del 44% de núcleos marcados únicamente en la cosecha de 6 horas, ya que en las siguientes cosechas se observó una recuperación inmediata de la población celular con síntesis de ADN (cuadro 5, figura 6).

En cultivos AF con MMC-HU, se observó un drástico efecto, en la cosecha de 6 horas sólo hubo 6% de núcleos con marca comparado con los cultivos que únicamente tenían MMC, y aunque la curva es semejante a la normal permanece muy por debajo de ésta (cuadro 5, figura 6). Los cultivos con estos tratamientos pusieron en evidencia una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre células normales y de AF.

7.6 CULTIVOS TRATADOS CON MMC Y POSTERIORMENTE CON PLASMA.

El plasma humano normal no produjo efecto significativo en la síntesis de ADN tanto en cultivos normales como de AF expuestos por 24 horas a la MMC y aunque se encontró mayor número de núcleos marcados con respecto a los cultivos que solo tenían MMC, la tendencia de las curvas a disminuir en la cosecha de 24 horas se conservó (cuadro 6, figura 7).

COSECHA

	NL 1	NL 2	NL 3	NL 4	Prom.	σ
6 hs	444	521	458	664	522 ±	100.6
12 hs	961	1058	1039	874	983 ±	83.9
18 hs	1196	1284	1344	923	1187 ±	186.0
24 hs	735	841	936	853	841 ±	82.5
	AF 1	AF 2	AF 3	AF 4	Prom.	σ
6 hs	132	1	2	65	50 ±	62.3
12 hs	289	206	268	163	231 ±	57.7
18 hs	651	744	117	141	413 ±	330.6
24 hs	507	406	17	79	252 ±	240.8

Cuadro 5; No. de núcleos con marca obtenidos de los cultivos de linfocitos tratados con MMC + HU, hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los cultivos normales y los de AF.

**TES CON
FALLA DE ORIGEN**

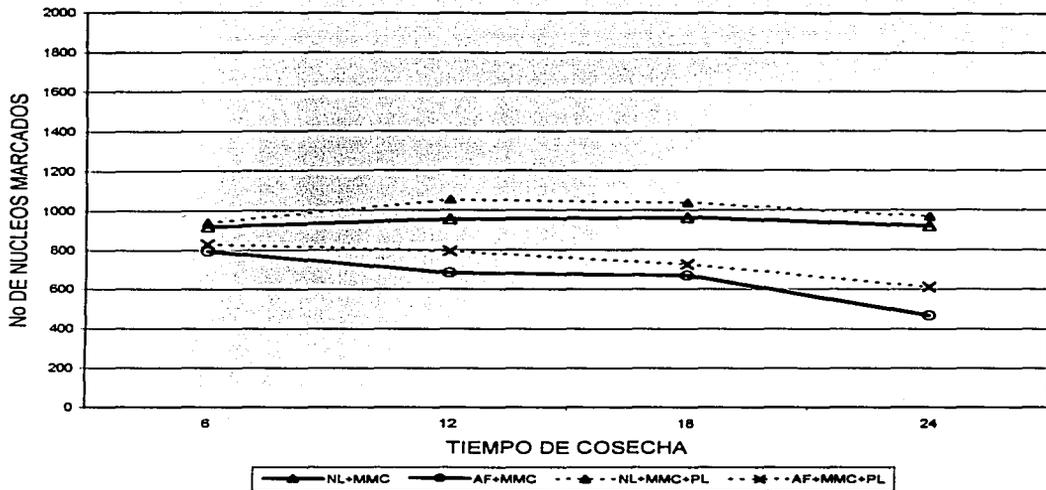


Figura 7 Se observa el efecto del plasma en cultivos tratados previamente con MMC, hubo un incremento no significativo de núcleos con marca, no preferencial para cultivos AF como se esperaba.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

COSECHA

	NL 1	NL 2	NL 3	NL 4	Prom.	σ
6 hs	914	1007	980	857	939	\pm 67.5
12 hs	979	1058	1203	966	1051	\pm 108.9
18 hs	1015	1016	1254	864	1037	\pm 161.2
24 hs	1129	780	1026	938	968	\pm 147.8
	AF 1	AF 2	AF 3	AF 4	Prom.	σ
6 hs	912	798	719	901	832	\pm 91.4
12 hs	840	1214	614	505	793	\pm 313.3
18 hs	627	1030	585	665	727	\pm 204.8
24 hs	594	868	479	502	611	\pm 178.6

Cuadro 6; No. de núcleos con marca obtenidos de los cultivos de linfocitos con MMC + PLASMA, el plasma no produce diferencia significativa con respecto a los cultivos que solo tienen MMC.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

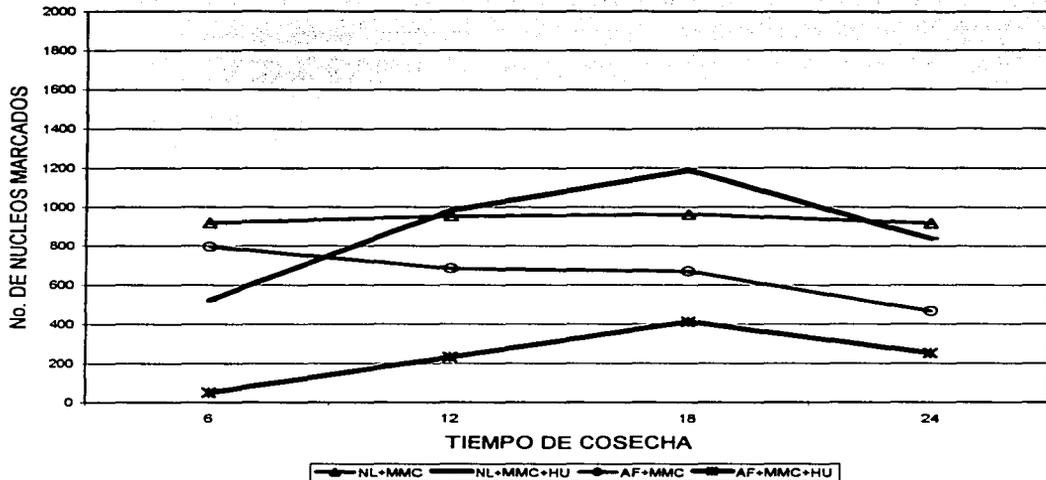


Figura 6 Se observa el efecto de la HU sobre cultivos que fueron tratados previamente con MMC, ambos tratamientos producen la mayor diferencia entre las células normales y de AF, ya que estas últimas presentaron hipersensibilidad a los dos agentes, representada como un número muy bajo de células que pueden realizar síntesis de ADN.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.7 CULTIVOS TRATADOS CON HIDROXIUREA Y PLASMA.

En cultivos normales bajo este tratamiento, el plasma produjo un incremento no significativo de núcleos con marca, sin embargo el pico máximo de núcleos marcados se presentó 6 horas antes de lo observado en el cultivo con HU únicamente (cuadro 7, figura 8).

En los cultivos de células AF el plasma indujo un incremento significativo ($P < 0.05$) de núcleos marcados con respecto a los cultivos con sólo HU, este incremento fue mayor conforme aumentó el tiempo de cosecha, de manera que en la de 24 horas casi alcanzó los niveles de núcleos marcados de los cultivos sin tratamiento (cuadro 7, figura 8).

7.8 EFECTO DEL PLASMA EN CULTIVOS TRATADOS CON MMC-HU.

El plasma humano normal incrementó de manera estadísticamente significativa ($P < 0.05$) el número de células con síntesis de ADN tanto de cultivos normales como de AF, sin embargo este número permaneció muy por debajo en los cultivos AF comparado con los normales. Se conservó el mismo patrón de la curva que se produjo en los cultivos con MMC e HU (cuadro 8, figura 9).

COSECHA

	NL 1	NL 2	NL 3	NL 4	Prom.	σ
6 hs	668	715	781	697	715 ±	47.9
12 hs	1082	1064	1491	1320	1239 ±	204.4
18 hs	1108	1330	1171	938	1137 ±	162.1
24 hs	1026	1036	1191	891	1036 ±	122.7
	AF 1	AF 2	AF 3	AF 4	Prom.	σ
6 hs	56	252	13	57	94 ±	107.0
12 hs	679	784	448	286	549 ±	224.7
18 hs	926	1080	601	567	793 ±	250.3
24 hs	1146	1308	952	380	946 ±	404.7

Cuadro 7; No. de núcleos con marca obtenidos de los cultivos de linfocitos con HU + PLASMA, con excepción de AF 4, el plasma contribuye a que se alcance el número de células en síntesis que la observada en los cultivos testigo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

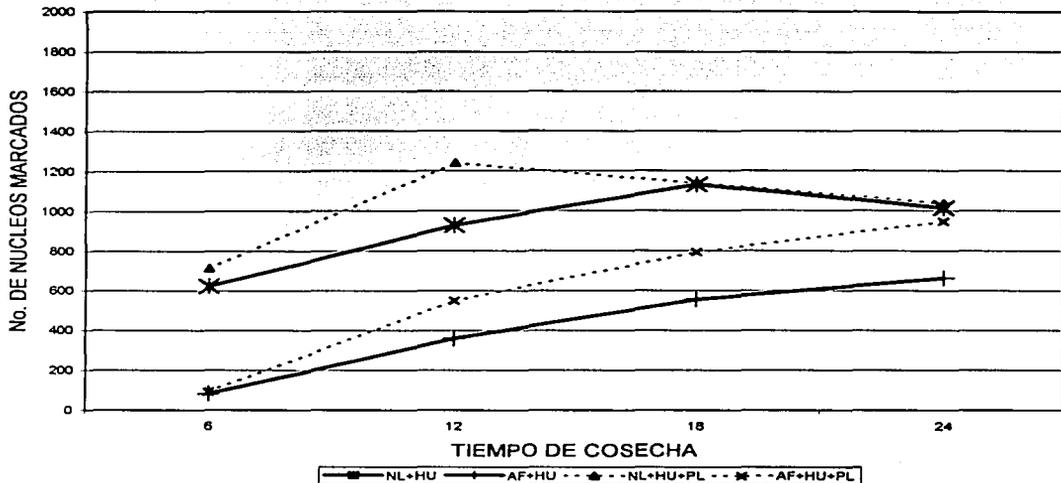


Figura 8 Se muestra el resultado de adicionar a los cultivos HU y plasma humano normal, este último contribuye a restaurar la tasa de síntesis de las células AF en la cosecha de 24 horas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COSECHA

	NL 1	NL 2	NL 3	NL 4	Prom.	σ
6 hs	424	798	770	765	689 ±	177.4
12 hs	1020	1435	1444	980	1220 ±	254.3
18 hs	1261	1550	1261	1248	1330 ±	146.8
24 hs	1363	1523	1076	1083	1261 ±	219.8
	AF 1	AF 2	AF 3	AF 4	Prom.	σ
6 hs	297	179	46	102	156 ±	108.7
12 hs	418	460	521	87	371 ±	194.3
18 hs	697	1070	568	225	640 ±	349.1
24 hs	619	482	344	248	423 ±	162.0

Cuadro 8; No. de núcleos con marca obtenidos de los cultivos de linfocitos con MMC + HU + PLASMA, el incremento de núcleos con marca fue significativo con a los cultivos con solo MMC y HU ($p < 0.05$), sin embargo se mantiene la diferencia entre las células normales y las de AF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

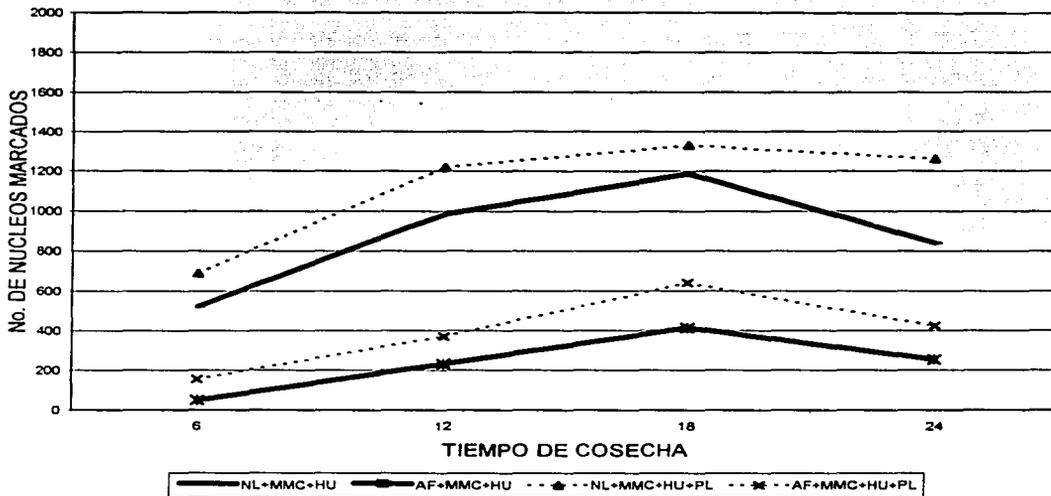


Figura 9 Se observa el efecto del plasma en cultivos donde se da la mayor diferencia entre células normales y de AF, MMC-HU, el incremento que se produce en número de núcleos con Síntesis de ADN es similar en células normales y de AF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8 DISCUSION

En este trabajo se estudiaron los efectos de la MMC, la HU y el plasma, sobre la síntesis de replicación del ADN, evaluada durante dos horas de incorporación de T3H en cultivos de linfocitos de cuatro pacientes AF y cuatro individuos normales. Las curvas casi planas obtenidas de los cuatro tiempos registrados en los cultivos testigo tanto de células normales como de AF se deben a que el registro no empezó en el tiempo cero de cultivo y tampoco hubo sincronización celular por lo que la probabilidad de tener un número de células en fase S era la misma e independiente para cada tiempo de cosecha.

8.1 EFECTO DE LA MMC.

La MMC produce inhibición de la síntesis semiconservativa ya que las lesiones en el ADN impiden la iniciación de replicones, bloquean la progresión de la horquilla de replicación o bien afectan la velocidad de elongación de la cadena hija (Friedberg y Hanawalt, 1981). No obstante, en las células normales no hubo diferencia del número de núcleos con síntesis de ADN en cultivos con y sin MMC, posiblemente porque se recuperan rápidamente del daño. En las células AF que han demostrado gran sensibilidad a los agentes alquilantes bifuncionales como la MMC (Sasaki y Tonomura, 1973; Novotna *et al*; 1979) la disminución progresiva del número de células con marca indicó que estas células no pudieron recuperar su tasa de síntesis de ADN. Aunque el análisis de la densidad de marca fue cualitativo (figura 2), no se observó una menor incorporación de T3H por núcleo con este tratamiento. Estos resultados están de acuerdo

con lo reportado por Classen y colaboradores (1986) quienes encontraron que después del tratamiento con MMC hubo reducción en la incorporación de T3H analizada por citometría de flujo pero mediante autorradiografía no encontraron un decremento de marca por área nuclear con respecto a los núcleos sin tratamiento por lo que la disminución de la incorporación de T3H se debió a la disminución en el número de células que se encontraban en síntesis replicativa.

Centurion y colaboradores (2000) mediante autorradiografía analizaron la incorporación de T3H y encontraron que después del tratamiento con 8-MOP+UV hay menor incorporación en las células normales que en las de AF, los autores proponen que las células normales detienen su síntesis de ADN seguramente para poder realizar la reparación y las de AF no, lo que indicó que las células de AF tienen una "Síntesis de ADN resistente a Daño". En nuestro trabajo no se pudo observar este efecto con la MMC debido al largo tiempo de exposición a la T3H (dos horas), mientras que Centurión y colaboradores sólo la dejaron 30 minutos lo que les permitió observar núcleos no saturados de marca radioactiva.

Por otra parte, Moustacchi y colaboradores (1987) trataron células con 8-MOP+UV, que al igual que la MMC producen enlaces cruzados en el ADN, y observaron que las células normales, empiezan a recuperar su tasa de síntesis cuatro horas después del tratamiento y a las 10 horas están completamente recuperadas. Esto está acorde con nuestros datos, pues como se observa en la figura 3 el número de células normales con síntesis de ADN está totalmente restaurado desde la cosecha de 6 horas.

Los autores antes mencionados encuentran que los linfoblastos AF del grupo de complementación B se recuperan igual que las células normales, mientras que los del grupo AF-A, después de 10 horas del tratamiento aún no logran recuperarse. Nuestros resultados en linfocitos de cuatro pacientes AF, muestran que a las 24 horas del tratamiento con MMC no hay indicios de recuperación (cuadro 2), lo que sugiere que éstos pacientes no pertenecen al grupo de complementación B. Cabe señalar que en 4 pacientes mexicanos con asignación de grupo (ninguno de los reportados en este trabajo), 3 correspondieron al grupo A y uno al grupo C (Esmer *et al*, 1999). Por otra parte, Heinrich y colaboradores (1998), mostraron mediante citometría de flujo que en AF-C, el porcentaje de células en fase de síntesis de ADN está disminuido con respecto a la línea normal después del tratamiento por 48 horas con 40 ng/ml de MMC, sin embargo la observación es sólo después del tratamiento y se desconoce el momento de la recuperación.

8.2 EFECTO DE LA HU

Se observaron dos efectos: a) En células normales y de AF se redujo la cantidad de T3H incorporada por núcleo como se observa en la figura 2B y b) En los cultivos de AF disminuyó el número de células en fase S.

La disminución de la densidad de marca por núcleo está de acuerdo con lo observado por Maurer-Schultze y colaboradores (1988) quienes en un estudio *in vivo* encuentran que la HU, reduce la cantidad de T3H incorporada por el núcleo en un 93%, media hora después de su aplicación, sin embargo 3 horas después, ellos

observan que se recupera la densidad de marca radioactiva normal, esto último difiere de lo observado en este trabajo, ya que tanto en células normales como de AF, 24 horas después se siguen observando los núcleos con poca marca, esto sugiere que *in vitro*, la HU mantiene la inhibición de la RR por periodos mayores a 24 horas.

Maurer-Schultze y colaboradores en sus resultados señalan que las células de ratones tratados con HU no detienen su ciclo celular en la fase G1/S, sino que entran a la fase S en una tasa normal y se acumulan en la fase S-temprana, lo cual coincide con lo observado en nuestro trabajo, la poca incorporación de T3H por núcleo y el hecho de que en los cultivos normales no hubo reducción en el número de núcleos marcados con respecto al testigo, indica que las células entraron a fase S y se detuvieron al no haber precursores para continuarla, lo que pone en evidencia que las células normales entran en síntesis con una baja cantidad de dNTPs y que estos deben ser sintetizados durante la fase S con la participación activa de la RR.

En cultivos AF, además de la reducción de la incorporación de T3H observada en los núcleos (figura2B), la HU produce una disminución significativa del número de células que se detectan en la fase de síntesis de ADN; en promedio esta disminución es del 90% a las 6 horas y 34% a las 24 horas después del tratamiento, ésta hipersensibilidad a la HU indica una falla específica en la síntesis de ADN que puede estar ligada al defecto básico.

Una alternativa para explicar esta reducción de núcleos con incorporación de T3H podría ser por la hipersensibilidad de los linfocitos AF a radicales libres de oxígeno (Joenje *et al*, 1981), ya que

por la acción de la HU se libera H₂O₂ y esto pudo impedir que las células entraran a fase S en las primeras horas de cosecha.

Otra alternativa podría ser la falta de dATP específicamente, ya que algunos trabajos muestran que la falla en AF se puede restaurar por adición de adenina (Frazelle, 1981; Pincheira, 1988) y la inhibición de la RR por HU tiene efectos diferentes sobre los cuatro dNTPs; el dATP es el más severamente disminuido, los dCTP y dGTP declinan de manera intermedia y el dTTP se incrementa al doble (Hendricks y Mathews, 1998). Por lo que la reducción de dATP pudo ser la causa de la disminución de células que entran a la fase S al adicionar HU a los cultivos.

Por otra parte, al parecer en la curva (figura 4) se observa un aumento del número de núcleos con incorporación de T³H conforme aumenta el tiempo de cosecha y no sabemos si las células de AF se tardaron en entrar a fase S o bien empezaron la síntesis pero la incorporación fue muy lenta y se detectaron más tarde, ambas posibilidades apuntan a una falla en la reserva de dNTPs, que las hizo más dependientes de la síntesis de novo por la RR, ya que las células normales son capaces de incorporar los pocos dNTPs presentes al estar inhibida la RR, ésta reserva que les permitió entrar a fase S pudo haber estado antes de la inhibición por HU o bien formarse por la vía alterna de rescate de nucleótidos. Entonces las células de AF fallan en alternar esta vía o bien en tener reservas suficientes de dNTPs para entrar a fase S.

Por último, si hacemos comparación con las células de levaduras, hay sepas mutantes para los genes Rad 53 y Mec1 que son genes que controlan puntos de restricción dentro de la fase S,

estabilizan la horquilla de replicación e inhiben la activación de los replicones tardíos, cuando las levaduras son tratadas con metil metano sulfonato (MMS), las células silvestres pausan en fase S e inhiben la activación de replicones tardíos para proteger a la célula de un posible colapso de la horquilla de replicación que cuando ocurren varios se da la muerte celular, en las levaduras mutantes no se da esta pausa y prosigue la replicación del ADN dando como resultado hipersensibilidad de las mutantes al MMS. En las levaduras normales tratadas con HU la mayoría de las horquillas de replicación se detienen cercanas al origen y cuando se quita la HU la replicación continúa hasta terminar el proceso, en las levaduras mutantes se observan pocas horquillas de replicación y en su lugar aparecen intermediarios de replicación que no se conoce su origen pero se piensa que resultan de horquillas de replicación colapsadas y de eventos para procesar el ADN tal como ocurre durante una reparación por recombinación truncada, la subsecuente remoción de HU no resulta en completar la replicación y eliminar estos intermediarios. Aparecen estructuras anormales no reparadas y las células son incapaces de recuperarse de la HU (Donalson y Blow, 2001). Nuestros cultivos AF podrían semejar las células mutantes deficientes en un punto de restricción dentro de la fase S ya que presentan una "síntesis de ADN resistente a daño", son hipersensibles a MMC y no pudieron recuperarse de la HU. En consecuencia con lo anterior, en las células AF tratadas con HU se produjo la muerte de aquellas células que estaban avanzadas en fase S, y la aparente recuperación se debe a que células que no estaban en fase S empiezan a alcanzar S temprana y se acumulan, pero también continúan muriendo por lo que nunca se recuperan.

Heinrich y colaboradores, (1998) trataron a las células de AF-C con HU para averiguar una posible falla en los puntos de restricción de la fase S como se observa en las levaduras mutantes después de este tratamiento que las lleva a anormales niveles de muerte celular, y no encuentran diferencia entre las células AF-C y las normales, presentan similares grados de sincronización G1/S después del tratamiento con HU, sin embargo solo hacen la medición por citometría de flujo a las 24 horas de tratamiento con HU y si observamos la figura 4, es en este tiempo cuando mas se parece el número de células que están en fase S de las células AF y las normales y no sabemos si esta alterado el porcentaje con respecto a las otras fases, por lo que o no se esta detectando la sensibilidad de AF-C a HU, o bien nuestros pacientes no corresponden a este grupo de complementación.

Por otra parte, algunos autores han utilizado la HU para observar solo síntesis de reparación ya que la síntesis replicativa resulta fuertemente inhibida por este agente y se pensaba que para la síntesis de reparación se requerían menos dNTPs y eran suficientes con la reserva de la célula sin requerir síntesis *de novo* (Friedberg y Hanawalt, 1981). En este trabajo realizado con linfocitos estimulados con PHA observamos que en células normales el número de núcleos densamente marcados de cultivos sin tratamiento, corresponden al número de núcleos con escasa marca encontrados en cultivos con HU, lo que sugiere que se trata de células que entraron a fase S y detuvieron su síntesis y no a una síntesis de reparación.

8.3 EFECTO DE LA HU Y MMC

La combinación de HU con otras drogas mutagénicas, etoposido o cisplatino y análogos de bases (Citarabidina, fludarabina, 5-fluorourasil), tiene un efecto sinérgico y produce daño y muerte en aquellas células que están en división constante por lo que se ha usado en terapia contra diferentes neoplasias (Yarbro, 1992). La MMC detiene a las células en fase S y G2 por la gran cantidad de daño que produce. En nuestros cultivos, después de retirar la MMC, se hizo una reincubación con HU, lo que al parecer ocasionó la muerte de las células que estaban en síntesis activa de ADN ya que como se observa en la figura 6, en la cosecha de 6 horas se encuentra la menor cantidad de núcleos con marca. Esta reducción es más evidente en los cultivos AF, probablemente por la característica de presentar una "síntesis resistente a daño" después de estar en contacto con la MMC y la falta de dNTPs producida por la HU un porcentaje mayor de células mueren, las pocas células que van llegando a fase S se detectan más tarde y tiende a recuperarse la tasa de síntesis pero no se logra aún 24 horas después de retirar la MMC, el efecto potenciador de la HU sobre el daño producido por la MMC puede ser la causa de la gran diferencia con respecto a las células normales ya que en estas a pesar de la acción de los dos agentes, su tasa de síntesis se encontró recuperada a las 12 horas.

Por otra parte, la curva de las células normales tratadas con HU tiene un máximo de síntesis de ADN en la cosecha de 18 horas, el cual es más obvio cuando se da un tratamiento previo con MMC, esto

podría considerarse como un efecto de sincronización producido por HU, el cual se ha observado *in vivo* en ratones 6 horas después de la aplicación de esta sustancia (Maurer-Schultze, 1988).

Este tratamiento con MMC y HU pone en evidencia una gran diferencia entre las células normales y AF en cuanto a su capacidad para responder al daño producido por la MMC y a la falta de dNTPs que se requieren para hacer la síntesis de replicación y reparación del ADN.

8.4 EFECTO DEL PLASMA HUMANO NORMAL

En estudios previos donde se utilizó como parámetro de medición de daño, la frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por MMC en células AF, se encontró que el plasma normal produce complementación parcial en linfocitos AF tratados con MMC (Carnevale, *et al* 1985, Frias, *et al* 1986). Esto sugirió la presencia de un factor de corrección en el plasma que ayudó a disminuir la hipersensibilidad de las células de AF al daño producido por este agente. En este trabajo, los cultivos con plasma mostraron un incremento en el número de núcleos marcados comparados con los cultivos testigo tanto en células normales como de AF; esto se atribuye principalmente a factores de crecimiento que estimularon a más células a entrar en fase S, aunque su efecto no mostró preferencia en las células de AF.

MMC Y PLASMA.

En cultivos de AF con MMC y plasma se esperaba un mayor aumento de núcleos marcados que en los cultivos de células normales; sin

embargo esto no ocurrió, lo que puso en evidencia que la corrección observada en aberraciones cromosómicas no es por una selección de células con menor daño que entran a fase S para posteriormente dividirse y llegar a metafase con menos aberraciones cromosómicas.

HU Y PLASMA

En linfocitos tratados con HU y plasma, el pico de síntesis observado en la curva de las células normales se desplazó de la cosecha 18 a la 12, lo que sugiere que el plasma estimuló a las células a entrar en síntesis en menor tiempo, pese a que la RR estuviera inactiva.

En los cultivos AF con HU y plasma, fue el único tratamiento donde el plasma indujo un incremento significativo del número de células que incorporaron T3H con respecto al cultivo con solo HU, el cual en la cosecha de 24 horas alcanzó el número observado en cultivos testigos. Los factores presentes en el plasma, ayudaron a restituir la tasa de síntesis en la cosecha de 24 horas. En células normales el plasma desplazó el pico de síntesis de la cosecha de 18 horas (de cultivos con solo HU) a la de 12 horas. En AF el plasma probablemente desplazó también a un menor tiempo la recuperación de la tasa de síntesis y la observamos a las 24 horas, que sin plasma ocurriría mas tarde. Sin embargo, el plasma contiene constituyentes inorgánicos y orgánicos como; carbohidratos, lípidos, factores de crecimiento, antioxidantes, varios tipos de proteínas entre ellas las de transporte de metales, hormonas y vitaminas; inhibidoras de proteasas, y algunas otras en las que aún se desconoce su función (Carlson, 1989), algunos de estos componentes pudieron participar en este

efecto, ya que pudieron restituir algunas de las fallas del metabolismo celular de AF, como suplir la deficiencia de citocinas, aportar antioxidantes y revertir la sensibilidad a radicales de oxígeno, o bien aportar dNTPs entre ellos adenina que es capaz de disminuir la frecuencia de aberraciones cromosómicas en AF.

Los cultivos normales y de AF que tienen MMC, HU y Plasma, muestran un incremento significativo de núcleos marcados, pero pese a que suponemos que el plasma contribuye a corregir algunas de las fallas del fenotipo celular AF, la curva de estas células está significativamente por debajo de la normal y como se observa en la figura 9 no se modificó el efecto que producen MMC-HU.

9 CONCLUSIONES:

Al estudiar la síntesis de ADN por autorradiografía se observó la hipersensibilidad de las células AF a la MMC como una disminución del número de núcleos que sintetizan ADN.

Las células AF demostraron hipersensibilidad a HU ya que con este tratamiento, no se observó recuperación del número de células en síntesis de ADN aún 24 horas después de su administración; este comportamiento es esencialmente diferente al de las células normales y pone en evidencia una falla en fase S de las células AF.

El plasma humano normal indujo mayor número de células con síntesis de ADN, en todos los tratamientos donde se administró y tanto en cultivos normales como de AF, este incremento fue notable en cultivos AF con HU en la cosecha de 24 horas, ya que el cultivo con plasma alcanzó a eliminar la diferencia en el número de núcleos marcados con respecto al cultivo testigo.

10 APORTACIONES.

Con este trabajo se contribuye a delimitar las características del fenotipo celular de la AF, la sensibilidad a HU no se había descrito anteriormente y pone en evidencia una falla a nivel de Fase S del ciclo celular donde se realiza la síntesis replicativa del ADN, la cual puede ser la causa de la observada reparación incompleta del ADN o bien contribuir con la falla en reparación del ADN.

Es importante determinar si esta sensibilidad a HU es característica de un grupo de complementación o si es parte del fenotipo general de la anemia de Fanconi. Y por otra parte determinar la causa de la sensibilidad, si es por una falla en las reservas de dNTPs o bien una alteración en los puntos de restricción dentro de la fase S como se observa las levaduras mutantes para los genes Rad 53 y Mec 1.

11 REFERENCIAS

Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM: **International Fanconi Anemia Registry (IFAR): First Report In: Fanconi Anemia, Clinical Cytogenetic and Experimental Aspects**, T.M. Shroeder, A. D. Auerbach, G. Obe (Eds.) Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 1989.

Berger NA, Berger SJ, Catino DM. **Abnormal NAD⁺ levels in cells from patients with Fanconi's anaemia.** *Nature* 1982; 299: 271-273.

Carlson Timothy. **Composition of Plasma.** In Rossi EC, Simon TL, Moss GS. *Principles of Transfusion.* Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. 1989; p. 307-314.

Carnevale A, Frias S. **Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la mitomicina-C de linfocitos de Anemia de Fanconi.** *Rev. Inv. Clin.* 1985; 37: 31-34.

Centurion SA, Kuo HR, Lambert C. **Damage-Resistant DNA synthesis in Fanconi anemia cells treated with a DNA cross-linking agent.** *Exp. Cell Res.* 2000; 260: 216-221.

Cervenka J, Hirsch BA. **Cytogenetic differentiation of Fanconi anemia, "Idiopathic" aplastic anemia and FA heterozygotes.** *Am. J. Med. Genet.* 1983; 15: 211-223.

Classen E, Kortbeek H, Arwert F. **Effect of mitomycin C on the rate of DNA synthesis in normal and Fanconi anaemia cells.** *Mutat. Res.* 1986; 165: 15-19.

D'Andrea AD, Grompe M. **Molecular biology of Fanconi anemia: Implications for diagnosis and therapy.** *Blood.* 1997; 90: 1725-1735.

Dallapiccola B, Porfirio B, Mokini V, Alimena G, Isacchi G, Gandini E. **Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi anemia lymphocytes.** *Hum. Genet.* 1985; 69: 62-65.

De Winter JP, Waisfisz Q, Roimans MA, Van Berkel CGM, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nature Genet.* 1998; 20:281-283.

De Winter JP, Léveillé F, Van Berkel CGM, Roimans MA, Van der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2000a; 67: 1306-1308.

De Winter JP, Roimans MA, Van der Weel L, Van Berkel CGM, Alon N, Bosnoyan-Collins L, De Grut J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nature Genet.* 2000b; 24: 15-16.

Donaldson AD, Blow JJ. DNA replication: Stable driving prevents fatal smashes. *Current Biol.* 2001; 11:979-982.

Dutrillaux B, Dubos C, Viegas-Peguignot E, Buriot D. Partial endoreduplication : A new cytogenetics anomaly possibly related to a DNA repair defect. *Ann. Genet.* 1979; 22: 25-28.

Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum Genet.* 1982; 62: 327-332.

Esmer MC, Carnevale A, Molina B, Cruz-Alcivar R, Sánchez S, Gómez L, Frias S. Variabilidad clínica y citogenética en doce familias mexicanas con anemia de Fanconi y su relación con el grupo de complemetación al que pertenecen. *Rev. Invest. Clin.* 1999; 51:273-283.

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

Frazelle JH, Harris JS, Swift M. Response of Fanconi anemia fibroblast to adenina and purine analogues. *Mutat Res*. 1981; 80: 373-380.

Frias S, Carnevale A, Del Castillo V. Diagnóstico de anemia de Fanconi en linfocitos expuestos a mitomicina-C. *Rev. Inv. Clin*. 1984; 36: 219-221.

Frias S, Carnevale A, Molina B, Del Castillo V. Estudio de heterogeneidad genética en anemia de Fanconi por medio de la adición de plasma. *Rev. Inv. Clin*. 1986; 38: 269-271.

Frias S, Molina B, Gómez L, Carnevale A. Efecto de la Adición de medios condicionados sobre la respuesta de los linfocitos de Anemia de Fanconi a la mitomicina-C. *Rev. Inv. Clin*. 1992; 44: 519-524.

Friedberg ER, Hanawalt F. DNA repair a laboratory manual of reserch procedure. Ed Marcel Dekker. Tomo 2, 1981.

Fujiwara Y, Tatsumi M, Sasaki MS. Crosslink repair in human cells and its possible defect in Fanconi's anemia cells. *J. Mol. Biol*. 1977; 113:635-649.

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn S, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell*. 2001; 7: 249-262.

Gavish H, dos Santos CC, Buchwald M. A Leu 554-to-Pro substitution completely abolishes the functional complementing activity of the fanconi anemia (FACC) protein. *Hum. Mol. Gen*.1993; 2:123-6.

ESTA TESIS NO SALIÓ
DE LA BIBLIOTECA

Gibson RA, Buchwald M, Roberts RG, Mathew CG. Characterization of the exon structure of Fanconi anaemia group C gene by vectorette PCRT. *Hum. Mol. Genet.* 1993a; 2: 35-38.

Gibson RA, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Buchwald M y Mathew CG. A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anaemia group C gene. *Hum. Mol. Gen.* 1993b; 2: 797-799.

Gordon-Smith EC, Rutherford TR. Fanconi anemia-constitutional, familial aplastic anaemia. *Baillière's Clin. Haematol.* 1989; 2:139-152.

Guille JP, Wortelboer MH, Joenje H, Antioxidants status of Fanconi anemia fibroblast. *Hum. Genet.* 1987; 77: 28-31.

Guillouf C, Wang TS, Liu J, Walsh CE, Poirier GG, Moustacchi E, Rosselli F. Fanconi Anemia C protein acts at a switch between apoptosis and necrosis in Mitomycin C-induced cell death. *Exp. Cell Res.* 1999; 246: 384-394.

Gutierrez LM. Mitomycin-C current status and new developments. Ed.Carter SK y Crooke ST. New York. Academic Press 1979.

Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ, Silvey KV, Bakke AC, Keeble WW, Zhi Y, Reifsteck CA, Grompe M, Brown MG, Magenis RE, Olson SB, Bagby GCJr. DNA Cross-Linker-Induced G2/M Arrest in Group C Fanconi Anemia Lymphoblast Reflects Normal Checkpoint Function. *Blood.* 1998; 91: 275-287.

Hendricks SP, Mathews CK, Differential Effects of Hydroxyurea upon Deoxyribonucleoside Triphosphate pools, Analyzed with Vaccinia Virus Ribonucleotide Reductase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 29519-29523.

Harris H, Hirschhorn K. *Advances in Human Genetics.* Plenum Press. New York . 1989.

Ianzano L, D'Apolito M, Centra M, Savino M, Levrano O, Auerbach AD, Cleton-Jensen AM, Doggett NA, Pronk JC, Tipping AJ, Gibson RA, Mathew CG, Whitmore SA, Apostolou S, Callen DF, Zelante L, Savoia A. The genomic organization of the Fanconi anemia group A (FAA) gene. *Genomics.* 1997; 41: 309-314.

Joenje H, Arwert f, Eriksson AW, de Koning H, Ostra AB. Oxigen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature*. 1981; 290:142-143.

Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, D'Andrea A, Garcia-Higuera I, Pearson T, van Berkel CGM, Rooimans MA, Morgan M, Mathew CG, Arwert F. Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67: 759-762.

Joenje H, Patel KJ. The Emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nature Rev. Genet.* 2001; 2: 446-457.

Johnstone P, Reifsteck C, Kohler S, Worland P, Olson S, Moses RE. Fanconi anemia group A and D cell lines respond normally to inhibitors of cell cycle regulation. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 1997; 23: 371-377.

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. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 23391-23396.

Kruit FAE, Dijkmans LM, Arwert F, Joenje H. Involvement of the Fanconi's anemia protein FAC in a pathway that signals to the cyclin B/cdc2 kinase. *Cancer Res.* 1997; 57: 2244-2241.

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

Kundel TA, Silver JR, Loeb LA. The mutagenic effect of deoxynucleotide substrate imbalances during DNA synthesis with mammalian DNA polymerases. *Mutat. Res.* 1982; 94: 413-417.

Kupfer GM, Yamashita T, Naf D, Suliman A, Asano S, D' Andrea A. The Fanconi anemia polipeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinasa, cdc2. *Blood.* 1997; 90: 1047-1054.

Levrán O, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, Auerbach AD. Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94: 13051-13056.

Lo Ten foe JR, Roomians MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, van Berkel CGM, Strunk MHP, Gille JJP, Pals G, Kruyt FAE, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M, Joenje H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. Nature Genet. 1996; 14: 320-323.

Maurer-Schultze B, Siebert M y Bassukas ID. An in vivo study on the synchronizing effect of hydroxyurea. Exp. Cell. Res. 1988; 174: 230-243.

McKusick VA. Mendelian inheritance in man. Eleventh edition. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London. 1994. Vol 2.

Medhurst A, Huber P, Waisfisz Q, De Winter J, Mathew C. Direct interaction of the five known Fanconi anemia proteins suggest a common functional pathway. Hum. Mol. Genet. 2001; 4: 423-429.

Moustacchi E, Papadopoulo D, Diatloff-Zito, Buchwald M. Two complementation groups of Fanconi's anemia differ in their phenotypic response to DNA crosslinking treatment. Hum. Genet. 1987; 75: 45-47.

Nordenson I. Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosomal breaks in patients with Fanconi's anemia. Lancet 1978; 1: 205.

Novotná B, Goetz P, Surkava NI. Effects of alkylating agents on lymphocytes from controls and from patients with Fanconi's anemia. Hum. Gen. 1979; 49: 41-50.

Pincheira , Bravo M, Lopez-Sáenz JF. Fanconi's anemia lymphocytes: effect of caffeine, adenosine and niacinamide during G2 profase. Mutat. Res. 1988; 199: 159-165.

Pronk JC, Gibson RA, Savoia A, Wijker M, Morgan NV, Melchionda S, Ford D, Temtamy S, Ortega JJ, Jensen S, Havenga CH, Cohn RJ, de Ravel TJ, Roberts I, Westerveld A, Easton DF, Joenje H, Mathew GC, Arwert F. Localization of the Fanconi anemia group A gene to chromosome 16q24.3. *Nature Genet.* 1995; 11: 338-340.

Poon PK, O'Brien RL, Parker JL. Defective DNA repair in Fanconi's anemia. *Nature.* 1974; 250: 223-225.

Reichard P, Ehrenberg A. Ribonucleotide Reductase a radical enzyme. *Science.* 1983; 221: 514-519.

Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 1988; 57: 349-374.

Rosselli F, Sanceau J, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. *Hum. Genet.* 1992; 89: 42-48.

Rosselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal Lymphokine Production: A Novel Feature of the Genetic Disease Fanconi Anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alfa. *Blood.* 1994; 83: 1216-1225.

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

Saito H, Hammond AT, Moses RE. Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells. *Mutat. Res.* 1993; 294: 255-262.

Sala-Trepas M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulou D. Arrest of S-Phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp. Cell Res.* 2000; 260: 208-215.

Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA crosslinking agents. *Cancer Res.* 1973; 33:1829-1836.

Schindler D, Hoehn H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Hum. Genet.* 1988; 43: 429-435.

Schroeder TM, Anschuts F, Knoop A. Spontaneous chromosome aberrations in familial panmyelopathy. *Hum. Gen.* 1964; 1:194-196.

Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoen H, Hentze S, Schroeder -Kurt TM. Comparative Evaluation of diepoxibutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood.* 1995; 85: 2233-2237.

Sokal RR, Rohls SJ. *Biometry*. Ed. W. H. Freeman and Company San Francisco. 1969.

Sudharsan AR, Haddle JA. The effect of superoxide dismutas, catalase and L-cysteine on spontaneous and mitomycin-C induced chromosomal breakage in Fanconi's anemia and normal fibroblasts as mesured by the micronucleos metod. *Mutat. Res.* 1980; 78: 59-66.

Timme TL, Moses RE. Diseases with DNA, damage processing defects. *Am. J. Med. Sci.* 1988; 295:40-48.

Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Raifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, *FANCD2*. *Mol. cell.* 2001; 7: 241-248.

Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, Auerbach AD. Mutation analysis of the Fanconi anemia gene *FACC*. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 54: 595-601.

Verma RS, Babu A. Human chromosomes, manual of basic techniques. Pergamon Press New York. 1989.

Voet D, Voet J. *Biochemistry*. Ed. John Wiley & Sons. New York, U.S.A. 1990.

Waisfisz Q, De Winter JP, Kruit FAE, De Groot J, Van der Weel L, Dijkmans LM, Zhi Y, Arwert F, Scheper RJ, Youssoufian H, Hoatlin ME, Joenje H. A physical complex of Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 y FANCA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 10320-10325.

Whitney M, Thayer M, Reifsteck C, Olson S, Smith L, Jakobs PM, Leach R, Naylor S, Joenje H, Grompe M. Microcell mediated chromosoma transfer maps the Fanconi anemia group D gene to chromosoma 3p. Nat. Genet. 1995; 11: 341-343.

Yamashita T, Barber DL, Zhu Y, Wu N, D'Andrea AD. The Fanconi anemia polypeptide FACC is localized to the cytoplasm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91: 6712-6716.

Yarbro JW, Mechanism of action of hydroxyurea. Seminars in Oncology. 1992; 19: 1-10.

Zakrzewski S, Sperling K. Antagonistic effect of cocultivation on MMC induced aberration rate in cells of patient with Fanconi's anemia. Hum. Genet. 1980; 56: 85-88.