



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*Mecanismos de muerte celular en Anemia
de Fanconi*

SEMINARIO DE TITULACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A

Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez



TUTORA
DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dedicado a “El Chato”

Este seminario de titulación fue realizado en el Laboratorio de Citogenética, Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación CONACYT No. 84259.

Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez recibió una beca PROBEI para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

- A mi padre: DON RAMÓN. Por haberse fijado en la señorita enojona y presumida, perseguirla hasta conquistarla y haberme dado una familia.
- A mi madre DOÑA LUPE. Por haber aceptado al “Viejo Panzón”, hacerse del rogar un rato y dejarse finalmente enamorar. Te adoro ma’.

A LOS DOS MUCHAS GRACIAS POR ABSOLUTAMENTE TODO

- A mis hermanos en Cuautla: Rafita, Teresita “La Rubia”, Melissa “La China”, Elena “La Güera” y Cassandra “La Doñita”. Gracias por ser mi familia y por quererme tanto como yo los quiero. Gracias por apoyarme todo este tiempo. Y pues como ven, ay la llevamos.
- A mis hermanas en el DF: Guadalupe del Rosario “Chary” y Rosita “La Nena”, a mi Tía Ana Joaquina, porque aún a pesar de los malos momentos en los que nos conocimos pude contar con ustedes y apoyarme en su hombro.
- A mis sobrinos que me dan tanta lata: Montse, Nicole, Lizbeth, Jolette, Paulette, Joshua, Dario, Erik, Miguel Ángel, Ailine, Memo y Brenda (Que son los que conozco).
- A todos mis alumnitos del programa de “Niñ@s Talento” por dejarme compartir la ciencia con ustedes y considerarme su amigo.
- A todos mis amigos y seres especiales que me han acompañado durante mis estudios, y con los que he compartido de todo (en estricto orden alfabético):

Adam, Adalid, Alan Israel, Ale Manjarrez, Alfonsina, Alicia “Licha”, Alicia Mastretta, Ana Perdomo, Andrés, Anet, Ángel, Angelita Perdomo, Angélica Juárez, Anita, Arizbeth, Arodi, Arturo, Asdrúbal, Avelino, Axa, Betsy, Betty Puanta, Betty Gómez, Bibiana, Bren - da, Carmen Licet, Carmen Ulloa, César-ino, Chabes, Chela, Chio “La de Durango”, Claudia Iris “Holmes”, Claudia, Cookie, Cristina Argudin, Christopher Othón, Daniela, David Ignacio, Diana “arriba el cuchí”, Diana “Mycota”, Dianita, Dulce “La chief”, Eduardo René, Elenae, Eleonor, Erandi, Erica, Ericuchis, Esperanza, Eunice “La Nena”, Felipe “Pillo”, Fernando, Fidel, Gaby “Zotz Ventrue”, Gaby Gálvez, Gaby Luque, Gemma, Gloria, Goyo, Guillermo “Billy”, Gustavo “El Fabelo”, Horacio, Horte, Hypatia, Iris, Isaac, Isaura, Jandro, Javier, Jazmin, Jean Charles, Jocelyn Mitzi, Jorge Alan, Jorge Rosas, Julia, Julietita “Juls”, Karina “Mi Esposa”, Karoliz, Kika Perdomo, Kiyoshi, Krola, Laura, Laura Elena, Lene, Leticia, Liliana Bonola, Lore, Lorena Susana, Luchi, Lupita “La Física”, Luzma, Macario, Mafer Ortega, Male, Maria “Chiquita”, Mariana, Mario, Marisol, Marlet, Miceli, Milka, Miriam San José, Moni, Mónica “Mona”, Moy, Nadia Adriana, Narvik, Natacha, Natalí, Natalia, Nava, Netzi, Nicasio, Nikolay, Noemi, Óscar “Mycota”, Pájaro, Palo Malo, Paola, Paolo, Paulina Novelo, Paulina “Paux”, Paulina “Potter”, Pollito, Rafa “Salovio”, Ramón, Rosalia “La Prohibida”, Rosaurora, Rubén “Pop”, Sam, Sandrita Heiras, Silvy, Solf Franco, Tatz, Tzintia, Úrsula, Vania, Vivis, Xóchilth, Yanus, Yara, Yuri y Zaid.

Gracias a todos ustedes por compartirme su tiempo, prestarme un peso(o más), sus zapatos, su ropa o su hombro; gracias por dispararme un chesco, invitarme un taco, prestarme su goma, pelearse, vivir o bailar conmigo, hacerme enojar, aguantarme y sobre todo: gracias por ayudarme a crecer.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A la Dra. Sara Frías Vázquez por haber aceptado al muchacho que llegó sin avisar, por su confianza, por su amistad, por la valía que me ha dado y por confiar en este trabajo. Por el afecto que sé que me tiene y el cual es más que correspondido. ¡Muchas gracias Sarita!
- A la M. en C. (Ya casi Dra!) Laura Gómez y la Dra. Tzutzuy Ramírez por ser las maestras que nunca espere tener y las excelentes amigas que ahora son. Tzuy: gracias por enseñarme que las cosas valiosas son efímeras. Lau: gracias por demostrarme que la ciencia es divertida. Mil gracias por formar parte de mi vida y porque sé que sin importar donde nos encontremos mañana contaré con ustedes y ustedes conmigo.
- A la Biol. Clara Olgún y al Dr. Salvador Sánchez “El Wero” por ser los totalmente culpables de mi alistamiento en la Biología.
- A la Dra. Cristina Revilla por los invaluable consejos sobre el quehacer científico, los jalones de oreja dados durante toda la carrera y por las revisiones hechas a este trabajo.
- Al Dr. Emilio Córdova por su rigor al momento de revisar este escrito y las charlas científicas tan amenas.
- Al Dr. Luis Felipe Jiménez por aceptar la revisión de este trabajo y encontrarlo apto.
- A la M. en C. Bertha Molina por permitirme trabajar en su laboratorio, los consejos siempre dados, las sonrisas infalibles de todos los días y los ricos cafés matutinos compartidos.
- A la M. en C. Clementina Castro por darme una de las mejores noticias de mi vida.
- Al Dr. Luis A. Herrera por demostrarme que el diminuto mundo de la ciencia no es para los incautos y que la libertad es un elemento fundamental del ser humano.
- A la Dra. Patricia Ostrosky por haberme considerado merecedor del premio que lleva por nombre el de su esposo.
- A la maestra Lety por que me enseñó a leer y escribir.
- A todas las chicas guapas del laboratorio de Citogenética del INP: Angélica, Hilda, Chivis, Luz, Sandra, Emiy, Martita y Pili; y los muchachos: Abraham, Carlillos, Sergio y Óscar. Gracias a todos por aguantarme y compartir conmigo todo lo que saben.

A todos mis maestros MUCHAS GRACIAS!

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

A continuación se presentan las abreviaturas usadas en el texto. Se omiten las proteínas FANC debido a que una tabla referente a ellas se incluye en el texto principal.

SIGLA	NOMBRE COMPLETO
53BP1(NFBD1)	Tumor protein p53 binding protein 1
AIF	Apoptosis inducing factor
AKT	Murine thymoma viral oncogene homolog 1
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related
ATRIP	ATR Interacting Protein
BASC	BRCA1- Associated genome Surveillance Complex
BAK	BCL2-antagonist/killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BID	BH3 interacting domain death agonist
BLM	Bloom Syndrome
BUB1	Budding uninhibited by benzimidazole
BUB3	Budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog
BUBR1	Budding uninhibited by benzimidazole related
CA	Chromosome Aberration
CAK	CDKs Activating Kinase
CDC25	Cell division cycle 25 homolog C
CDK	Cyclin dependent kinase
CDH1	cadherin 1
CHFR	Checkpoint with forkhead and ring finger domains
CHK1/CHK2	Checkpoint kinase 1/2
CIT- C	Cytochrome C
c-MYC	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
Complejo FA	Fanconi Anemia Core Complex
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
dNTP's	Dinucleotide Triphosphate
DR5	Death Receptor 5
DSB	Double Strand Break

E2F	Transcription factor E2F
EME1	Essential meiotic endonuclease 1 homolog 1
ERK	Elk-related tyrosine kinase
FA	Fanconi Anemia
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FAS	TNF receptor superfamily, member 6
GADD45	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45
GPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3 β	Glucogen Sintase Kinase 3 β
H2AX	Histone 2AX
HDM2 (MDM2)	p53 binding protein; double minute 2
HSP70	Heat Shock Protein 70
HU	Hydroxiurea
IAP	Inhitor of Apoptosis
INCENP	Inner Centromeric Protein
INF γ	Interferon γ
MAD2	Mitotic Arrest Deficient 2
MDC1	DNA damage mediator
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MMC	Mitomycin C
MMP-7	Matrix Metalloproteinase- 7
MPF	Mitosis Promoting Factor
MRE11	Meiotic recombination 11 homolog A
MYT1	Myelin transcription factor 1
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1(nibrin)
NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2
NFKB	Nuclear factor kappa B
NO	Nitric Oxide
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
RPC	Replication Promoting Complex
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PCNA	Proliferatin Cell Nuclear Antigen
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
PIG3	Tumor protein p53 inducible protein 3

PIKK	Phosphoinositide 3-kinase-like kinase
PIP3	Plasma membrane intrinsic protein 3
PLK1	Polo-like kinase 1
Pol α	Polimerase α
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUMA	BCL2 binding component 3
RAD50	RAD50 homolog
RAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
Rb	Retinoblastoma
RFC	DNA Replication Factor C
RPA	Replication Protein A
RR	Ribonucleotide Reductase
SHC	SHC-adaptor protein
SHIP	Inositol polyphosphate-5-phosphatase
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
SMC1	structural maintenance of chromosomes 1A
SOD	Superoxide Dismutase
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TopoIII α	Topoisomerase III α
TP53	Tumor protein P53
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
USP1	Ubiquitin specific peptidase 1
WEE1	Wee1 tyrosine kinase
WIP1	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform
XPC	Xeroderma Pigmentosum C
ERCC1	Exccision repair cross-complementing rodent repair deficiency

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
1 INTRODUCCIÓN: QUÉ ES LA ANEMIA DE FANCONI (FA).....	4
1.1 CARACTERIZACIÓN A NIVEL CLÍNICO.....	4
1.1.1 <i>Diagnóstico</i>	4
1.1.2 <i>Manejo</i>	5
1.1.3 <i>Vigilancia</i>	5
1.1.4 <i>Cáncer</i>	5
1.2 CARACTERIZACIÓN A NIVEL CELULAR.....	6
1.2.1 <i>Sensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales</i>	6
1.2.2 <i>Otras características celulares en FA</i>	7
2 ANTECEDENTES DIRECTOS	8
2.1 LA SÍNTESIS DEL DNA DE LOS LINFOCITOS FA ESTA DISMINUIDA EN PRESENCIA DE HU CON RESPECTO A LAS CÉLULAS NORMALES SANAS	8
2.2 LA HU ES CAPAZ DE INDUCIR CA EN CÉLULAS FA	9
2.3 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA ANTE LOS TRATAMIENTOS CON MMC E HU	11
3 JUSTIFICACIÓN.....	13
4 OBJETIVO.....	13
5 DESARROLLO TEÓRICO.....	13
5.1 MECANISMOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR EN EUKARIONTES.....	13
5.1.1 <i>Ciclo celular y patrones de actividad de ciclinas y CDKs</i>	13
5.1.2 <i>Mecanismo general de respuesta ante el daño al DNA mediado por los puntos de monitoreo</i>	14
5.1.3 <i>La fase G1 y su punto de monitoreo</i>	15
5.1.4 <i>La fase S y su punto de monitoreo</i>	17
5.1.5 <i>La fase G2 y su punto de monitoreo</i>	19
5.1.6 <i>Punto de monitoreo de mitosis</i>	20

5.2	TIPOS DE MUERTE CELULAR.....	23
5.2.1	<i>Apoptosis</i>	24
5.2.2	<i>Autofagia</i>	26
5.2.3	<i>Necrosis</i>	26
5.2.4	<i>Catástrofe mitótica</i>	27
5.3	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA FA (LA VÍA FA/BRCA).....	28
5.3.1	<i>Señalización río arriba</i>	30
5.3.2	<i>Señalización río abajo</i>	30
5.3.3	<i>Respuesta al daño</i>	31
5.3.4	<i>Recombinación Homóloga</i>	32
5.3.5	<i>Síntesis Translesión (TLS) y Reparación Postreplicativa(PRR)</i>	36
6	DISCUSIÓN	39
6.1	LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES A PARTIR DE SUPERÓXIDO Y OXIDO NÍTRICO EN ANEMIA DE FANCONI Y SU RELACIÓN CON LA MUERTE CELULAR.....	40
6.2	EL DAÑO IRREPARABLE AL DNA DURANTE LAS FASES S Y G2 PUEDE CONDUCIR HACIA APOPTOSIS.....	46
6.3	LAS CÉLULAS FA PODRÍAN MORIR POR CATÁSTROFE MITÓTICA SI LOS PUNTOS DE MONITOREO DE LA INTEGRIDAD DEL DNA NO FUNCIONAN ADECUADAMENTE.	50
6.4	LA PROTEÍNA P53 Y EL PUNTO DE MONITOREO DE LA POLIPLOIDÍA EN G1 DEBE DETECTAR EL DAÑO HEREDADO EN LAS CÉLULAS Y ENVIAR HACIA APOPTOSIS	52
6.5	EL PROBABLE GIRO DE LA APOPTOSIS HACIA LA NECROSIS.	55
6.6	LA PROLIFERACIÓN COMO ALTERNATIVA	59
6.6.1	<i>Mecanismos por medio de los cuales el NO funcionaría como un factor involucrado en la inhibición de la muerte celular en la FA</i>	60
6.6.2	<i>Resistencia al daño al DNA por medio de ATM/DNA-PKcs y la PRR</i>	61
7	CONCLUSIONES	64
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RESUMEN

La Anemia de Fanconi (FA) es una enfermedad con heterogeneidad genética en el cual se han identificado 13 grupos de complementación, su herencia es autosómica recesiva en 12 de estos grupos y ligada al cromosoma X en solo uno. Las características clínicas más frecuentes son pancitopenia, hiperpigmentación de la piel, talla baja, malformaciones en miembros superiores y propensión a cáncer, sobre todo Leucemia Mieloide Aguda (AML). Las células FA son hipersensibles a agentes alquilantes bifuncionales, como la Mitomicina C (MMC) y recientemente se ha demostrado que la Hidroxiurea (HU), agente que estaciona la fase S del ciclo celular, puede también generar daño en estas células. Dadas estas características el objetivo de este trabajo fue realizar una investigación documental con miras a un futuro abordaje experimental de los mecanismos de muerte que seguirían las células FA al ser tratadas con MMC e HU en conjunto y por separado.

Las principales propuestas de este trabajo son las siguientes:

1º. Producción de Óxido Nítrico (NO) en las células FA después del tratamiento con MMC o HU. El NO puede tener un papel dual, uno de ellos sería activando la vía de p53 para arresto del ciclo celular o apoptosis, mientras que el otro sería bloquear la función de las proteínas mediadoras de la apoptosis y evitar así la muerte celular.

2º. Probablemente, los puntos de monitoreo de las células FA no sean del todo funcionales y permitan la asimilación del daño generado por la MMC en su DNA. Este proceso de asimilación sería mediado por las cinasas de la familia ATM/DNA-PKcs y las polimerasas de síntesis translesión. En cambio la adición de HU a células FA previamente dañadas con MMC provocaría su muerte al generar daño adicional no tolerable, en este caso la muerte podría ocurrir durante mitosis o después de una segregación cromosómica inapropiada.

3º. Si la producción de ATP se viera limitada durante el proceso apoptótico, las células se verían forzadas a morir por necrosis.

1 INTRODUCCIÓN: QUÉ ES LA ANEMIA DE FANCONI (FA).

1.1 CARACTERIZACIÓN A NIVEL CLÍNICO

La anemia de Fanconi (FA) fue descrita en 1927 por el pediatra suizo Guido Fanconi, se trata de una enfermedad genética que puede ser autosómica recesiva o ligada al cromosoma X. Los pacientes FA son homocigotos para mutaciones en uno de los al menos 13 genes responsables de la enfermedad descritos hasta ahora. La enfermedad generalmente se diagnóstica entre los tres y los siete años de edad, mientras que la esperanza de vida de los pacientes tiene un promedio de 20 años (Molina y Frias, 2006). La principal característica del padecimiento es la falla en la médula ósea, lo que conduce a pancitopenia; con leucopenia o trombocitopenia precediendo a la anemia (Taniguchi, 2008). La disminución de glóbulos blancos predispone a infecciones, la reducción de los glóbulos rojos produce anemia y la de plaquetas puede causar sangrado por coagulación deficiente (Molina y Frias, 2006). Los pacientes FA han sido divididos en los grupos A,B,C,D1,D2,E,F,G,H,I,J,L,M y todos ellos comparten las particularidades descritas. Otras características clínicas frecuentes son: hiperpigmentación de la piel, talla baja y malformaciones en miembros superiores; anormalidades en genitales, malformaciones vertebrales y espinales, como cuello corto, espina bífida y escoliosis; anormalidades renales, urinarias y oculares (Esmer *et al.*, 1999; Esmer *et al.*, 2004).

1.1.1 Diagnóstico.

El diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en la aparición de la anemia, haciéndose definitivo con el análisis citogenético de una muestra de sangre periférica en la cual se realiza la búsqueda de aberraciones cromosómicas (CA) tales como rompimientos o rearrreglos cromosómicos, en presencia de agentes alquilantes bifuncionales, por ejemplo Diepoxibutano (DEB) y Mitomicina C (MMC), los cuales inducen enlaces covalentes cruzados (ICL) entre las hebras del DNA (Auerbach 1993). Un total de 50 metafases se analizan para encontrar rompimientos cromosómicos y figuras radiales. Los resultados en frecuencia de CA se comparan con células normales sanas o células controles positivas que se cultivan en paralelo y expuestas a la misma concentración de DEB o MMC. (Taniguchi, 2008).

1.1.2 Manejo

El principal medio para el tratamiento de las manifestaciones de la enfermedad consiste en transfusiones sanguíneas (Molina y Frias, 2006); se pueden administrar andrógenos por vía oral (como la oximetolona), lo cual mejora el conteo de células sanguíneas en aproximadamente 50% de los individuos con FA; mientras que la administración subcutánea de factores de crecimiento hematopoyéticos mejora la cuenta de neutrófilos en algunos de ellos. Hasta ahora el trasplante de células madre hematopoyéticas es la única terapia curativa para las manifestaciones hematológicas de la FA, pero el riesgo de desarrollar tumores sólidos permanece. Todos los tratamientos son potencialmente tóxicos (Taniguchi, 2008).

1.1.3 Vigilancia

El seguimiento de los pacientes FA se hace mediante evaluaciones continuas de su crecimiento y desarrollo durante la pubertad. La falla en la médula ósea se monitorea mediante conteos regulares de células sanguíneas y con al menos una biopsia anual. Para los pacientes que reciben terapia a base de andrógenos es necesario realizar ultrasonidos y un perfil químico del hígado. Para prevenir posibles tumores sólidos se realizan estudios de cérvix, rectales, dentales y orofaríngeos (Taniguchi, 2008).

1.1.4 Cáncer

La mayor parte de los tumores asociados con FA se desarrollan después de los 13 años, con un promedio de edad de 23 años. De los 40 a 48 años el riesgo acumulativo estimado para el defecto en la médula ósea es del 90%, para neoplasias hematológicas del 10% al 33%, y para neoplasias no hematológicas del 28% al 29% (Kutler *et al.*, 2003, Rosenberg *et al.*, 2003). Para los pacientes FA el riesgo relativo de desarrollar Leucemia Mieloide Aguda (AML) se incrementa hasta 785 veces (Rosenberg *et al.*, 2003). Aproximadamente el 9% la desarrolla y el 7% evoluciona en síndrome mielodisplásico (Alter 2003). El riesgo de desarrollar tumores sólidos se incrementa, sobre todo para el caso de cáncer de cabeza y cuello, tracto genitourinario y cáncer cutáneo (Kutler *et al.*, 2003, Rosenberg *et al.*, 2003). Los pacientes que reciben tratamiento con andrógenos para tratar la deficiencia de la médula ósea se encuentran con mayor riesgo de desarrollar tumores de hígado (Kutler, 2003; Rosenberg,

2003). La deficiencia medular, el tratamiento de la anemia y la elevada susceptibilidad a desarrollar neoplasias son las principales causas del deceso de los pacientes FA (Joenje y Patel, 2001).

1.2 CARACTERIZACIÓN A NIVEL CELULAR

1.2.1 Sensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales

Los análisis citogenéticos revelan que las células de los pacientes FA son susceptibles a la generación de CA espontáneas (Frías *et al.*, 1984; Carnevale y Frías, 1985; Frías *et al.*, 1986; Esmer *et al.*, 2004). Para 1973, Sasaki y Tonomura mostraron que además las células de estos pacientes presentan un mayor número de CA cuando son expuestas a MMC, DEB o cisplatino, en esas células la frecuencia de CA aumenta hasta 10 veces más que la espontánea, mientras que en las células normales sólo se duplica dependiendo de la dosis. El tipo de aberraciones más frecuentes son las rupturas cromatídicas, cromosómicas y figuras de intercambio como trirradios y tetraradios (Figura 1), con menor frecuencia se observan translocaciones, cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos y fragmentos (Auerbach, 1989; Carnevale y Frías, 1985; Frías *et al.*, 1986; Esmer *et al.*, 2004). Las células FA disminuyen su tasa de proliferación al contacto con agentes como la MMC (Joenje *et al.*, 1995).

Aunque los mecanismos involucrados en la formación de las CA de manera espontánea siguen siendo una de las grandes incógnitas de la enfermedad, la evidencia ha sugerido que la susceptibilidad observada al rompimiento cromosómico puede ser adjudicada a una respuesta disminuida en las células de los pacientes FA a las rupturas cromosómicas de doble hebra (DSB) y a la generación de ICL entre las hebras del DNA, lo que se ha evidenciado exponiendo a sus células a agentes alquilantes bifuncionales (Escarceller *et al.*, 1997).

1.2.2 Otras características celulares en FA

Además de la sensibilidad a los agentes alquilantes bifuncionales las células FA muestran las siguientes características:

- Hipersensibilidad a las concentraciones elevadas de oxígeno y a las especies reactivas del oxígeno (ROS), que elevan el número de CA, disminuyen la tasa de proliferación y detienen el ciclo celular en la fase G2 (Joenje y Oostra, 1983; Joenje y Patel, 2001).
- Baja producción de Interleucina 6 (IL-6) y concentraciones elevadas del Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), inductor de apoptosis (Rosselli *et al.*, 1992).
- Incremento en la duración del ciclo celular, debido a la prolongación de la fase G2 (Dutrillaux *et al.*, 1982).
- Hipersensibilidad a la Hidroxiurea (HU), agente inhibidor de la enzima Ribonucleótido Reductasa (RR) encargada de la síntesis de nucleótidos difosfato (dNTPs) indispensables para los procesos de replicación y reparación del DNA (Frias *et al.*, 1996).

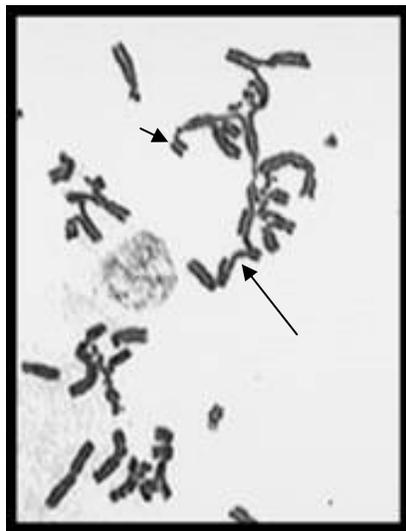


FIGURA 1. Efecto de la MMC sobre los cromosomas de un paciente FA. **A.** Rupturas. **B.** Figuras Radiales.

2 ANTECEDENTES DIRECTOS

A continuación se describen de modo breve los hallazgos que han motivado la generación de este escrito y que darán paso a la discusión de los mecanismos de muerte celular propuestos para las células FA en las secciones subsecuentes.

2.1 La síntesis del DNA de los linfocitos FA esta disminuida en presencia de HU con respecto a las células normales sanas

Para investigar la participación de las reservas de dNTPs en la inhibición de la síntesis del DNA en la FA, Frias *et al* (1996) evaluaron el efecto de la adición de HU, un inhibidor de la RR en linfocitos FA, con esto se buscó alterar los niveles intracelulares de desoxirribonucleótidos. Se utilizaron cultivos de 4 pacientes FA y cuatro de individuos normales. Los cultivos fueron tratados con HU y/o MMC y plasma humano normal. Todos los cultivos fueron procesados para detectar el número de núcleos en fase de síntesis por medio de autorradiografía. Se llevo a cabo el análisis de 2000 núcleos de cada tipo celular por 6 horas durante las últimas 24 horas de incubación, y se mostró que, durante periodos de incubación largos, la síntesis del DNA de las células FA es ampliamente inhibida por la HU (Figura 2) y que esta hipersensibilidad podría disminuir al adicionar plasma humano normal. Se sabe que las células FA son deficientes en la detoxificación del oxígeno y que esto podría explicar la respuesta de las células FA a la HU.

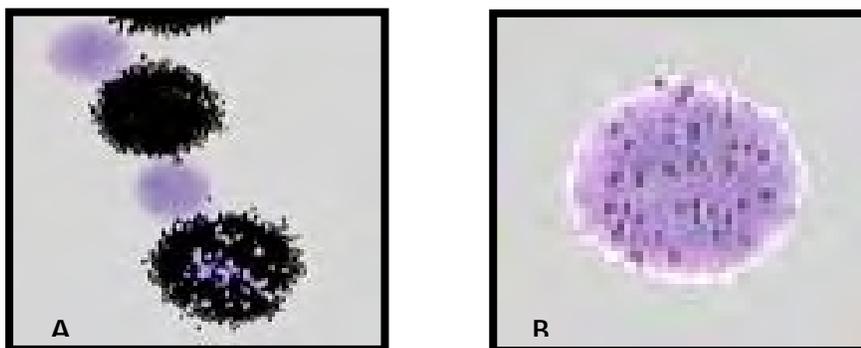


FIGURA 2. Incorporación de Timidina triteada durante la síntesis del DNA en linfocitos de pacientes FA sin clasificar. A. La síntesis sin HU se muestra normal. B. En presencia de HU hay una escasa incorporación de

timidina triteada tanto en las células normales como FA, sin embargo, el número de células que entra a síntesis en FA es significativamente menor.

Frias *et al.*, 1996

2.2 La HU es capaz de inducir CA en células FA

Las células de los pacientes FA no solo son hipersensibles a los agentes alquilantes bifuncionales, sino que además la HU es capaz de afectar la síntesis del DNA en los linfocitos de estos pacientes y activar la vía de respuesta a los ICL conocida actualmente como vía FA/BRCA, la cual se encuentra interrumpida en los pacientes FA. Sin embargo los efectos de la HU a nivel cromosómico no habían sido investigados. En este estudio, Molina *et al* (2009) evaluaron la respuesta a la HU de linfoblastos humanos de los grupos de complementación de FA: A, B, C, D1, E y una línea celular normal (INP 6846), esto se hizo al analizar el índice mitótico (MI) (Tabla II), la sobrevivencia celular y las CA (Tabla I). Cada línea celular fue tratada bajo tres condiciones: a) 10 ng/ml de mitomicina C por 24h, b) 2mM HU por 3 horas, y c) mitomicina C por 24 horas más HU por 3 horas.

Se encontró que la HU afectaba la sobrevivencia celular de las células FA, con una IC50 a 0.04mM, mientras que la IC50 de los grupos de complementación FA-B,C,D1,E y la línea normal fue de 0.1mM. La exposición a la HU por solo 3 horas durante la fase G2 disminuyó significativamente el MI en la línea FA-B e incremento el numero de CA en todas las líneas FA. Cuando las células previamente dañadas con MMC fueron tratadas con HU durante la fase G2, las CA aumentaron de modo no significativo en la línea celular normal, mientras que en las células FA aumentaron de modo significativo, particularmente en las líneas celulares FA-A y B en las que la frecuencia de CA fue hasta 3 veces más grande ($p < 0.02$) que la suma independiente de los tratamientos de HU o MMC (Tabla I y Figura 3). Estos resultados muestran que la HU induce una actividad clastógena que involucra un mecanismo postreplicativo el cual requiere de una vía FA/BRCA normal, esto indicado por las diferencias significativas en las CA observadas entre las líneas FA y normal. Este mecanismo es diferente al ya descrito para la HU, y podría estar relacionado con la reparación del DNA o resistencia al daño.

Tabla I. Frecuencia de CA en líneas celulares linfoblastoides de FA y normales.

Línea celular	Sin Tratamiento	HU	MMC	MMC+HU
Normal (INP-6846)	0.05±0.03	0.21±0.06	0.11±0.03	0.33± 0.16
FA-A	0.15±0.06	0.89± 0.14	3.05±1.04	12.8±1.99
FA-B	0.31±0.09	0.89±0.16	4.06±0.56	12.6±2.41
FA-C	0.29±0.06	0.84±0.21	1.95±1.55	3.05±1.48
FA-D1 (BRCA2)	0.33±0.11	1.02±0.35	3.0±0.3	6.65±1.16
FA-E	0.27±0.03	0.56±0.24	1.64±0.16	3.86±0.24

Se indican la Media y la Desviación Estándar. Experimentos por triplicado. HU (Hidroxiurea 2 mM), MMC (Mitomicina C 10ng/ml). **Negritas**= Aumento significativo del daño cromosómico.

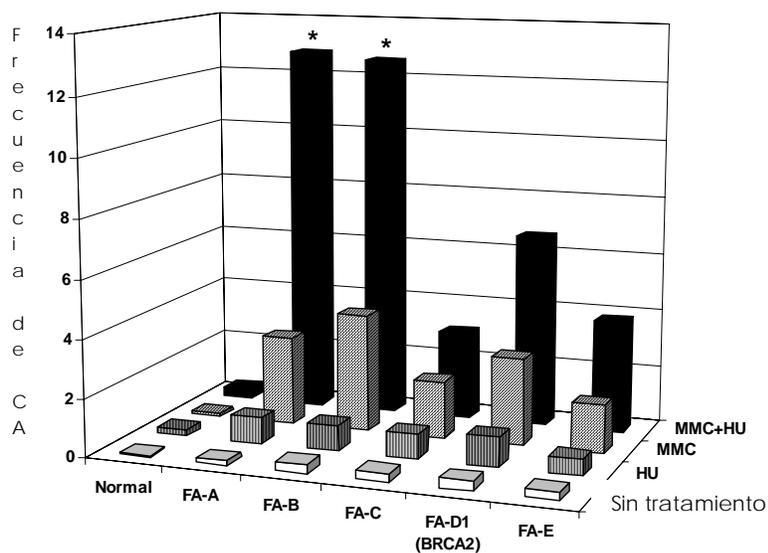


Figura 3. Se observa el incremento de CA en las células FA con el doble tratamiento (MMC + HU), al compararlo con las líneas celulares normales y el tratamiento con los agentes por separado. El * señala el incremento de CA en las líneas más sensibles.

Tabla II. MI de las líneas celulares normal y FA tratadas con HU y/o MMC

Línea celular	Sin tratamiento	HU	MMC	MMC + HU
Normal (INP-6846)	2.4±0.2	1.8±0.14	2.9±0.5	1.2±0.2
FA-A	3.4±0.9	0.8±0.3	3.8±1.0	3.4±0.3
FA-B	3.1±0.1	1.7±0.1	4.1±0.1	2.8±0.3
FA-C	1.2±0.1	0.9±0.3	1.7±0.6	1.4±0.6
FA-D1 (BRCA2)	2.7±1.2	1.7±0	2.9±0.1	2.3±0.6
FA-E	1.6±0.1	1±0.14	2.3±0.2	1.7±0.4

Se muestran la media y la desviación estándar. Experimentos por triplicado. HU (Hidroxiurea 2 mM), MMC (Mitomicina C 10ng/ml). La línea más sensible a los cambios en su MI es la línea FA-B.

Molina *et al.*, 2009

2.3 Cambios en la expresión génica ante los tratamientos con MMC e HU

A pesar de que se han reportado interacciones funcionales entre proteínas específicas de la vía FA/BRCA y las proteínas de respuesta al daño al DNA, sus modos de interacción aún no han sido del todo aclarados. Muchas de las proteínas de respuesta al daño al DNA son reguladas transcripcionalmente por la proteína supresora de tumores p53, sugiriendo un papel regulatorio importante para la vía de respuesta al daño y la respuesta al estrés. Para entender mejor la asociación entre la vía FA/BRCA y la respuesta ante al daño al DNA, Martínez *et al* (2009) analizaron la transcripción génica en líneas celulares linfoblastoides derivadas de individuos sanos y pacientes FA-A; asimismo realizaron un análisis de CA ante MMC o HU. Se evaluó la respuesta transcripcional de 21 genes de respuesta al daño al DNA usando PCR- Tiempo real cuantitativo. Las líneas FA-A mostraron un incremento significativo en el nivel de CA después del tratamiento con MMC. El daño en el DNA generado por la MMC correlacionó con un aumento en la expresión de los genes modulados por la vía de p53 involucrados en procesos como reparación de daño al DNA, apoptosis y progresión del ciclo celular. Después del tratamiento con HU, las células FA mostraron una disminución de las CA con muchas menos diferencias transcripcionales entre los genes blanco. Estos resultados

muestran una conexión regulatoria entre la vía FA/BRCA y la activación de TP53 para responder al daño al DNA.

Tabla III. Cambios en la expresión génica entre las células linfoblastoides normales y las FA-A expuestas a MMC o HU.

	NL	FA-A	EXPRESIÓN	NL	FA-A	EXPRESIÓN
TP53	1.1±0.1	1.9±0.5*	+	1.1±0.2	1.4±0.2	ND
Genes regulados transcripcionalmente por TP53						
BLM	1.3±0.4	3.5±2.0	+	2.0±0.4*	1.4±0.3	-
CDKN1A	1.4±0.3	2.7±0.3*	+	5.0±1.9*	2.8±0.4*	-
DDB2	1.5±0.4	2.3±0.8*	+	1.6±0.5*	1.6±0.3*	SD
GADD45A	1.1±0.1	2.0±0.4*	+	3.3±0.5*	2.8±0.3*	SD
MDM2	1.3±0.2	1.8±0.6	SD	1.7±0.3*	1.6±0.1*	SD
PCNA	1.2±0.2	2.5±0.3*	+	1.7±0.2*	2.1±0.5*	SD
RRM2B	1.4±0.4	1.6±0.5	SD	1.6±0.4*	1.7±0.6*	SD
SGK	1.2±0.2	2.2±0.7*	+	1.7±0.2*	1.8±0.3*	SD
TP53I3 (PIG3)	1.4±0.3	2.8±0.7*	+	1.5±0.3	1.5±0.2	SD
TR1AP1	1.1±0.2	3.7±0.9	+	1.9±0.4*	2.1±0.3*	SD
TNFRSF10B(DR5)	1.1±0.2	2.2±1.0	+	1.6±0.2*	2.1±0.3*	SD
XPC	1.1±0.2	3.0±1.6	+	2.0±0.4*	1.9±0.3*	SD
Genes regulados indirectamente por TP53						
CCNB1	1.0±0.1	2.8±1.0*	+	0.5±0.1	0.9±0.2	SD
HSPA8	1.1±0.2	2.6±0.7*	+	1.1±0.01	1.6±0.3*	SD
RB1	1.3±0.4	1.9±0.9	+	1.2±0.5	1.5±0.4	SD
Genes no regulados por TP53						
ABCB1	1.0±0.3	1.7±1.0	+	1.1±0.1	1.5±0.5	SD
MYC	0.8±0.1	1.2±0.2	SD	0.7±0.1	1.3±0.3	SD
NFKB1	1.1±0.2	1.4±0.3	SD	1.2±0.1	1.7±0.4*	SD
NFKB1A	1.0±0.1	1.0±0.2	SD	1.4±0.2	1.8±0.2*	SD
SOD1	0.9±0.1	1.9±0.4*	+	1.2±0.1	1.1±0.5	SD

+ = Expresión aumentada, - = Expresión disminuida, y **SD**= Sin diferencias, en los transcritos de las células FA-A relativo a las células normales. *Genes que muestran cambios significativamente diferentes en expresión relativa a las células del mismo tipo sin tratamiento. Los valores representan el cambio en veces de expresión o "fold change" de 3 replicas. El fold change se calculó con respecto a las células del mismo tipo sin tratamiento.

Martínez et al., 2008

3 JUSTIFICACIÓN

La FA ha ganado relevancia como modelo para investigar los mecanismos por medio de los cuales las células pueden enfrentar el daño generado por los ICL en su DNA. Se sabe que las células FA comparadas con las células normales son altamente sensibles a los agentes que inhiben la síntesis del DNA, como HU y la MMC que además genera enlaces interhebra en la molécula del DNA; sin embargo el mecanismo por medio del cual estos agentes podrían conducir a la muerte celular no ha sido abordado.

4 OBJETIVO

Realizar una investigación documental con miras a un futuro abordaje experimental de los mecanismos de muerte que seguirían las células FA al ser tratadas con MMC e HU en conjunto y por separado.

5 DESARROLLO TEÓRICO

El siguiente paso en este trabajo sería describir a la vía de reparación del DNA que se encuentra interrumpida en la FA (la vía FA/BRCA), sin embargo dado que algunos de los participantes de este vía interactúan con el control de la progresión del ciclo celular primero abordaremos este proceso.

5.1 MECANISMOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR EN EUCARIONTES

5.1.1 Ciclo celular y patrones de actividad de ciclinas y CDKs

Para su estudio el ciclo celular ha sido dividido en 2 etapas: la interfase, conformada por 3 fases G1, S y G2 y la fase M, durante la cual ocurren la segregación cromosómica y la citocinesis. La progresión del ciclo celular se regula por la actividad de las Cinasas Dependientes de Ciclina (CDKs), las cuales actúan como cinasas de otras proteínas reguladoras del ciclo celular, marcando de este modo la progresión de una fase del ciclo a otra. Las CDKs alcanzan su forma activa al formar heterodímeros con ciclinas reguladoras. La

expresión de las ciclinas es un factor limitante para la activación de las CDKs. En general los niveles de ciclinas se determinan por control transcripcional y su proteólisis a través del sistema de ubiquitina-proteosoma (van den Heuvel, 2005).

La expresión de la ciclina D1 y su unión con las CDK4/6 estimula la entrada al ciclo celular, sus niveles se mantienen altos mientras haya agentes mitogénicos. La ciclina E y la CDK2 son requeridas en la transición G1/S, lo que las vuelve necesarias para la entrada a la fase de síntesis. La ciclina A y la CDK2 se requieren para el inicio de S y la transición de G2/M, mientras que la ciclina B y la CDK2 regulan la entrada y salida de mitosis (Massagué, 2004; van den Heuvel, 2005) (Figura 4).

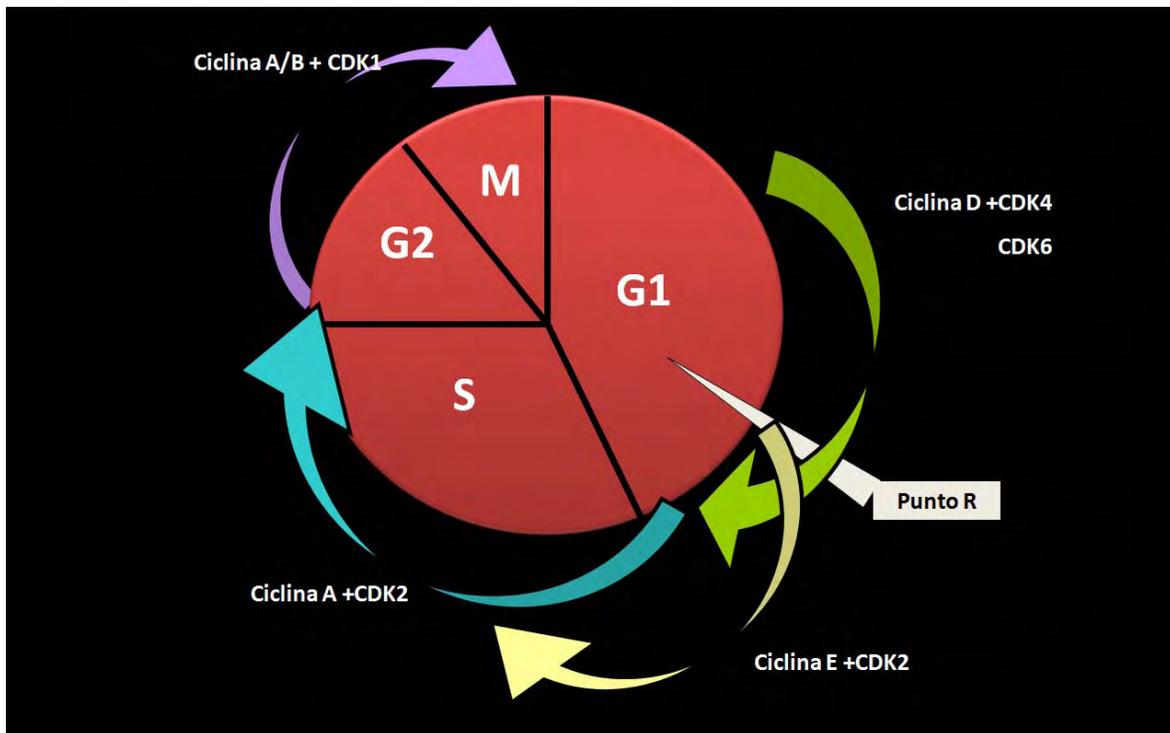


FIGURA 4. Patrón de actividad de las CDKS y las ciclinas a lo largo del ciclo celular.

5.1.2 Mecanismo general de respuesta ante el daño al DNA mediado por los puntos de monitoreo

Además de las ciclinas y las CDKs, existen rutas proteicas que regulan la progresión del ciclo celular, conocidas como puntos de monitoreo, puntos de arresto o "checkpoints". Se han

identificado en todas las fases del ciclo celular incluida la mitosis y detienen la progresión del ciclo hasta que no existen errores genómicos, como rupturas y aductos en el DNA o problemas en la segregación cromosómica (Kastan y Bartek, 2004).

Entre las proteínas de localización de daño en el DNA, la cinasa ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) colabora en la detección de los rompimientos de cadena sencilla o cadena doble; mientras que la cinasa ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related) responde ante daño inducido por luz UV, agentes alquilantes y en caso de horquillas de replicación arrestadas (Castedo *et al.*, 2004; Unsal-Kacmaz y Sancar, 2004). Para propagar de modo eficiente la señal de alerta iniciada por estas cinasas se requiere de la cooperación de proteínas mediadoras del punto de monitoreo (también conocidos como adaptadores) y las cinasas transductoras CHK1 (Checkpoint kinase 1) y CHK2 (Checkpoint kinase 2).

Los mediadores relacionados con la señalización por ATM incluyen a MDC1(DNA damage mediator), 53BP1(Tumor protein p53 binding protein 1) y las proteínas BRCA (Breast Cancer Protein) (Kastan y Bartek, 2004; Xu y Stern, 2003; Minn *et al.*, 2003). ATM/ATR se involucran en el reclutamiento inicial de las proteínas mediadoras y las proteínas efectoras al sitio del daño, además son las responsables de la fosforilación de la histona H2AX (γ -H2AX), esta modificación post-traducciona se incrementa en respuesta a daño exógeno; marcando así la región de la cromatina que flanquea cada rompimiento, lo que permite el reclutamiento de las proteínas de reparación (McManus *et al.*, 2005). Las tres proteínas mediadoras además de activarse por ATM permiten la fosforilación del complejo MRN, conformado por MRE11(meiotic recombination 11 homolog A), NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1) y RAD50 (RAD50 homolog), este complejo inicia el proceso de reparación del DSB mediante recombinación homóloga (Kastan y Bartek, 2004; Xu y Stern, 2003; Minn *et al.*, 2003).

5.1.3 La fase G1 y su punto de monitoreo

En la fase G1 la actividad de las CDKs se controla por señales positivas (factores crecimiento, de sobrevivencia y mitogénicas) y negativas (apoptóticas, citostáticas, genotóxicas, estrés oncogénico, metabólico u oxidativo) (Massagué, 2004), entre estas destaca la cascada de señalización de las Cinasas de Proteínas Activadas por Mitógeno (MAPK) que activa y

estabiliza a c-MYC (Myelocytomatosis viral oncogene homolog), uno de muchos factores de transcripción, inductor de la expresión de la ciclina D1 y supresor de la actividad de los inhibidores de las CDKs, como p21 y p27 (Massagué, 2004). Esta fase se mantiene al evitar la unión de las CDK2 a la ciclina E, limitando las provisiones de la ciclina E. Una vez que las señales mitogénicas intervienen, la ciclina D se estabiliza conduciendo al aumento de la expresión de la ciclina E y se da inicio a la transición G1/S. La regulación de la ciclina E se lleva a cabo por la ciclina D y permite la transcripción de su gen. Este paso es conocido como “punto de restricción del ciclo celular” y al traspasarse, la célula se compromete a llevar a cabo una ronda de replicación y división celular (Bartek *et al.*, 1997; Sears y Nevins, 2002 ; Stevaux y Dyson, 2002).

Durante la fase G1 el punto de monitoreo responde a través de la vía ATM/ATR – CHK1/CHK2 – p53/MDM2 (p53 binding protein; double minute 2) – p21 (Figura 5). Al fosforilar directamente a p53 se activa al inhibidor de las CDKs: p21, que silencia al complejo promotor de la transición G1/S compuesto por ciclina E/CDK2 (Kastan y Bartek, 2004; Massagué, 2004). La ligasa de ubiquitinas MDM2, que normalmente se une a p53 y controla su acción, se fosforila por acción de ATM/ATR y CHK1/CHK2 con lo cual pierde su función, con esto p53 se acumula e incremento su actividad como factor de transcripción (Maya *et al.*; 2001). CHK1/CHK2 inactivan por medio de fosforilación a la proteína CDC25A miembro de la familia de fosfatasas CDC25 (Cell division cycle 25 homolog) que regulan la entrada y progresión a lo largo de las fases del ciclo celular, de este modo modulan su abundancia y evitan que active al complejo ciclina E/CDK2 al desfosforilarlo (Kitagawa *et al.*; 2004). A pesar de que la fosforilación de CDC25A y de p53 es casi simultánea, la cascada de degradación de CDC25A es el proceso más rápido, pues no requiere de la síntesis y acumulación de nueva proteína, como en el caso de la vía de p53 (Massagué, 2004).

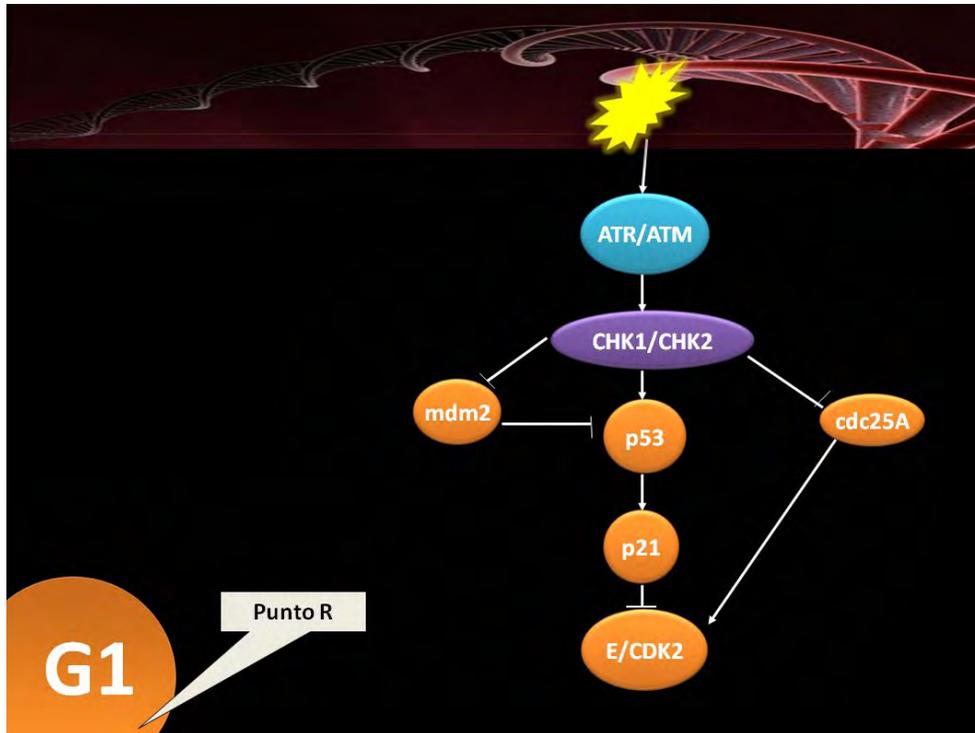


FIGURA 5. Cascada de señalización activada por el punto de monitoreo de la fase G1 ante daño en el DNA.

5.1.4 La fase S y su punto de monitoreo

La replicación del DNA se promueve por las CDKs de G1, siendo las principales la CDK4 y la CDK2, ésta última se une a las ciclinas tipo E y A. Después de la activación de CDK2, el complejo promotor de la replicación (RPC) recluta a las helicasas del DNA, a las primasas y a las polimerasas, relajando la doble hebra del DNA y permitiendo la replicación (Kelly y Brown, 2000; Prasanth *et al.*, 2004).

El punto de monitoreo de fase S se activa por daño genotóxico y genera una inhibición temporal y reversible de la activación de los orígenes de replicación que aún no se inician. Los mecanismos de este punto de monitoreo vuelven lenta la síntesis del DNA y se controlan por las cinasas ATM/ATR. Uno de estos mecanismos conduce a la degradación de CDC25A con lo cual se bloquea la actividad de la CDK2, así se evita que la proteína CDC45 se una a la cromatina, CDC45 se requiere para el reclutamiento de la DNA polimerasa α en los complejos de pre-replicación ya ensamblados, así que la inhibición de la actividad de la CDK2 previene la iniciación de la síntesis de DNA (Bartek y Lukas, 2003; Bartek y Lukas, 2004). Otro

mecanismo al parecer se activa gracias a la fosforilaciones que sufre la proteína SMC1 (Structural maintenance of chromosomes 1A) por parte de ATM, la cual se media por NBS1, esta vía depende de la función de las proteínas BRCA1 y FANCD2 (Kastan y Lim, 2003). Finalmente p53 puede funcionar como factor de transcripción para la proteínas p21, el cual bloquea la unión de la proteína PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) en los orígenes de replicación, esta proteína es importante porque funciona como cofactor de la polimerasa Delta (Pol y favorece la síntesis del DNA, de este modo se evita la síntesis del DNA (Figura 6).

Además de prevenir la activación de los orígenes de replicación, otra función crítica adjudicada al punto de monitoreo de S es proteger la integridad de las horquillas de replicación arrestadas. Este mantenimiento de la estabilidad de la horquilla de replicación, ayudaría a prevenir la conversión de lesiones primarias en rupturas del DNA y facilitar el restablecimiento de su replicación (Osborn *et al.*, 2002; Bartek *et al.*; 2004), el cual estaría mediado por las proteínas de la vía FA/BRCA, el cual se explicará más adelante.

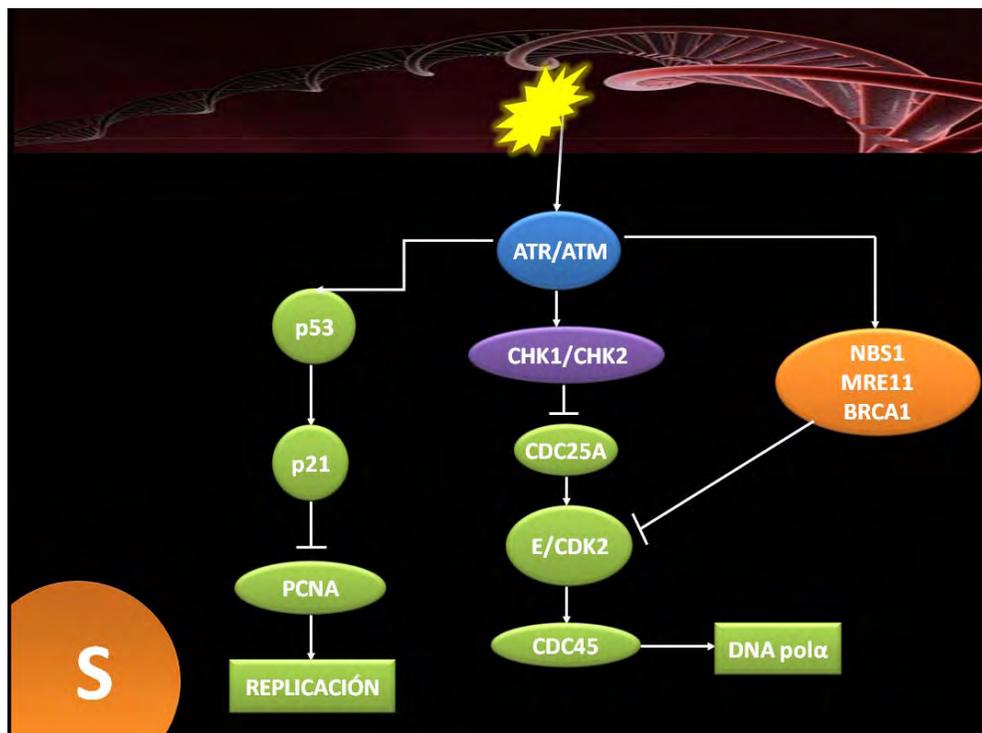


Figura 6. Cascada de señalización activada por el punto de monitoreo de la fase S ante daño en el DNA.

5.1.5 La fase G2 y su punto de monitoreo

La fase G2 es un intervalo en el que se llevan a cabo los procesos previos a la división celular entre los que se incluyen la corrección de los errores ocurridos durante la replicación (Massagué, 2004), las proteínas de su punto de monitoreo dan un alto al ciclo celular en presencia de estos errores. El blanco crítico del punto de monitoreo de G2 es la actividad del complejo compuesto por ciclina B/CDK1, conocido como Factor Promotor de la Mitosis (MPF), este complejo dirige la transición G2/M y al estar activo fosforila aproximadamente 70 sustratos durante G2 y mitosis temprana, conduciendo así a la separación de los centrosomas, fosforilación y activación de enzimas reguladoras de la condensación de la cromatina, fosforilación de la histona H1, ruptura de membrana nuclear y reorganización del citoesqueleto de microtúbulos y de actina para la mitosis. Su actividad se regula a nivel transcripcional gracias a p53, que mantiene la transcripción de CDK1 estable durante todo el ciclo celular y la de Ciclina B estabilizada desde finales de fase S. La fosforilación de Thr161 por la CAK es estrictamente necesaria para que CDK1 se active, Su actividad también se regula por las fosforilaciones que sufre CDK1, por las cinasas MYT y WEE1, las cuales inhiben su actividad durante la fase G2, probablemente a través de un efecto directo sobre la actividad fosfotransferasa; mientras que la desfosforilación de CDK1 por la fosfatasa CDC25C desinhibe a CDK1 durante la mitosis temprana (van den Heuvel, 2005).

La activación del MPF puede ser inhibida por la señalización a través de ATM/ATR, CHK1/CHK2 y/o el secuestro subcelular, degradación y/o inhibición de la fosfatasa CDC25C por parte de CHK1/CHK2 (la fosfatasa CDC25C puede activar al complejo MPF en el límite de las fases G2/M). Las cinasas CHK1/CHK2 pueden activar a su vez a WEE1 (regulador negativo de ciclina B/CDK1) y a través de p53 a GADD45 que secuestra a ciclina B, evitando su entrada al núcleo y la formación del complejo o a o 14-3-3 σ que también bloquea la función de la fosfatasa CDC25C. Además, se han detectado otros reguladores río arriba de CDC25 y MPF, tales como las cinasas tipo Polo PLK3 y PLK1 (Kastan y Bartek, 2004). La actividad de CDK1 puede inhibirse directamente por p21. La salida de metafase se caracteriza por la caída crítica de los niveles del MPF debido a su destrucción (van den Heuvel, 2005).

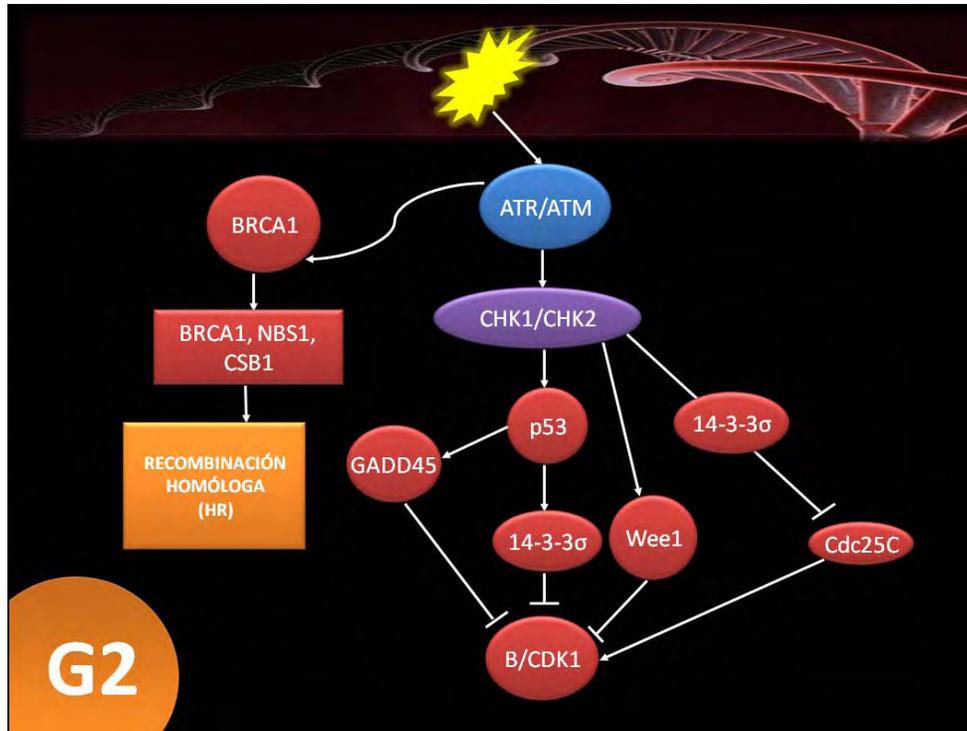


FIGURA 7. Cascada de señalización activada por el punto de monitoreo de la fase G2 ante daño en el DNA.

5.1.6 Punto de monitoreo de mitosis

El punto de monitoreo mejor conocido de mitosis se ha denominado SAC (Punto de monitoreo del ensamblaje del huso mitótico) o punto de monitoreo mitótico. El SAC se activa cada ciclo celular durante mitosis y funciona retrasando la entrada a anafase hasta que todos los cromosomas estén correctamente anclados por el huso mitótico en la placa metafásica, biorientados y con la suficiente tensión (Musacchio y Salmon, 2006). Cuando no se detectan problemas, la segregación cromosómica ocurre gracias a la unión del cofactor proteico CDC20 al APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome), activándolo. APC/C es una ligasa de ubiquitinas que funciona en mitosis transfiriendo tres ubiquitinas a la ciclina B1 y a la proteína Securina, marcándolas de este modo para su degradación vía proteosoma 26S. La Securina se encarga de mantener secuestrada a la proteasa conocida como Separasa. Cuando la Separasa se libera lleva a cabo la degradación de la cohesina que mantiene unidas a la cromátidas hermanas permitiendo la separación de los cromosomas y la degradación de la Ciclina B1 lo que resulta en la inactivación de la CDK1, gracias a lo cual se consigue salir de mitosis (Figura 8A) (Pines y Rieder, 2001; Musacchio y Salmon, 2006). En el caso

contrario, la señal proveniente de cinetocoros no anclados induce el reclutamiento de las proteínas del punto de monitoreo: MAD2 (Mitotic Arrest Deficient 2), BUBR1 (Budding uninhibited by benzimidazole related) y BUB3 (Budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog), que unidas darán lugar al Complejo del punto de monitoreo mitótico (MCC), el cual secuestrará a CDC20 para prevenir la activación del complejo APC/C. De este modo la Securina no será marcada para su degradación, la Separasa no se liberará y los cromosomas no segregarán (Figura 8B) hasta que los requerimientos del SAC se satisfagan (Pines y Rieder, 2001; Musacchio y Salmon, 2007; Pérez de Castro *et al.*, 2007).

Aún a pesar del grado de especialización del SAC, éste no es capaz de reconocer las uniones merotéticas entre los cromosomas y el huso mitótico, así que la actividad del complejo CPC (Complejo Pasajero Cromosomal) es indispensable para la reparación de las uniones erróneas cinetocoro-microtúbulo. Al complejo CPC lo conforman las proteínas Survivina, Borealina, INCENP (Centromeric Protein) y la Aurora B. La Aurora B podría detectar y desestabilizar las uniones erróneas entre los microtúbulos y los cinetocoros, así genera cinetocoros no anclados que al ser detectados por el SAC conducen al arresto de la mitosis (Ditchfield *et al.*, 2003; Kops *et al.*, 2005; Musacchio y Salmon, 2007; Pérez de Castro *et al.*, 2007).

La progresión a través de la mitosis también se regula por la actividad del complejo APC/C (Peters, 2006). Mientras que la actividad de APC/C-CDC20 se controla por el SAC; otro complejo formado también por APC y la proteína CDH1 (cadherin 1): APC/C-CDH1 se activa en la mitosis tardía, permanece activo a través de la fase G1 siguiente y la regula (Kops *et al.*, 2005; Musacchio y Salmon, 2007; Pérez de Castro *et al.*, 2007).

Si el ciclo celular progresa adecuadamente y los errores a lo largo de la interfase o la mitosis se detectaron y corrigieron, la célula segregará sus cromosomas, por lo que una nueva fase G1 dará inicio. Al final de la fase M, la caída en la actividad de la CDK1 permite que a los sitios en el DNA conocidos como orígenes de replicación se una con el denominado complejo pre-replicativo (CPR) (Kelly y Brown, 2000; Prasanth *et al.*, 2004). Este complejo contiene al complejo del origen de replicación (ORC), la Cinasa CDC6/18, Ciclina E/CDK2 y al Complejo

1 dependiente de Cdc-10 (CDT1) además se unen al DNA las proteínas MCM que regulan a estos sitios para el próximo inicio de la replicación (Massagué, 2004); así se reinicia el ciclo.

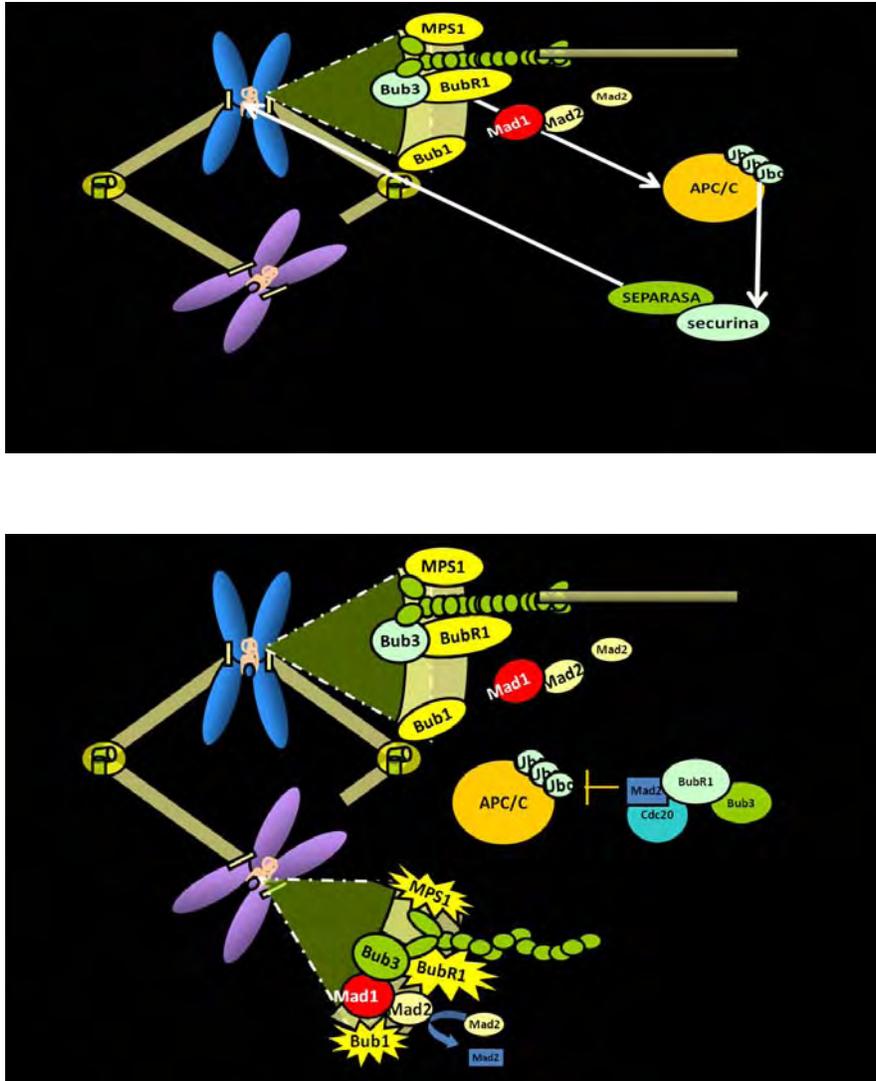


FIGURA 8. Mecanismo de activación del SAC ante cromosomas no anclados a microtúbulos. A. Cuando los cromosomas están anclados correctamente ocurre la segregación cromosómica. B. Cuando un cromosoma no se encuentra anclado el SAC se activa.

5.2 TIPOS DE MUERTE CELULAR

Los estudios relacionados a la muerte celular programada tienen su inicio en los trabajos de Kerr (1972) quien utilizó el término apoptosis para denominar al mecanismo por medio del cual los metazoarios pueden eliminar células redundantes, dañadas o infectadas. Estos y otros estudios utilizaron principalmente criterios morfológicos, gracias a los cuales se logró reconocer tres tipos básicos de muerte celular: la apoptosis, la autofagia y la necrosis (Figura 9A, B y C). Con el advenimiento de las herramientas moleculares se estableció para cada uno de estos tipos de muerte celular una ruta bioquímica específica que dio respuesta al fenotipo celular observado y han llegado a definirse nuevos mecanismos involucrados con la muerte celular, como la catástrofe mitótica (Figura 9D).

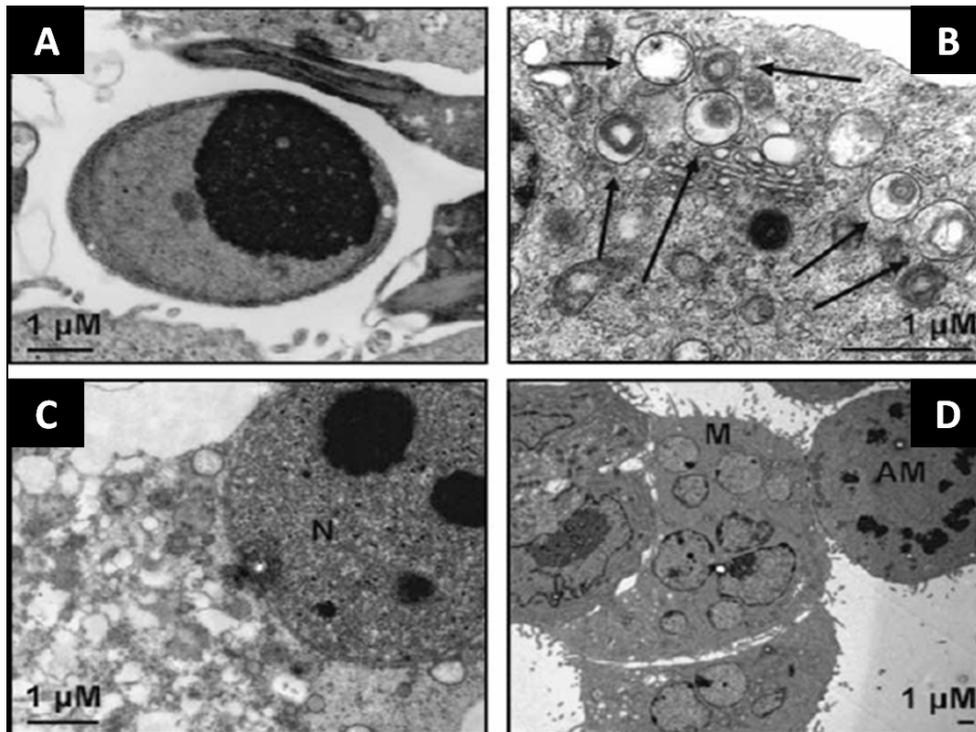


FIGURA 9. Micrografías electrónicas de A. Autofagia, B. Necrosis, C. Apoptosis, D. Catástrofe mitótica. Tomado de Kroemer *et al.*, 2005.

Los descubrimientos de cientos de moléculas involucradas en la muerte celular han conducido a que la clasificación se complique; además posibles traslapes de las rutas bioquímicas o la combinación de mecanismos de muerte celular, antes no contemplados, parecen ahora

posibles. Debido a esta dificultad, el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD), creado en 2005, ha propuesto que la clasificación de la muerte celular se realice utilizando únicamente criterios morfológicos, debido sobre todo a la ausencia de una relación absoluta entre la bioquímica y los cambios ultraestructurales que se observan en una célula considerada muerta. Es decir, se puede observar una morfología similar en dos células sin que hayan pasado por exactamente el mismo proceso. La clasificación de los tipos de muerte celular define la apariencia morfológica, más no los mecanismos por medio de los cuales se llegó a ésta. Dado que la muerte celular define la principal característica de los pacientes con FA: la pancitopenia; las proteínas FA han sido ligadas a los mecanismos de muerte celular.

5.2.1 Apoptosis

Los cambios morfológicos que definen la apoptosis (Figura 9C) incluyen la picnosis nuclear (condensación de la cromatina) y la cariorrhexis (fragmentación nuclear) (Kroemer *et al*, 2005). Las células apoptóticas dan lugar a pequeños cuerpos redondos rodeados por membrana que contienen organelos citoplásmicos intactos o fragmentos nucleares, conocidos como cuerpos apoptóticos, que resultan de la condensación celular progresiva y de la formación de vacuolas. Eventualmente los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células residentes vecinas. Los análisis bioquímicos tales como la activación de Caspasas y fragmentación del DNA no deben tomarse como eventos determinantes para definir a la apoptosis, pues este tipo de muerte puede ocurrir sin fragmentación oligonucleosomal del DNA así como sin la activación de Caspasas (Kroemer *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2007).

Se han esbozado dos rutas bioquímicas por medio de las cuales las células pueden ser conducidas hacia la apoptosis, conocidas como la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis. La vía extrínseca se activa por la unión del TNF (Tumor Necrosis Factor), o el ligando FAS (TNF receptor superfamily, member 6), miembros de una familia de ligandos de muerte celular, a sus receptores presentes en la superficie celular. De este modo alguno de los receptores ya mencionados, la proteína adaptadora que puede ser FADD (para FAS) o TRADD (para TNF), y la Procaspasa 8 o 10, conforman el denominado complejo DISC. Este complejo podrá activar a las Caspasas efectoras 3, 6 y 7 que llevarán a cabo su acción de

proteasas de cisteínas, cortando residuos de aspartato en las proteínas y degradando el contenido celular (Okada y Mak, 2004; Adams, 2008).

La vía intrínseca puede activarse por estrés intracelular o extracelular, como la privación de factores de crecimiento, hipoxia, activación oncogénica y daño al DNA, con la consecuente activación de p53. Las señales convergen en la mitocondria y conducen a la permeabilización de su membrana, con lo cual se liberan una serie de moléculas proapoptóticas (Adams, 2008). La permeabilización de la membrana mitocondrial ante daño al DNA se logra gracias a la interacción de una serie de reguladores apoptóticos directamente relacionados con el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial, conocidos como la familia BCL-2 (B-cell CLL/lymphoma 2). Esta familia puede ser dividida en tres grupos: el grupo de BCL-2 con función antiapoptótica y los grupos de BAX/BAK (BCL2-associated X protein/BCL2-antagonist/killer 1) y “BH-3 only”, ambos con función proapoptótica (Adams, 2008).

En una célula sana, BCL-2 es una proteína integral de la membrana mitocondrial. Pero ante una señal adecuada, como la activación de la vía p53 de respuesta al daño al DNA, serán sintetizados los miembros proapoptóticos BAX y BAK mientras que los miembros del grupo “BH-3 only” iniciarán la apoptosis antagonizando por medio de unión directa a las proteínas antiapoptóticas del grupo BCL-2 (Okada y Mak, 2004). Después de esto, las proteínas BAX y BAK se reclutan como oligómeros a la membrana externa mitocondrial y podrían estar dirigiendo la generación de poros en ella (permeabilización). Con la liberación de proteínas mitocondriales como el CIT C y el Factor APAF1 a través de los poros generados, es posible la formación del apoptosoma, conformado además por la Caspasa 9. El apoptosoma entonces, se encargará de la activación de las Caspasas 3 y 7 (Okada y Mak, 2004). Las proteínas IAPs (Inhibitor of apoptosis) son capaces de bloquear la consecución de la apoptosis al impedir el funcionamiento de las caspasas, así que su bloqueo por las proteínas SMAC/DIABLO (Diablo homolog) y OMI/HTR (HtrA serine peptidase), liberadas también de mitocondria asegura la consecución de la ruta apoptótica; además la flavoproteína AIF y la endonucleasa G ingresan al núcleo para conducir la degradación del DNA (Adams, 2008).

Un miembro importante de la familia “BH3-only” es BID (BH3 interacting domain death agonist), su importancia radica en que es el punto de unión entre las vías extrínseca e

intrínseca de la apoptosis; debido a que puede ser truncado por la Caspasa 8 (actor de la vía extrínseca), generando la denominada “BID truncada”, que ingresará a mitocondria y activará la vía intrínseca de la apoptosis (Adams, 2008). Cabe mencionarse que el fenotipo apoptótico no siempre es el producto de la activación de Caspasas o degradación del DNA, por lo que se ha propuesto la existencia de apoptosis independiente de Caspasas.

5.2.2 Autofagia

La autofagia (Figura 9A) ha sido definida como un tipo de muerte celular que ocurre por vacuolización masiva del citoplasma y sin condensación de la cromatina. Las vacuolas por definición, poseen doble membrana y contienen citoplasma u organelos en degeneración (Levine y Klionsky, 2004). Se encuentra involucrada en la remoción de organelos excedentes o dañados, por ejemplo mitocondrias que han perdido su potencial de membrana (Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2004). Los constituyentes citoplásmicos, se incorporan en sacos membranosos o vesículas autofágicas cuyo origen se adjudica al RE, al Aparato de Golgi y a otro compartimento membranoso denominado fagóforo, sin embargo, otros estudios proponen que las vesículas autofágicas podrían formarse *de novo* a través de la nucleación, ensamblaje y elongación de pequeñas estructuras membranosas (Noda *et al.*, 2002). El cierre de estas membranas resulta en la formación de estructuras de doble membrana llamadas autofagosomas. Los autofagosomas y los lisosomas fusionan sus membranas externas generando autolisosomas. Las hidrolasas lisosómicas degradan el contenido de los derivados citoplásmicos del autofagosoma junto con su membrana interna (Gozuacik y Kimchi, 2004).

5.2.3 Necrosis

La necrosis (Figura 9B) usualmente se considera un tipo de muerte celular sin signos de apoptosis o de autofagia, lo cual es una definición negativa (Denecker *et al.*, 2001). La apariencia morfológica de la necrosis es frecuentemente la de la oncosis. Ésta expresión define a la morfológica de una muerte celular que se caracteriza por hinchazón del citoplasma, ruptura mecánica de la membrana celular, dilatación de los organelos citoplásmicos (mitocondria, aparato de Golgi y Retículo Endoplásmico), así como condensación moderada de la cromatina (Kroemer *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2007).

5.2.4 Catástrofe mitótica

La catástrofe mitótica (Figura 9D) es un tipo de muerte celular que ocurre durante o enseguida de una mitosis no regulada o fallida y puede ser acompañada por formación de micronúcleos (los cuales frecuentemente contienen cromosomas o fragmentos de cromosomas que no han sido distribuidos entre los dos núcleos hijos) y multinucleación (presencia de dos o más núcleos con tamaño y forma heterogéneo, resultado de errores durante la citocinesis (Kromer et al., 2005; Galluzzi *et al.*, 2007).

Debido a que se denomina como catástrofe mitótica a dos eventos separados a lo largo del ciclo celular, a la fecha no existe consenso sobre el uso del término, por lo que la NCCD recomienda utilizar en lugar de este término expresiones tales como “muerte celular precedida por multinucleación”, o “muerte celular durante metafase”; la primera se utilizaría en el caso de la muerte después de una mitosis fallida, es decir durante G1, mientras que la segunda para el proceso que ocurre durante mitosis (Kroemer *et al.*, 2005).

La propuesta más reciente sobre el mecanismo por el cual se presenta la catástrofe mitótica indica que resulta de la combinación de puntos de monitoreo deficientes a lo largo del ciclo celular (en particular de la estructura del DNA) y de daño celular. La falla al arrestar el ciclo celular antes o durante la mitosis conduce a intentar una segregación cromosómica que culminará en la activación de vías autodestructivas de muerte celular (Galluzzi et al 2007). Aunque los aspectos morfológicos de la apoptosis parecen incompletos en este proceso, las alteraciones que se observan constituyen las características distintivas de los procesos bioquímicos que conducen a una muerte por apoptosis. Las células que fallan en la ejecución del programa apoptótico en respuesta a fallo mitótico se dividirán de modo asimétrico en la siguiente ronda de división, con la subsecuente generación de aneuploidías. Así que, la catástrofe mitótica podría considerarse un dispositivo molecular para prevenir la aneuploidización y prevenir la oncogénesis (Castedo et al., 2004). Este tipo de muerte se acompaña de condensación de la cromatina, liberación de las proteínas proapoptóticas mitocondriales, en particular CIT C y la proteína AIF (Apoptosis inducing factor), activación de caspasas, degradación del DNA y permeabilización de la membrana mitocondrial, todos estos eventos moleculares han conducido a que la catástrofe mitótica se entienda como un subtipo

especial de apoptosis (Galluzzi *et al.*, 2007). Otra serie de evidencias para esta afirmación sería que la inhibición de las caspasas, el Knock Out de BAX y la transfección de BCL-2 y BCL-XL pueden prevenir o al menos retardar la muerte celular debido al fallo mitótico.

Una vez que la célula ha logrado pasar el punto de monitoreo de G2 la actividad del MPF debe ser sostenida desde la profase y hasta la metafase de la mitosis para asegurar llevar a término una mitosis apropiada. La entrada subsecuente en anafase recae en la destrucción del MPF por el APC/C (van den Heuvel, 2005; Musacchio y Salmon, 2007). El MPF induce la entrada a mitosis al fosforilar y activar enzimas reguladoras de la condensación cromosómica, ruptura de la membrana nuclear, reorganización de los microtúbulos y citoesqueleto de actina (Nigg, 2001). La actividad del MPF se regula a varios niveles: (i) la transcripción de la ciclina B1 y de la CDK1, (ii) las fosforilaciones y desfosforilaciones que puede sufrir la CDK1, (iii) inhibidores endógenos de la CDK1, (iv) la distribución subcelular de la ciclina B1 y (v) la degradación de la ciclina B1 (Castedo *et al.*, 2004). Los puntos de monitoreo de la estructura del DNA integrados principalmente por las cinasas ATM/ATR y las proteínas CHK1/CHK2 tienen a su cargo la fosforilación de WEE1 y p53, responsables de prevenir la activación de la CDK1 al fosforilarla y/o activar a GADD45 para mediar el secuestro en el citoplasma de la ciclina B y evitar la entrada a mitosis cuando se detecta daño en el material genómico.

5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA FA (LA VÍA FA/BRCA).

La FA es una enfermedad que presenta heterogeneidad genética con trece grupos de complementación, los cuales han sido identificados por medio de hibridación somática celular usando la complementación de hipersensibilidad a MMC como ensayo funcional (Molina y Frias, 2006). Los primeros ensayos de este tipo se realizaron en 1980 con tres pacientes masculinos, en los que se detectó que las diferencias observadas entre ellos se debían a que pertenecían a lo que en ese momento se denominó grupos diferentes dentro de la enfermedad (Zakrzewski y Sperling, 1980). En cada uno de éstos se puede detectar la ausencia o mutación de un gen de la vía FA/BRCA, o el mal funcionamiento de su producto proteico. Se ha observado que las proteínas FA no funcionan de modo aislado, sino que interactúan en una vía capaz de reparar el daño ocasionado por agentes inductores de ICL en

el DNA. Debido a esto la FA da nombre a una de las vías de reparación de daño al DNA: la vía FA/BRCA.

Las investigaciones en torno a los participantes de la vía han hecho pensar que puede participar en la Recombinación Homóloga (HR) y la síntesis translesión (TLS); la HR implica usar una de las hebras homóloga del DNA como un templado para reparar el daño en la otra hebra, mientras que la TLS dirige la replicación del DNA cuando hay daño (Huang y D'Andrea, 2006). En la tabla III se enlistan los trece genes identificados hasta la fecha como participantes de la vía FA/BRCA y su correspondiente grupo de complementación dentro de la enfermedad. La mutación más frecuente es la del gen *FANCA* (65%), seguida de *FANCC* y *FANCG* (10 y 9% respectivamente), el resto se reparte entre los demás grupos de complementación (Levitus *et al.*, 2004).

TABLA IV. Genes involucrados en la vía FA/BRCA

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

W. Wang (2007) sugiere que la vía FA/BRCA puede dividirse en dos etapas: la señalización río arriba y río abajo. Asimismo, propone la clasificación de las proteínas involucradas en al menos tres grupos que colaboran en estas dos etapas.

5.3.1 Señalización río arriba

- **Grupo FA 1 “Complejo FA (Fanconi Anemia Core Complex)”**. Los estudios lo colocan río arriba de la cascada de señalización. Es un complejo multiproteico que se une a las horquillas de replicación detenidas; en él se puede encontrar a las proteínas FANCA, B, C, E, F, G, L, M, FAAP24 y FAAP100. Las dos últimas proteínas no se han asociado con la enfermedad.
- **Grupo FA 2 “Complejo ID (ID Complex)”**. Este complejo es el punto central de la vía FA/BRCA. Se forma por las proteínas FANCD2 y FANCI, delimita la señalización río arriba y río abajo (Smorogorzewska *et al.*, 2007). El complejo ID se activa por medio de su ubiquitinización por parte del Complejo FA.

5.3.2 Señalización río abajo

- **Grupo FA 3 “Proteínas de reparación de DNA”**. Corresponde a la señalización río abajo del complejo ID. Quizá sea el punto menos comprendido de la vía FA/BRCA debido a que en él existe traslape con proteínas de otras vías de reparación. Las proteínas FANCD1, FANCN y FANCI, pertenecen a este grupo y corresponden a las proteínas BRCA2 (Howlett *et al.*, 2002) PALB2 (Xia *et al.*, 2007) y BRIP1 (Levitus *et al.*, 2005) respectivamente; las dos primeras se involucran en la reparación del DNA por HR, mientras que la última participa en la TLS. Así que la reparación de un ICL será conducida hacia uno de estos dos mecanismos (ver más adelante).

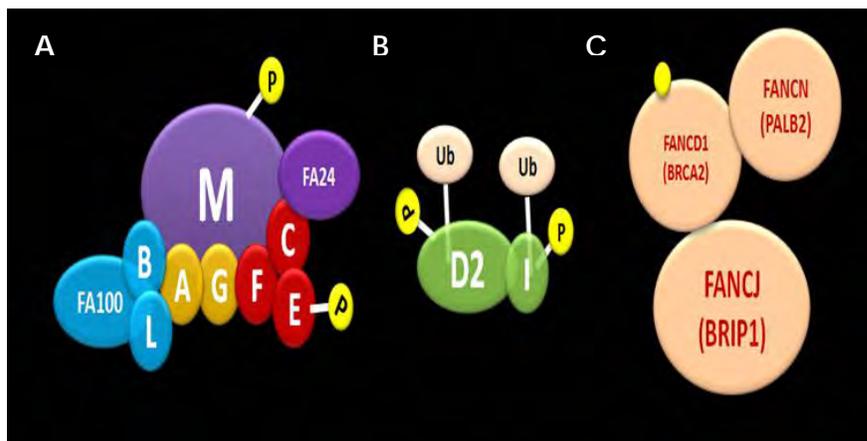


Figura 10. Se esquematizan los complejos que conforman la señalización de la vía FA/BRCA. A. Proteínas que conforman el Complejo FA (Fanconi Anemia Core Complex); B. El complejo DI; C. Las proteínas que conforman la señalización río abajo de la vía FA/BRCA.

5.3.3 Respuesta al daño.

Los datos sugieren que el Complejo FA se une a la cromatina de modo dependiente de la replicación, pero independiente del daño, es decir, el complejo no detecta el daño en las hebras del DNA durante las otras fases del ciclo celular, sino sólo después de la entrada en fase S, donde se encontrará con horquillas de replicación arrestadas (Gurtan y D'Andrea, 2006). Aunque la red de interacciones moleculares precisa no se ha aclarado, los descubrimientos más recientes indican que la cinasa ATR es la primera en detectar las horquillas de replicación arrestadas.

Para la vía FA/BRCA las funciones reconocidas de la cinasa ATR incluyen:

- Fosforilación de las proteínas FANCM, FANCE, FANCA y FANCG pertenecientes al complejo FA.
- Fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX). Ésta modificación postraducciona funciona como marcaje de las zonas que flanquean los sitios de ruptura del DNA, lo que permite el reclutamiento de proteínas de reparación.
- Fosforilación de las proteínas del complejo ID, formado por las proteínas FANCD2 y FANCI.
- Fosforilación de las proteínas BRCA1 y BRCA2/FANCD1, pertenecientes al tercer grupo de proteínas de la vía FA/BRCA.

Las modificaciones que lleva a cabo ATR permiten el reclutamiento de las proteínas anteriores al sitio del daño y la posicionan como una proteína clave dentro de la vía, pues actúa en el reconocimiento del daño al activar a proteínas señalizadoras; así como en la reparación, al activar a las proteínas ejecutoras del proceso.

Una vez llevada a cabo la fosforilación de las proteínas del Complejo FA, se permite la continuidad de la señalización. El Complejo FA lleva a cabo dos funciones: la primera es

unirse al DNA mediante las proteínas FANCM y FAAP24; y la segunda es la activación del complejo ID (ya fosforilado) por medio de ubiquitinización,. El primer proceso lo logra gracias a que la proteína FANCM podría utilizar la energía obtenida de la hidrólisis del ATP para translocarse en el DNA. El heterodímero constituido por FANCM-FAAP24 posee alta afinidad por el DNA en forma de Y que se encuentra durante la replicación, lo cual permite la unión del Complejo FA al DNA (Meetei *et al.*, 2005). La segunda función del Complejo FA se logra gracias a que FANCL posee función de subunidad catalítica ligasa E3, que recluta una subunidad E2 al complejo y monoubiquitina al Complejo ID. Éste permanece unido a la cromatina a través de su interacción con un receptor de ubiquitinas, en un mecanismo que es dependiente del complejo FA (Meetei *et al.*, 2003; Sobeck *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2005). El Complejo FA también se asocia con otro complejo de reparación del DNA, que se encuentra formado por la Helicasa BLM, la Topoisomerasa TopoIII α , y RPA, aunque la interacción entre estos complejos es más débil que la que existe entre las subunidades del Complejo FA (Meetei *et al.*, 2003).

Por su parte el complejo ID, funge como intermediario entre la señalización “río arriba” ya descrita y la señalización “río abajo”. Se ha observado que este complejo permanece unido a la cromatina e interactúa funcionalmente con otras proteínas reparadoras de daño al DNA tales como BRCA1 (Garcia-Higuera *et al.*, 2001), FANCD1/BRCA2 (Wang *et al.*, 2004) y el complejo MRN (Nakanishi *et al.*, 2002). La señalización después del complejo ID, ha tratado de ser dilucidada principalmente por medio de ensayos de inmunoprecipitación para determinar cuales son las proteínas que interactúan funcionalmente con la vía FA/BRCA y sobre todo con el complejo ID. Los hallazgos han llevado al esbozo de dos posibles alternativas en la señalización, estas pueden ser la HR o la TLS.

5.3.4 Recombinación Homóloga.

El descubrimiento de que las proteína BRCA2 (asociada con cáncer de mama) y FANCD1 son la misma (Howlett *et al.*, 2002) llevó a pensar en la HR como el paso siguiente en el mecanismo de reparación de los ICL mediante la vía FA/BRCA, esto debido a que se sabe que en cáncer de mama la mutación en BRCA1 y BRCA2 conduce a defectos en la reparación

del DNA por HR. En el año 2000 se describió un complejo proteico asociado a BRCA1 denominado BASC, conformado por las proteínas MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM, el complejo MRN y RFC que facilita la unión de PCNA al DNA; este descubrimiento hace pensar en BRCA1 como una proteína de andamiaje que organiza los diferentes tipos de proteínas sensoras y efectoras en la respuesta al daño al DNA (Wang *et al.*, 2000). El complejo ID interactúa con la proteína BRCA1, y a su vez ésta se asocia a proteínas de reparación del DNA (como las encontradas en el complejo BASC), así que cada vez se vuelve más evidente la asociación de la vía FA/BRCA con la reparación del DNA por HR.

La HR es un proceso que se basa en la promoción de la invasión de una hebra del DNA en su secuencia homóloga para utilizarla como un templado de reparación (Hoeijmakers, 2001), comprende una serie de vías interrelacionadas que funcionan en la reparación de un DSB o ICL. El proceso de la HR puede dividirse conceptualmente en tres etapas: la presinapsis, la sinapsis y la postsinapsis. Durante la presinapsis, los DSB son reconocidos y se procesan para exponer los extremos 3'-OH del DNA, en la sinapsis ocurre la búsqueda de la hebra homóloga e invasión del DNA por el filamento presináptico y en la postsinapsis una de las dos hebras del DNA se utiliza como templado para sintetizar el fragmento ausente de la otra hebra.

La HR se observa en la Figura 10. Este proceso puede intervenir en la reparación de los ICL en eucariontes en colaboración con las proteínas de la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) y las proteínas FA/BRCA. En este mecanismo se pueden incluir los siguientes pasos: (Kennedy y D'Andrea, 2005; Li y Heyer, 2008):

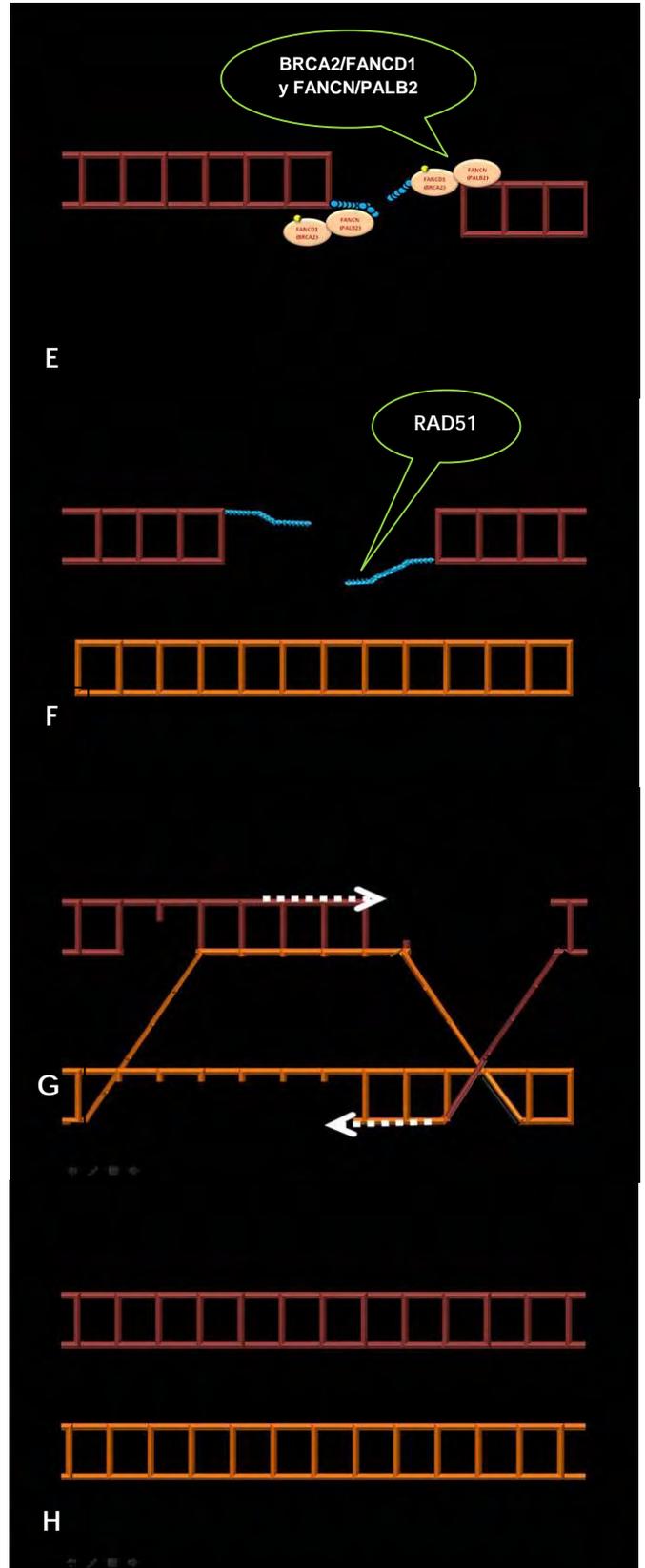
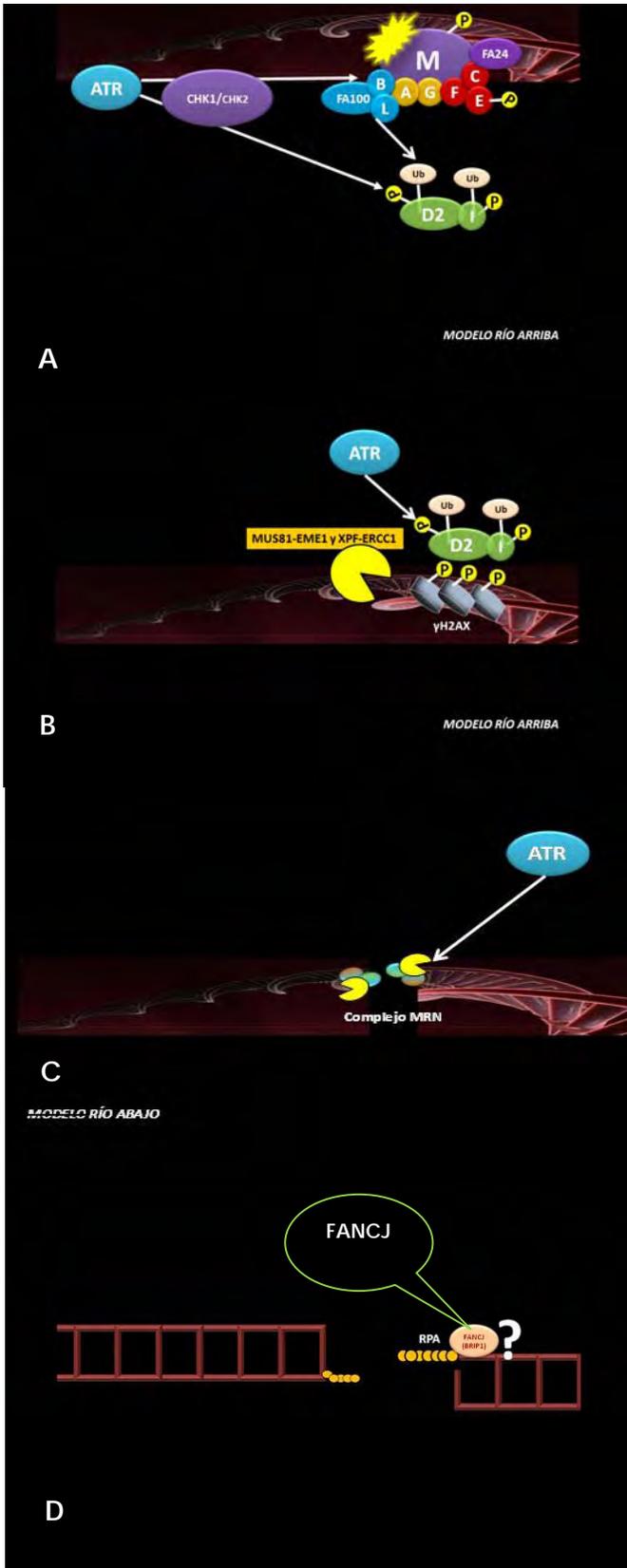


Figura 11 (Página anterior). Esquema general de la recombinación homóloga mediada por las proteínas de la vía FA/BRCA.

- A. El complejo FANCM-FAAP24 detecta a las horquillas detenidas debido a la presencia de un ICL, este complejo podría remodelar las horquillas de replicación detenidas para permitir su procesamiento. Después de FANCM-FAAP24 el resto de las proteínas del Complejo FA se reclutan a las horquillas detenidas. Ahí las proteínas FA son activadas por ATR. El Complejo FA fosforilado activa su subunidad ligasa de ubiquitinas: FANCL, para llevar a cabo la monoubiquitinización del complejo ID (el cual posiblemente se fosforila por ATR antes de su ubiquitinización). El complejo BLM se recluta y evita que la horquilla detenida se colapse.
- B. Generación de un DSB a un lado del ICL por parte de la endonucleasa hMUS81/EME1 (Essential meiotic endonuclease 1 homolog 1) (Hanada, *et al*, 2006). La endonucleasa XPF/ERCC1 (Xeroderma Pigmentosum/Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency) genera un corte adicional del otro lado del ICL (Hanada, *et al*, 2006). ATR fosforila a H2AX, delimitando la región del rompimiento. El complejo ID fosforilado es ahora monoubiquitinizado y retenido en el centro del daño por la γ H2AX y BRCA1. Esto permite que el complejo formado por FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2 y RAD51 entre al sitio dañado y promueva el reinicio de la horquilla de replicación.
- C. El DSB se procesa con la actividad de exonucleasa 5'-3' del Complejo MRN, éste tratamiento expone ambos extremos 3'-OH de la hebra del DNA, generando DNA de cadena sencilla (ssDNA). El complejo MRN es sustrato de fosforilación por parte de ATR/ATM.
- D. Recubrimiento del ssDNA por la proteína RPA (Replication Protein A) (filamento amarillo), generando el intermediario de reparación ssDNA-RPA. Este proceso es importante para proteger al ssDNA, pero RPA debe ser removido para continuar con la HR. La interacción que existe entre FANCI y RPA le confiere a la primera un probable papel en la formación del filamento presináptico.

- E. BRCA2/FANCD1 y FANCN/PALB2 podrían colaborar en el desplazamiento de RPA del ssDNA para permitir el ensamblaje del filamento de la nucleoproteína RAD51 (filamento azul) a los extremos libres recubiertos por RPA. RAD51 tiene la habilidad de intercambiar la hebra sencilla con la misma secuencia de una molécula de DNA de doble cadena. RAD54, miembro de la familia SWI/SNF de ATPasas de DNA, funciona como un motor bidireccional que se asocia con el filamento presináptico formado por RAD51. Estimula la invasión de RAD51 y también funciona disociándola del heterodúplex de DNA.
- F. Después de la identificación de la secuencia idéntica en la cromátida hermana, la copia de doble cadena intacta se usa como un templado para cerrar los extremos rotos por medio de síntesis de DNA.
- G. Finalmente, las denominadas uniones Holliday son resueltas por resolvasas.

5.3.5 Síntesis Translesión (TLS) y Reparación Postreplicativa(PRR)

La otra alternativa ante un ICL consiste en tolerar el daño. Este mecanismo en las células de mamífero se lleva a cabo por las polimerasas de TLS y de tolerancia al daño que se reclutan a las horquillas de replicación arrestadas gracias a la ubiquitinización de la proteína PCNA. La TLS generalmente es un proceso tendiente a error que coopera en la generación de mutaciones inducidas por daño, La TLS forma parte de la Reparación Postreplicativa del DNA (PRR), la cual suprime el bloqueo de las horquillas de replicación al evadir las lesiones en el DNA (proceso conocido en inglés como “bypass”) (Barbour y Xiao, 2003) y permite que la replicación del DNA continúe.

Debido a esta evasión las lesiones en el DNA persisten y pueden ser reparadas durante la fase G2, por medio de NER (Sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos), BER(Sistema de Reparación por Escisión de Bases) o HR. A la fecha se han descrito dos mecanismos de PRR en eucariontes. El primero es la TLS durante el cual las polimerasas del DNA especializadas en replicación (Pol δ y Pol ϵ) pueden ser reemplazadas por las polimerasas Pol η , Pol ι , Pol κ , Pol ζ (REV3L) y REV1. Estas polimerasas poseen una fidelidad muy baja y pueden incorporar los nucleótidos de modo erróneo, aún a pesar de ser muy eficientes en evadir las lesiones del DNA, son tendientes a error y pueden generar

mutaciones. Por el contrario, el segundo mecanismo conocido como “la vía evasora de daño” no presenta errores y probablemente utiliza la cromátida hermana ya replicada como un templado de reparación (Lee y Myung, 2008). Se ha sugerido que la vía evasora de daño comparte características con la HR debido a que requiere de la proteína RAD52 para llevarse a cabo (Gangavarapu *et al.*, 2007). Sin embargo, el mecanismo exacto por medio del cual lo hace y las proteínas involucradas en el proceso no se conocen.

La proteína PCNA es indispensable para la PRR y para la síntesis del DNA pues forma un anillo alrededor de la doble hebra funcionando como una plataforma para las polimerasas del DNA y permite su funcionamiento (Soria *et al.*, 2006). PCNA es susceptible de sufrir diversas modificaciones según el proceso de reparación que seguirá la célula ante el daño a su DNA. Su monoubiquitinización por el complejo Rad6/Rad18 conduce al remplazamiento de las polimerasas de replicación del DNA por las polimerasas especializadas en TLS (Watanabe *et al.*, 2004); la poliubiquitinación mediada por Ubc13 (Mms2)/Rad5 coordina la vía evasora del daño y la sumoilación por Ubc9/Siz1 recluta proteínas que bloquean la formación del filamento presináptico de Rad51-ssDNA con lo que se previene la HR inapropiada (Lee y Myung, 2006, Huang y D’Andrea, 2006). La ubiquitinización es altamente dependiente de los estímulos genotóxicos, por lo que las señales que regulan la ubiquitinización de PCNA podrían ser la exposición de ssDNA, la proteína RPA y la activación de los puntos de monitoreo de la integridad del DNA (Soria *et al.*, 2006).

Para la vía FA/BRCA se ha propuesto que el complejo ID tiene una función similar a la de PCNA monoubiquitinizado, y probablemente permita la liberación de la polimerasa pol δ de la horquilla de replicación y reclute a las polimerasas TLS REV1/3 como lo hace PCNA (Shen, *et al.*, 2006; Ulrich, 2006), además la desubiquitinización de PCNA y del complejo ID, se lleva a cabo por el mismo factor: USP1, una enzima presente en mamíferos y que funciona como regulador negativo de la vía FA/BRCA. Sin embargo, aún no se descarta que la TLS se medie sólo por PCNA y no por el complejo ID (Wang, 2007). El complejo ID podría también reclutar a las polimerasas traslesión REV1 y REV3 en un mecanismo similar a como lo hace PCNA, lo que permitiría pasar por alto el daño al DNA. En este proceso FANCD1 podría utilizar su

actividad helicasa (Levitus, M. *et al*, 2005) para despejar el templado de DNA y promover el reclutamiento de las polimerasas de TLS.

PCNA monoubiquitinizada puede interactuar con las polimerasas de TLS pol η y/o pol ι a través de sus dominios de unión a ubiquitinas (UBM o UBZ) que desplazan a las polimerasas replicativas δ o ϵ . Pol η puede replicar a través de los dímeros de pirimidinas inducidos por luz UV en un proceso relativamente libre de error y las polimerasas pol ι , pol κ , REV1 y pol ζ (que contiene las subunidades REV3L y REV7) pueden sustituirla, aunque tienden a ser mutagénicas. Una vez que la lesión ha sido esquivada, las polimerasas de TLS son liberadas, ya sea por que no poseen procesividad con respecto a las bases no dañadas del DNA o a que PCNA se desubiquitina gracias a USP1, entonces las polimerasas replicativas se unen nuevamente a PCNA y continúan con la síntesis del DNA (Huang y D'Andrea, 2006).

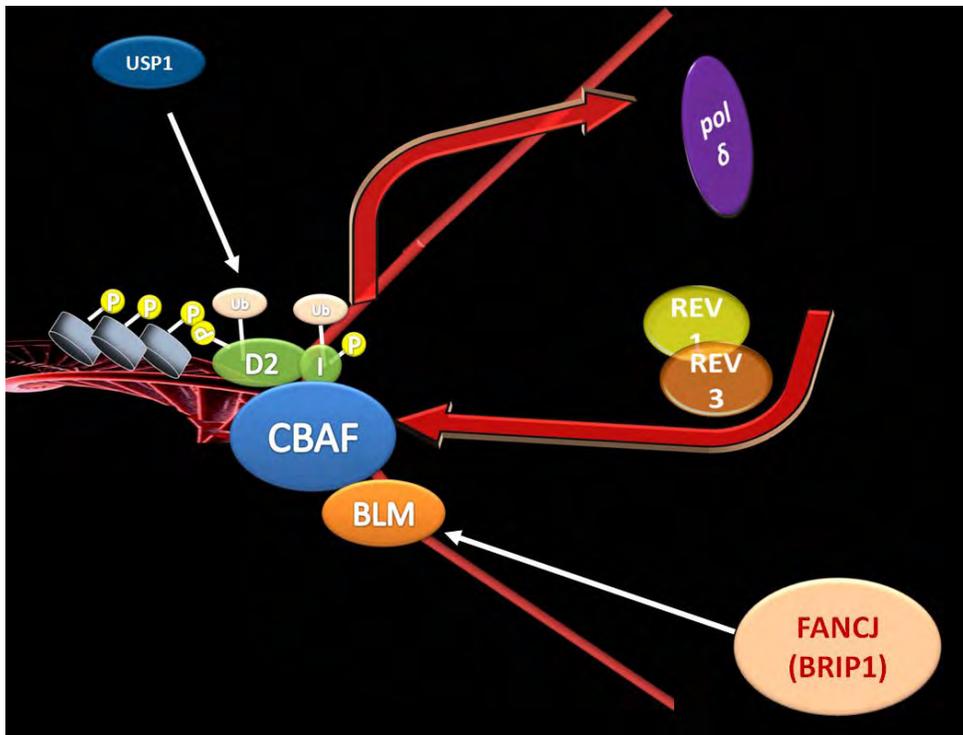


FIGURA 12. Durante la síntesis Traslesión la polimerasa pol δ se reemplaza por las polimerasas REV1/3.

6 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se discuten de modo muy general las respuestas de las células FA ante los tratamientos con dos agentes mutagénicos que tienen mecanismos de acción diferente, pero que tienen al mismo resultado sobre el DNA: la MMC y la HU. El primero tiene la propiedad de inducir enlaces covalentes cruzados entre las hebras del DNA y arrestar de este modo las horquillas de replicación durante la fase S del ciclo celular. El segundo posee gran afinidad por la enzima RR y la inactiva; la RR es la responsable de la reducción de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos necesarios para obtener dNTPs y llevar a cabo la síntesis del DNA. Cuando la RR se inactiva las horquillas de replicación se arrestan debido a la carencia de dNTPs. Muchos estudios han demostrado que las células FA son especialmente susceptibles al daño inducido por los agentes alquilantes como la MMC y recientemente la HU ha ingresado a la lista de las sustancias utilizadas para el estudio de la respuesta de las células FA ante el daño genotóxico.

Puesto que a nivel clínico la pancitopenia en los pacientes FA da muestra de la elevada muerte de sus células sanguíneas en el padecimiento (Taniguchi, 2008), en el presente trabajo se ha puesto énfasis en los probables mecanismos de muerte que puede seguir una célula FA cuando tanto la reparación del DNA como el arresto del ciclo celular han fallado; esta aproximación se ha hecho haciendo una revisión de los efectos que tiene el tratamiento combinado o por separado de la MMC y la HU. La acción de ambos agentes es dependiente de fase S, sin embargo trabajos recientes han mostrado que la HU puede generar daño adicional al DNA durante la fase G2 del ciclo celular por medio de un mecanismo no conocido (Molina *et al*, 2009). Además, el hecho de que los pacientes con FA tengan un riesgo muy elevado de desarrollar tumores sólidos y sobre todo AML nos indica que las células FA podrían adquirir una serie de mutaciones que permita a una subpoblación de las células FA sobrevivir y proliferar aún a pesar del daño generado en su material genómico; así que, la proliferación también ha sido incluida brevemente dentro del panorama de estudio como una posibilidad latente.

Durante éste apartado no haremos énfasis en la descripción de la vía FA/BRCA, sino que comenzaremos a hacer una discusión sucinta de los posibles rumbos que puede seguir una

célula FA cuando se presenta daño a su material genómico, pues ya ha sido establecido que la vía FA/BRCA responde ante la presencia de horquillas de replicación arrestadas durante la fase de síntesis del DNA y se tiene el consenso de que el Complejo FA se une a estas horquillas arrestadas, mediando así la señalización para reclutar al Complejo ID y a las proteínas de reparación del DNA (Gurtan y D'Andrea, 2006; Wang, 2007; de Winter y Joenje, 2008). Sin embargo, cuando alguna de las proteínas no está presente, no se llevará a cabo la reparación apropiada del enlace cruzado y el daño se manifestará en forma de CA (Taniguchi *et al.*, 2002; Gurtan y D'Andrea, 2006; Wang, 2007; de Winter y Joenje, 2008). Dado que tanto la MMC y la HU son capaces de producir radicales libres durante su metabolismo, primero se abordará el probable daño oxidativo generado por estos compuestos sobre las células y su relación con la vía FA/BRCA, una segunda aproximación abordará el daño clastogénico que tienen estos agentes sobre el DNA de las células FA.

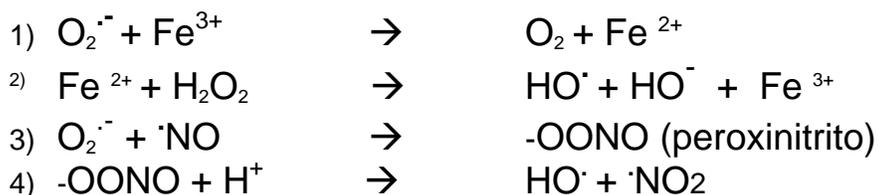
6.1 La producción de radicales libres a partir de superóxido y óxido nítrico en anemia de Fanconi y su relación con la muerte celular.

Las proteínas de la vía FA han sido implicadas en el metabolismo de los xenobióticos y en el metabolismo REDOX a través de las interacciones de la proteína FANCC con la citocromo-P450 reductasa y la glutatión S-transferasa, y de la proteína FANCG con la citocromo P-450 2E, así como en la señalización dependiente del estado REDOX a través de la interacción que se ha observado entre FANCA y la cinasa AKT (Murine thymoma viral oncogene homolog 1). Debido a estas interacciones Pagano y Youssoufian (2003) han generado la hipótesis de que las proteínas FA actúan directamente (vía FANCC y FANCG) e indirectamente (vía FANCA, BRCA2 y FANCD2) con la maquinaria de la defensa celular para modular el estrés oxidativo.

De esta forma diversos experimentos han mostrado que las células FA no solo son hipersensibles a los agentes alquilantes del DNA, sino también al oxígeno (O₂) y a las ROS que se derivan del metabolismo de esta molécula, las cuales a concentraciones normales elevan el número de CA, disminuyen la tasa de proliferación y detienen el ciclo celular en la fase G2 (Joenje y Oostra, 1983; Strathdee, 1992; Joenje y Patel, 2001), tal efecto se ve disminuido con la adición de antioxidantes (Porfirio *et al.*, 1989). De igual manera, las CA espontáneas y el arresto en fase G2 del ciclo celular, observadas en cultivos primarios de

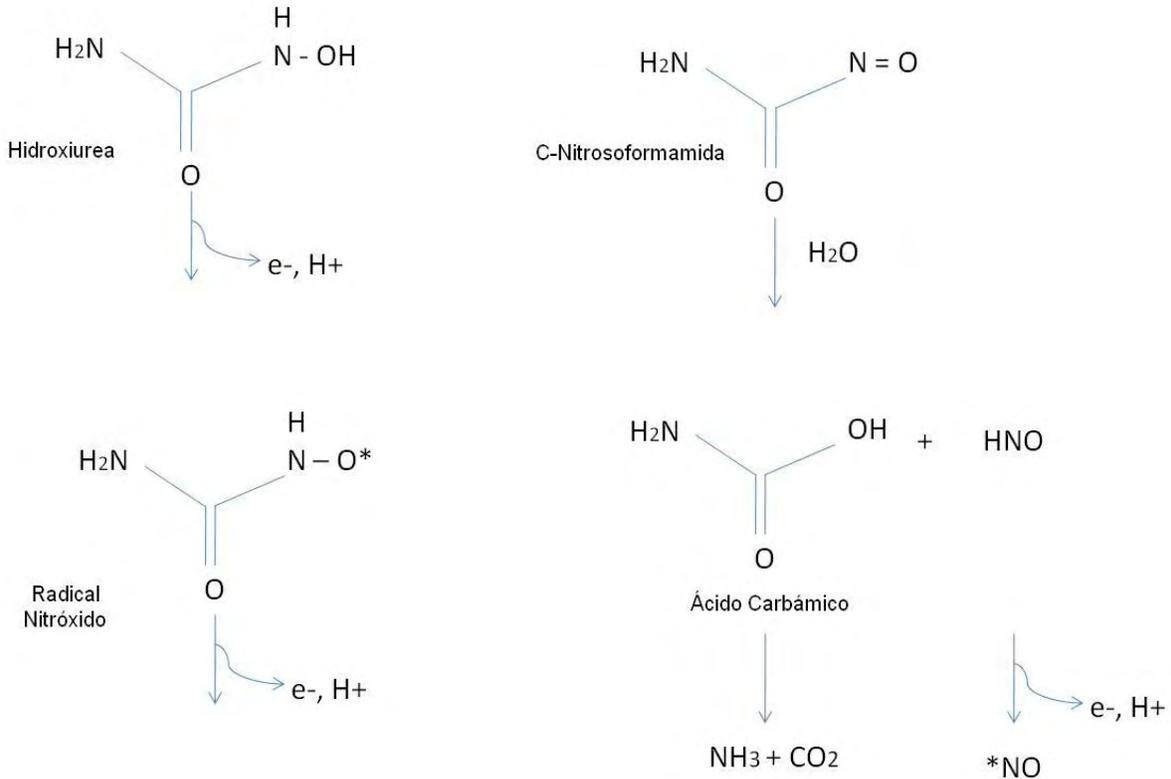
fibroblastos FA disminuyen al reducir la concentración del oxígeno ambiental de 20% a 5%. Estos datos han sugerido que la hipersensibilidad al oxígeno de las células FA podría aumentar la toxicidad de la MMC, pues durante su activación intracelular se producen O_2 , peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y grupos hidroxilo (Joenje y Oostra, 1983). Esto puede hacer alusión a que existe un mecanismo antioxidante defectuoso en las células FA, evidenciado por la producción elevada de radicales de oxígeno (Afanas'ev, 2005) pero en el que al mismo tiempo, los niveles de enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa o glutatión hidropoxidasa, se muestran normales (Joenje *et al.*, 1978; Gille *et al.*, 1987; Joenje y Patel, 2001), esta particularidad podría otorgar un papel adicional a las proteínas de la vía FA/BRCA diferente a la reparación de los ICL, el cual podría ser la coordinación entre las respuestas al daño al DNA y al estrés oxidativo.

Recientemente Afanas'ev (2005) ha sugerido que no solo las ROS podrían estar involucradas en la patología de la FA, este autor ha propuesto que la interacción del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico (NO) con el hierro (Fe) libre (no unido a proteínas) puede ser la principal fuente de precursores de radicales libres tanto en la FA como en la talasemia. El superóxido y el NO son radicales fisiológicos relativamente inocuos, que llevan a cabo funciones señalizadoras importantes y participan en muchos procesos biológicos tales como la fagocitosis ($O_2^{\cdot-}$) y la relajación del endotelio (NO) (Cokic *et al.*, 2007). Sin embargo, al mismo tiempo son precursores de otras especies reactivas de nitrógeno (RNS) y ROS. Las siguientes reacciones (1-4) muestran la propuesta de Afanas'ev por medio de las cuales el Fe libre, el NO y el superóxido pueden reaccionar entre si para generar especies moleculares altamente reactivas.



Las reacciones anteriores pueden explicar la generación de radicales libres en pacientes con la enfermedad, en los que la disponibilidad de Fe se facilite a través de la sangre; mientras

que en cultivos *in vitro* de células linfoblastoides la producción de radicales libres a partir de HU podría darse por las siguientes reacciones:



La evidencia disponible ha apuntado a que las reacciones 1-4 podrían ser el origen del daño ocasionado por los radicales libres, el inicio de varias enfermedades y el envejecimiento. Ahora se sabe que además de los efectos dañinos directos de los radicales libres, a través de la captación de átomos de hidrógeno de los sitios reactivos de las moléculas biológicas, el superóxido y el NO son capaces de afectar numerosos procesos a través de sus funciones señalizadoras (Afanas'ev, 2005). Para la FA la importancia del Fe fue demostrada cuando Porfirio (1989) encontró que el quelante de hierro desferrioxamina era capaz de disminuir las CA espontáneas en las células FA, lo cual sugería que el Fe libre es un catalizador de la producción de radicales hidroxilo (reacciones 1 y 2). Esto también fue demostrado por Schultz y Shahidi (1993) en leucocitos de FA quienes además mostraron que el TNF- α detectado en el plasma de los pacientes FA incrementa la producción de superóxido. Para el NO se demostró

que es una molécula intermediaria en la sensibilidad e inhibición del crecimiento que sufren las células FA-C hematopoyéticas de ratón ante las citocinas TNF- α , IFN- γ (Interferon γ) y MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein 1 α) (Hadjur y Jirik, 2003). Por lo tanto en conjunto las ROS y el NO están involucrados en la patogénesis de la FA.

La apoptosis, problema que nos incumbe en este trabajo, estimulada por las ROS y el NO es un factor importante en la patología de la FA, tal y como lo han demostrado los trabajos de Clarke *et al* (1997), quienes observaron que en comparación con las células normales, las células FA-C mostraron mayor sensibilidad a la inducción de apoptosis por la MMC en una atmósfera con 20% de oxígeno, mientras que no había diferencias cuando la concentración de oxígeno era del 5%. De estos trabajos se concluyó que la apoptosis se incrementaba en las células FA debido a la acción dual de los dos agentes: MMC y ROS, sobre todo a la sobreproducción de ROS originados por la activación de la molécula, incluso no se observaba generación de daño al incrementar las concentraciones de oxígeno sin adición de MMC, lo cual quiere decir que el tratamiento combinado resulta crucial en la generación de daño por el agente alquilante. También, Pearl-Yafe, *et al.* (2004) mostraron que los linfocitos FA son hipersensibles a la apoptosis iniciada por el H₂O₂ y el IFN- γ , y que ésta es mediada por la proteína cinasa activada por Mitógeno p38; sus datos mostraron además que hay una diferencia entre grupos FA, pues las células FA-C resultaron más sensibles al IFN- γ y al estrés oxidativo comparadas con las células FA-A.

Para la FA la producción de NO mediada por la citocina TNF α podría colaborar en el arresto del ciclo celular o en su muerte al encender la vía de p53 ante los tratamientos con MMC e HU. Este proceso no se ha comprobado en la FA, pero diversos hallazgos han mostrado que la producción elevada de radicales libres por citocinas mielosupresoras puede estar relacionada con una muerte celular activada por p53, pudiéndose mencionar los siguientes:

- 1) La pérdida de la vía FA/BRCA permite la activación de la señalización por medio de la vía de las MAPKs, con la subsecuente sobreexpresión de la MMP-7 (una Metaloproteinasa de Matriz extracelular). La MMP-7 estimula la sobresecreción del TNF- α , el cual sostendrá o amplificará tanto la activación de las vías MAPKs y la vía de

NF- κ B, con lo que habrá una producción constante de TNF α (Briot *et al*, 2008), característica de las células FA.

- 2) La sobreproducción de TNF- α y la adición de otras citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ y MIP-1 α , conducen a la sobreexpresión de la enzima iNOS (productora de NO) con la resultante inhibición del crecimiento de las células de medula ósea Fancc(-/-) (Hadjur y Jirik, 2003). Esta propiedad de las citocinas ha sido propuesta como uno de los posibles factores patogénicos en el fallo en la medula ósea en la FA.
- 3) La MMC y la HU son capaces de producir NO (Erden *et al.*, 2002; King *et al*, 2004).
- 4) En líneas linfoblastoides silvestres para p53, como la TK6, el NO es capaz de inducir apoptosis mediada por los blancos transcripcionales de p53: PUMA(BCL2 binding component 3), NOXA(phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), WIP1 (protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform) y PIG3/TP53I3 (Tumor protein p53 inducible protein 3). El NO es capaz de activar tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca de la apoptosis, pues se han observado cambios en la expresión de las proteínas AIF, EndoG, Fas/CD95, liberación de SMAC/Diablo, y truncamiento de BID y PARP (Poly-(ADP-ribose) polymerase) (Li *et al*, 2004).
- 5) Las células FA-A al ser tratadas con MMC o HU muestran sobreexpresión de las proteínas PIG3 y TNFRSF10B/DR5(Death Receptor 5), blancos transcripcionales de p53 relacionados con la muerte celular. Estas proteínas también muestran un aumento en su transcripción ante el tratamiento con NO en la línea TK6 silvestre para p53 (Li *et al*, 2004).

Así que las concentraciones elevadas de TNF- α típicas de las células FA permitirían la generación de ROS y NO, además los datos de Martinez *et al* (2008) permiten especular que en un ambiente celular con producción de NO y ROS, como es el caso de las células FA, al cual se adicione MMC productora de ROS y de ICL, e HU productora de NO; la respuesta sería la activación de la vía de p53. La activación del gen PIG3 muestra que existe esta posibilidad, pues el NO conduce a aumentar los niveles de PIG3 y otras proteínas como

TNFRS10B/DR5 (Li *et al*, 2004), probablemente conduciendo hacia una muerte celular que surge como respuesta al daño al DNA y la generación de radicales libres.

La activación de la vía de p53 en respuesta al NO en líneas linfoblastoides silvestres para p53 ya ha sido documentada mientras que en las células FA ya se ha comprobado la generación de NO. Así que lo que ahora faltaría sería determinar si en las células FA se activa la vía de p53 en respuesta al NO, lo cual lo merecería abordaje experimental. En la figura 13 se esquematiza como la MMC, la HU y el TNF- α podrían activar el arresto de ciclo celular o la apoptosis mediado por exceso en la producción de NO y la activación de la proteína p53.

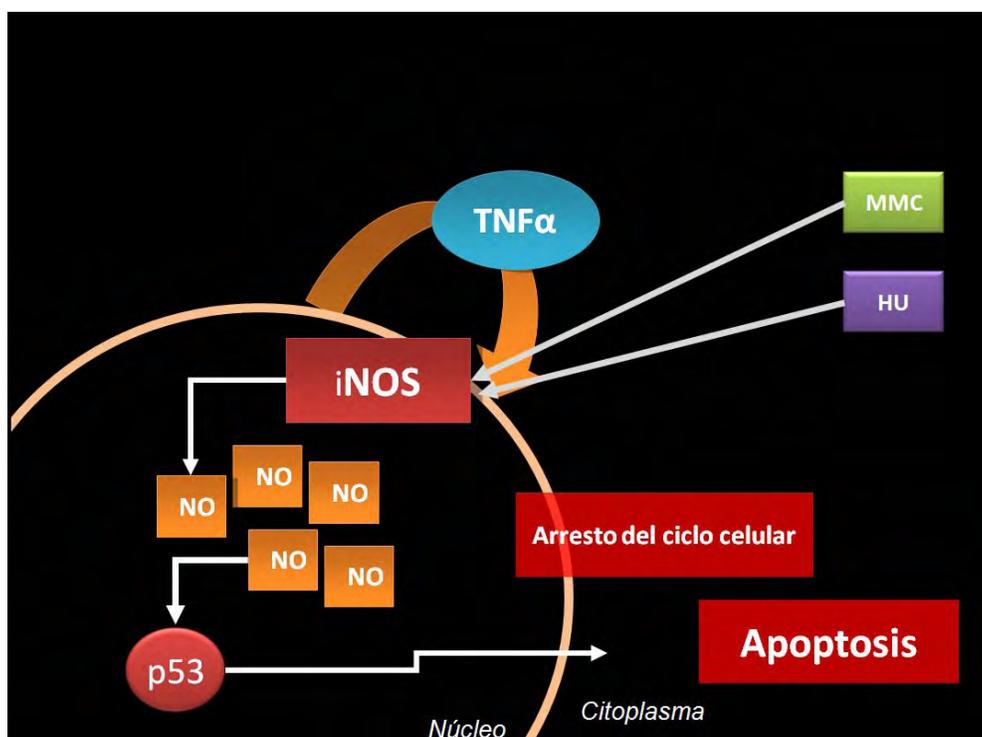


FIGURA 13. Esquema por medio del cual se propone que en FA el NO puede ser un mediador importante de la muerte celular. El TNF α , la MMC y la HU podrían ser mediadores importantes de la producción de NO, éste activaría la producción de p53 y con ello el arresto o apoptosis de las células FA.

6.2 El daño irreparable al DNA durante las fases S y G2 puede conducir hacia apoptosis.

Las proteínas de la vía FA/BRCA se encuentran presentes durante todo el ciclo celular y responden en fase S ante los ICL generados por la MMC (Gurtan y D'Andrea, 2004) conduciendo a la célula a la reparación del DNA por HR o TLS (Wang, 2007). En la ejecución de estos mecanismos, además de las proteínas FA/BRCA un participante clave ante horquillas de replicación arrestadas, es la proteína cinasa ATR (Wang W. 2007, de Winter y Joenje, 2008).

La entrada en acción de ATR durante la cascada de señalización FA/BRCA aún es muy discutida, pues algunos la han propuesto como la iniciadora de todo el proceso de reparación, es decir como la primera en detectar el daño (Sechter *et al*, 2004; Wang, 2007), mientras que en otras publicaciones se le coloca después de la participación del Complejo FA (Niedernhofer, 2007; de Winter y Joenje, 2008), esto debido a la nueva propuesta de que la proteína FANCM tiene la capacidad de remodelar la cromatina de las horquillas de replicación arrestadas (Gari *et al*, 2008) y de este modo generar DNA de cadena sencilla (ssDNA) cubierto por proteína RPA. El intermediario generado: ssDNA-RPA, actúa como mediador de todos los mecanismos de reparación en los que se encuentre involucrado un ssDNA y posee la capacidad de atraer a ATR y a su compañera ATRIP (Zu y Elledge, 2003; Shechter *et al*, 2004). Lo que es bien sabido, es que la cinasa ATR posee la capacidad de fosforilar a gran cantidad de sustratos, ya sean participantes de la vía FA/BRCA o proteínas involucradas en la señalización para arrestar la progresión del ciclo celular cuando hay problemas con la horquilla de replicación (Kastan y Bartek, 2004; Wang, 2007; de Winter y Joenje, 2008).

Además de ATR y debido sobretodo a la generación de DSB durante el proceso de reparación del DNA también la cinasa ATM ha sido vinculada con la vía FA/BRCA, pues se ha observado su sobreexpresión ante la adición de MMC en fibroblastos de pacientes FA-A y se han registrado niveles basales de su expresión aún sin adición del tratamiento en las mismas células, probablemente como una respuesta a daño generado endógenamente (Yamamoto *et al*, 2008). El punto de solapamiento encontrado en la función de las cinasas ATM/ATR con las proteínas FA/BRCA, así como su función dependiente de fase S, aún a pesar de estar

presentes en todo el ciclo celular (Shechter *et al*, 2004; Gurtan y D'Andrea, 2006), permite comenzar el abordaje del destino de las células FA cuando el daño a su material genómico puede aún ser reparado o cuando tal daño es irreparable.

Hasta ahora se sabe que en las células FA, además de las ROS, los agentes alquilantes como la MMC o inhibidores de la síntesis del DNA como la HU generan un daño en el DNA que no puede ser procesado adecuadamente. Entonces se deberá recurrir a una estrategia que salvaguarde la integridad celular mientras se lleva a cabo la reparación del DNA. Este mecanismo debe ser el arresto en la progresión del ciclo celular, al cual se podría recurrir de inmediato gracias a la proximidad que tiene la cinasa ATR al DNA durante la replicación (Shechter *et al*. 2004). De acuerdo con este modelo, ATR será la primera en detectar la horquilla de replicación arrestada y activar a CHK1, la cual a su vez fosforila a CDC25A resultando en su degradación vía proteosoma (Kastan y Bartek, 2004; Jin *et al* 2008). Este paso es importante porque CDC25A es capaz de desfosforilar al complejo ciclina E/CDK2, que a su vez posee la función de fosforilar a la proteína CDC45 que se unirá a los orígenes de replicación y permitirá el reclutamiento y ensamblaje de la Polimerasa alfa (Pol α) y la proteína RPA, ambas indispensables para iniciar la replicación del DNA; al degradarse CDC25A este proceso es evitado (Kastan y Bartek, 2004; Sclafani y Holzen, 2007).

Entre los blancos de ATR/ATM y sus colaboradores CHK1/CHK2 se encuentra el factor de transcripción p53 (Shieh *et al*, 2000; Kastan y Bartek, 2004), así que otro punto de regulación de la progresión durante fase S puede resultar de la activación de genes de la vía de p53. Ante tal perspectiva, estudios recientes han demostrado que las proteínas de la vía FA/BRCA colaboran con la vía de respuesta al daño mediada por p53 en la prevención de las aberraciones cromosómicas y el mantenimiento de la integridad genómica (Houghtaling *et al*, 2005; Yamamoto *et al*, 2008; Martínez *et al*, 2008).

Martínez y colaboradores en 2008 al trabajar con MMC e HU mostraron en líneas linfoblastoides normales y de FA la activación del gen TP53 y de los genes regulados directa o indirectamente por la proteína p53 relacionados con el control del ciclo celular, reparación del DNA, proliferación y apoptosis. Ante el tratamiento con MMC e HU se observó un incremento de las CA observadas en las líneas FA, lo cual correlacionaba positivamente con la sobreexpresión de genes regulados por p53 implicados en apoptosis tales como TNFRSF10B;

sin embargo al mismo tiempo, el gen antiapoptótico TR1AP1 mostraba un nivel significativo de expresión (Tabla III). De estos experimentos se puede desprender que ante MMC y/o HU la célula FA activa la vía p53 que:

- a) bloquea la progresión del ciclo celular para llevar a cabo la reparación de las rupturas en el DNA la cual sería ineficiente o,
- b) conduce a las células hacia apoptosis.

Dentro del primer panorama se puede incluir la activación de la proteína p21 por parte de p53, tanto en las células FA-A como en las sanas (Kan *et al*, 2007, Martinez *et al*, 2008), que en fase S tiene la función de bloquear a la proteína PCNA, evitando que se cargue en las horquillas de replicación y bloqueando la síntesis del DNA (Yan y Newport, 1995). Se ha propuesto que la transcripción de genes dependiente de p53 favorece en un principio la expresión de proteínas pro-sobrevivencia, tales como p21, GADD45, 14-3-3 σ , MDM2 (HDM2), todos ellos observados ante tratamientos con MMC en las células FA-A (Martinez *et al*, 2008).

Para el segundo caso, se espera que eventualmente un nivel umbral de p53 sea alcanzado y que sus concentraciones altas conduzcan a la transcripción de genes pro-apoptóticos como APAF-1, BID/BAD, TNF/FAS, PUMA/NOXA. Este cambio en los genes blanco de p53 también podría ocurrir en las células FA debido a las modificaciones pos-traduccionales de la proteína p53 que cambiarían su afinidad por los promotores de sus genes blanco (Bree *et al*, 2004). De este modo, al activar la transcripción de genes que permeabilizan la membrana mitocondrial, p53 podría activar la vía intrínseca de la apoptosis en fase S del ciclo celular.

Ante un punto de monitoreo deficiente en la fase S, el cual no sea capaz de detectar las lesiones generadas en el DNA, el punto de monitoreo de la fase G2 del ciclo celular deberá ser capaz de prevenir la progresión del ciclo celular para evitar heredar el daño durante la mitosis. La actividad del punto de monitoreo de G2 generalmente se detecta mediante el análisis por citometría de flujo y se evidencia por la acumulación de células en esta fase, situación que ya ha sido detectada en las células FA ante el tratamiento con MMC (Kruyt *et al*, 1996).

Para reparar el daño ocasionado al DNA las proteínas colaboradoras de la vía FA/BRCA generan DSB en las zonas donde la MMC produjo enlaces cruzados (Li y Heyer, 2008), si estos DSB no pueden ser reparados adecuadamente por la vía FA/BRCA podrían llegar a ser tolerados o reparados mediante vías alternas a la vía FA/BRCA. Quizá ésta reparación se lleve a cabo o se finalice durante la fase G2 del ciclo celular mediante la Reparación Postreplicativa (PRR), permitiendo a las células dividirse. Molina *et al* (2009) observaron un incremento en el número de CA al adicionar HU en fase G2 a células cuyo material genómico fue previamente dañado con MMC. La obtención de metafases de estas células hace posible pensar en que la reparación de las rupturas generadas por la MMC podría estarse llevando a cabo mediante PRR en G2, pero este proceso se vería interrumpido por la adición de HU. Probablemente porque la HU deje a la células sin dNTPs disponibles para llevar a cabo la reparación del DNA (ésta posibilidad será abordada con más detalle en las última sección).

Un mecanismo alternativo por medio del cual la HU podría estar bloqueando la reparación del DNA durante la PRR sería el bloqueo de las proteínas del Sistema NER. Esto parece factible debido a que el NO producido por agentes que inhiben la síntesis del DNA (King *et al*, 2004) es capaz de bloquear la reparación por NER en fibroblastos humanos dañados previamente con MMC (Chien *et al*, 2004). Entonces la producción adicional de NO podría sumarse al que las células FA producen endógenamente y bloquearía las funciones de las proteínas del NER mediante S-nitrosilación de residuos de cisteína reducidos y S-nitración de residuos de tirosina y triptófano. Sin embargo no ha sido establecido cual de las proteínas del sistema NER se bloquea preferencialmente por el NO (Chien *et al*, 2004), un candidato podría ser la proteína XPC cuya expresión no se ve modificada por la adición de MMC a las células FA-A, pero se ve incrementada ante la HU (Martinez *et al*, 2008). Es probable que ante las modificaciones generadas por el NO en las proteínas la célula responda aumentando la expresión de XPC u otras proteínas del sistema NER para poder llevar a cabo la PRR del DNA en fase G2 y evitar la muerte celular. Un proceso de esta naturaleza no parecería bien sustentado debido a que se han llevado a cabo muy pocos estudios que corroboren el bloqueo de los sistemas de reparación por producción de NO, sin embargo es una posibilidad que amerita estudio. Quizá simplemente las células FA no toleren un daño tan extenso y ante

el tratamiento combinado mueran por apoptosis gracias a la activación de la vía de p53 durante la fase G2 del ciclo celular.

6.3 Las células FA podrían morir por catástrofe mitótica si los puntos de monitoreo de la integridad del DNA no funcionan adecuadamente.

Molina *et al.*, (2009) buscando el efecto que tiene la HU sobre la PRR de las células FA previamente dañadas con MMC encontró que el tratamiento con MMC e HU por separado o en combinación tiene diferentes efectos sobre el IM de éstas células. Por un lado observó que el tratamiento con MMC por 24 hrs incrementaba el IM de las células AF–A,B,C,D1 y E comparado con el IM de las células normales; la adición de HU 3 hrs antes de la obtención de las células (durante fase G2) disminuía el IM; y finalmente el tratamiento combinado de MMC por 24 hrs con la posterior adición de HU 3 hrs antes de la cosecha (ya sin MMC) llevaba los valores del IM a unos similares a los de las células normales (Tabla II). El hecho de que la HU tenga un efecto en fase G2 (Tablas I y II) hace pensar que un proceso ajeno a la fase S del ciclo celular está siendo afectado por el tratamiento, y que probablemente se trate de la PRR del DNA. Ante el tratamiento combinado los cambios en el número de metafases obtenidas, permiten especular que las células FA pudieran morir durante la mitosis o en la fase G1 del siguiente ciclo celular, en un proceso conocido como catástrofe mitótica.

Dado que la regulación de la transición G2/M se lleva a cabo principalmente por el MPF, conformado por la CDK1 y su activador alostérico obligado, la ciclina B, el correcto funcionamiento de este complejo es de primera importancia para evitar la catástrofe mitótica (Castedo *et al*, 2004). Diferentes autores han concluido que cuando se combinan puntos de monitoreo de la integridad del DNA deficientes y daño al DNA, el resultado será una catástrofe mitótica, en un proceso cuyas características serían el arresto marcado de la progresión G2/M, aumento del IM, alteración de la morfología celular y nuclear, desorganización del huso mitótico, activación de la caspasa 3 y fragmentación del DNA (Castedo *et al*, 2004; Wolanin *et al*, 2006; Strauss *et al*, 2007). La combinación de estos eventos podría ser indicio de una entrada aberrante a mitosis antes de que la replicación del DNA sea completada, esto requiere de la activación del MPF lo cual es suficiente para causar condensación prematura de la cromatina y catástrofe mitótica (Castedo *et al*, 2004). El incremento en la actividad de la

CDK1 también se ha encontrado en numerosas condiciones apoptóticas, y se ha sugerido que puede ser importante para la muerte celular, en este caso la CDK1 podría inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) al fosforilar a la proteína proapoptótica BAD (Castedo *et al*, 2002).

Las características de la catástrofe mitótica permiten retomar los experimentos de Molina *et al* (2009), en los que el tratamiento combinado de MMC por 24 hrs con HU adicionada durante fase G2 (ya sin MMC) reduce el IM al compararlo con la MMC sola, pero lo aumenta comparado con la HU sola, esto podría deberse a que la HU no permitiría que las células recurran a la PRR de la fase G2 planteada como probable respuesta ante el tratamiento con sólo MMC y a que de algún modo se acelere la entrada a mitosis, aquí la catástrofe mitótica podría ser más evidente. Recordemos también que a partir de la HU se puede producir NO, el cual es capaz de inhibir la función de las proteínas de reparación del NER (Chien *et al*, 2004), e incluso podría hacerlo con otras proteínas indispensables para los puntos de monitoreo celulares por medio de modificaciones en sus centros activos a través de la S-nitrosilación. Incluso la HU podría estar involucrada de modo directo o indirecto en la generación de CA adicionales en las células FA durante la fase G2 (Molina *et al*, 2009). Ante tal panorama el DNA no sería reparado apropiadamente y no solo eso, sino que sería pasado por alto; no obstante sería esperado que el daño se detecte en fase M y la célula se conduzca hacia la muerte.

Al menos dos tipos de mecanismos reguladores de la catástrofe mitótica han sido planteados; el primero es independiente de p53 y sucede cerca o durante la metafase, la cual ocurre por ejemplo ante la inhibición de CHK2 y probablemente ante la inhibición de otras proteínas clave de los puntos de monitoreo de la integridad del DNA, como podrían ser ATR o ATM . El segundo tipo de catástrofe mitótica puede ser dependiente de p53 y se activa después de una mitosis fallida durante la activación del punto de monitoreo de la poliploidía en G1 (Erenpreisa, y Cragg, 2000). Para el caso de la muerte celular asociada a metafase, la cual es independiente de p53, Castedo *et al* (2004) han propuesto que la activación de la caspasa 2, seguida de la permeabilización de la membrana mitocondrial y finalmente la activación de la caspasa 3 son la serie de pasos responsables de la muerte celular. La activación de la

procaspasa 2 puede llevarse a cabo como resultado del daño al DNA (Robertson *et al*, 2002; Baliga *et al.*, 2004) y puede detectarse incluso cuando la apoptosis o la catástrofe mitótica son suprimidas por la sobreexpresión de elementos antiapoptóticos (Castedo *et al*, 2004). La inhibición de las caspasas, entre las que se incluye la caspasa 2 puede prevenir la permeabilización de la membrana mitocondrial y la muerte celular por catástrofe mitótica lo cual tendría como resultado la inducción de divisiones celulares asimétricas y la generación de aneuploidías en las células hijas (Castedo *et al*, 2004).

En las células FA-A tratadas con MMC, p53 es capaz de aumentar los niveles de expresión del gen para ciclina B (CCNB1) (Martínez *et al*, 2008). En otros modelos celulares esta sobreexpresión ha sido ampliamente relacionada con la catástrofe mitótica ante daño genotóxico, pues acelera la entrada a mitosis debido a la sobreactivación del complejo MPF, lo cual también puede ocurrir en presencia de daño al DNA debido a la pérdida de función de ATM. A su vez, el tratamiento con HU potencia de modo dependiente de p53 la transcripción de uno de los inhibidores de la CDK1: GADD45A (Martinez *et al*, 2008), lo cual evitaría la formación del MPF y mantendría el arresto en G2. Los datos de expresión del gen para ciclina B, arresto durante fase G2 del ciclo celular e IM elevados ajustan con una posible catástrofe mitótica, sobretodo ante el tratamiento combinado de MMC más HU. Estos datos parecen contradictorios, sobre todo porque la muerte durante metafase ha sido manejada como independiente de p53 (Castedo *et al*, 2004), sin embargo son necesarios más estudios en las células FA para discernir la probable sucesión de estos eventos o una probable muerte en metafase que sea dependiente de p53.

6.4 La proteína p53 y el punto de monitoreo de la poliploidía en G1 debe detectar el daño heredado en las células y enviar hacia apoptosis

Como ya se mencionó, durante la mitosis el daño no reparado en las fases previas puede ser detectado y las células se arreararán de modo temporal en la transición metafase-anafase. Si las células logran evadir este bloqueo y salir de mitosis (proceso conocido en inglés como mitotic-slippage) no se llevarán a cabo una segregación cromosómica y/o citocinesis apropiadas, entonces debería de esperarse que las células dañadas definitivamente se arresten en su estado tetraploide durante la nueva fase G1, gracias a la activación del

denominado “punto de monitoreo de la tetraploidía de G1”; arresto que está mediado por la proteína p53 (Lanni y Jacks, 1998).

Ante las sustancias que se han utilizado como modelo en los trabajos discutidos el destino de las células FA puede ser muy disímil; por un lado se esperaría que ante la MMC las células logren dividirse y probablemente toleren el daño mediante un mecanismo alternativo de reparación que ocurriría durante la fase G2 del ciclo celular conocido como PRR (Figura 14A), esto les permitiría proliferar, pero con daño y/o mutaciones acumuladas (Lee y Myung, 2008). Ante el tratamiento con HU las células FA quizá sólo reducirían el ritmo de su ciclo celular resultando en una probable sincronización de sus células en fase S (Frias *et al*, 1996; Alvino *et al*, 2007), tal tratamiento al parecer no resultaría letal para ellas. Aunque ya ha sido demostrado que la HU es capaz de inducir CA en las células FA, éstas podrían recurrir a mecanismos alternos de reparación de su DNA o probablemente de tolerancia, como en el caso de la MMC.

Finalmente y como ya fue planteado, ante el tratamiento combinado de MMC + HU las células podrían no resistir un daño tan extenso y morir durante metafase. Sin embargo, si las células logran salir de este bloqueo, el nuevo punto de monitoreo de la poliploidía detectaría el daño y las células FA morirían en fase G1 como resultado del fallo en el intento de la segregación cromosómica (Figura 14B), es decir, el material genómico no sería segregado y se obtendrían células poliploides (Erenpreisa y Cragg, 2000). Los trabajos de Castedo y sus colaboradores (2004) han planteado que la muerte por catástrofe mitótica que acontece durante la fase G1 es dependiente de p53. En lo que respecta a la FA el trabajo de Martinez *et al* (2008) muestra que las células FA activan los genes para p53 y p21, ambos mediadores del bloqueo del ciclo celular o de la apoptosis en el caso de p53 ante la MMC y la HU. Por su parte, el trabajo de Molina *et al* (2009) ha permitido observar metafases de las células tratadas con MMC + HU con una gran cantidad de daño, lo que indica que las células transitan a metafase. Así que si las células FA logran sobrepasar todas las barreras que han sido planteadas a lo largo de este trabajo el punto de monitoreo de G1 debe responder para evitar la propagación de células poliploides o con alteraciones cromosómicas severas.

Existe un amplio consenso de que la ausencia de una proteína p53 funcional es permisiva para la generación de células poliploides sobrevivientes (Castedo *et al*, 2004) y que estas células al llegar con un estado tetraploide a G1 pueden también reduplicar su DNA y conducir a poliploidías con la subsecuente inestabilidad cromosómica. Con p53 inactivado además se puede manifestar multinucleación, amplificación de centrosomas, y aneuploidías (Verschuren *et al*, 2002). En presencia de p53, sin embargo, la tetraploidía (o la poliploidía en general) causa la activación de la proteína p21 y un arresto irreversible en el ciclo celular (o la muerte celular) de este modo se previene la propagación de errores y la generación de aneuploidías (Lanni y Jacks, 1998; Andreassen, *et al* 2001; Verschuren *et al*, 2002).

El último cerco que debe enfrentar una célula carente de alguna de las proteínas de la vía FA/BRCA sería el punto de monitoreo de G1 en un estado tetraploide, existen registros de células FA poliploides y de endorreduplicación, lo cual hace factible que las células FA lleguen hasta este punto. El destino de estas células debe ser la muerte mediada por la activación de la vía de p53, pero el número de pacientes con AML da testimonio de que la proliferación maligna existe como alternativa.





FIGURA 14. Esquema en el que se propone que: A) las lesiones en el DNA generadas en fase S por un agente alquilante como la MMC pueden ser reparadas en fase G2 por medio de PRR, o asimiladas por las células FA (Página anterior). Sin embargo, B) la adición de HU, que inhibe la síntesis de nucleótidos podría bloquear esta reparación o generar daño adicional y conducir a las células a una muerte celular por catástrofe mitótica.

6.5 El probable giro de la apoptosis hacia la necrosis.

La MMC y otros agentes alquilantes del DNA no solo actúan a nivel nuclear sino que también lo hacen al interior de la mitocondria. Estos agentes inducen la producción de aniones superóxido, dañan el DNA mitocondrial, alteran el equilibrio REDOX celular e interfieren con la producción de ATP, lo cual da como resultado disminución del crecimiento y de la sobrevivencia celular, arresto del ciclo celular y aumento de la apoptosis (Pritsos *et al*, 1997). Sin embargo, las células FA a diferencia de las sanas son capaces de resistir la muerte celular apoptótica inducida por los agentes que interfieren con su estado REDOX y/o disminuyen la producción de ATP, tales como la rodamina-1,2,3 y la doxiciclina, e incluso podrían hacerlo

con la MMC (Bogliolo *et al*, 2002). Ante estos tratamientos se esperaría que las células murieran como consecuencia de la baja producción de energía, sin embargo, en las células FA esto no sucede, incluso los niveles de ATP no varían; debido a esto se ha propuesto que la producción de ATP en las células FA podría estar asociada con un aumento de la glucólisis, sugiriendo la presencia de una anomalía funcional en sus mitocondrias (Bogliolo *et al*, 2002).

Por otro lado, las células FA son altamente susceptibles a la inhibición del metabolismo de la glucosa ocasionado por el inhibidor metabólico 2-deoxi-D-glucosa (2dG) lo que resulta en la disminución drástica de la viabilidad de las células FANCA y FANCC. Lo contrario sucede en las células sanas donde la viabilidad no se ve disminuida. Así que, al no haber disponibilidad de glucosa, las células FA no podrán continuar con el ciclo celular, aún a pesar de disponer de rutas metabólicas alternativas para procesar este monosacárido ante el daño inducido por los agentes que interfieren con el funcionamiento de las mitocondrias (Bogliolo *et al*, 2002).

La observación anterior marca la pauta para el abordaje de otro tipo de muerte independiente de caspasas que ya ha sido propuesto para las células FA (Kruyt *et al*, 1996), la necrosis (Clarke *et al*, 2004; Boamah *et al*, 2007). Ante la disminución de las concentraciones de ATP los estímulos típicamente apoptóticos cambian, es decir, las células comprometidas a sufrir apoptosis están forzadas a morir por necrosis cuando sus niveles de energía se comprometen rápidamente (Leist *et al*, 1995).

Pero, ¿cómo una célula FA puede ver comprometidos sus niveles de ATP? Ante esta interrogante nuevamente el NO surge como una molécula clave, pues el hecho de que las células FA estimuladas por citocinas como el TNF- α produzcan NO (Hadjur y Hirik, 2003), esboza un destino diferente a la apoptosis para las células FA, pues esta molécula es conocida como reguladora del giro de muerte celular apoptótica hacia una necrótica (Nicotera y Melino, 2004). Ahora bien, retomando la eliminación de la producción de ATP, esta puede ser causada por la inhibición de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GDPH) mediada por el NO, y que se ha comprobado en las células PC12 como uno de los mecanismos responsables de la neurotoxicidad del NO (Yasuda *et al.*, 1998).

El NO induce necrosis en varios sistemas celulares vía múltiples interacciones con el DNA o con grupos tiol, hemo, hierro-azufre y residuos de tirosina presentes en proteínas. Algunos de sus efectos pueden ser directos, mientras otros pueden originarse de las reacciones del NO con el anión superóxido y en altas concentraciones con el oxígeno para formar peroxinitrito (ONOO-) y agentes nitrosativos (reacciones 3 y 4). Las altas concentraciones de NO pueden inhibir procesos celulares esenciales, como la síntesis del DNA, la respiración mitocondrial y reacciones metabólicas. El NO puede reaccionar con la RR, en la cual sus blancos serían los grupos tioles y los radicales tirosilo libres requeridos para catalizar la síntesis de deoxirribonucleotidos (Roy *et al.*, 1995); puede alterar la función mitocondrial al inactivar irreversiblemente a la Citocromo c oxidasa, estimulando la producción del anión superóxido, el anión resultante a través de la formación de ONOO- inhibe irreversiblemente a los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Bolaños *et al.*, 1995). También inactiva enzimas metabólicas cruciales como la aconitasa, cuya inhibición conduciría a la pérdida de energía (Welsh *et al.*, 1991).

El ONOO- ocasiona peroxidación lipídica, clivaje químico del DNA y nitración de la tirosina libre y unida a proteína con el efecto subsecuente en la alteración de la fosforilación de las proteínas o perturbación de su estructura terciaria. ONOO- al parecer contribuye a la muerte celular a través de la activación de la enzima poli ADP ribosa sintetasa, lo cual resulta en la eliminación del ATP (Nicotera y Melino, 2004).

Los trabajos de Boamah (2007) en líneas celulares silvestres para p53 mostraron que ante el tratamiento con MMC se conducía a las células hacia una muerte apoptótica. Por el contrario en las células carentes de esta proteína el destino final era necrótico, evidenciado por el clivaje de PARP. En células FA, las cuales al parecer son eficientes en p53 (Martinez *et al.*, 2008) ante el tratamiento con MMC sin embargo se observó condensación de la cromatina sin formación de cuerpos apoptóticos, fallo en la despolarización mitocondrial y en la inducción de la activación de las caspasas, lo cual sugiere nuevamente una función anormal de las mitocondrias y una muerte celular necrótica (Clarke *et al.*, 2004), esto vuelve necesarias las investigaciones en torno a un probable giro de apoptosis a necrosis, en el que se incluyan evaluaciones de los niveles de glucosa y de NO.

La S-nitrosilación de los residuos de cisteína es una modificación que el NO es capaz de generar en las proteínas en presencia de oxígeno y que se asocia con su pérdida de función. La S-nitrosilación puede también regular la transducción de señales intracelulares al influenciar a proteínas tales como p21 y RAS (Lander *et al.*, 1995). El NO afecta la maquinaria de transcripción génica al inhibir la capacidad de unión al DNA de los factores de transcripción NF- κ B (Nuclear factor kappa B) (Matthews *et al.*, 1996; Marshall y Stamler, 2001) y de la proteína activadora AP-1 (Tabuchi *et al.*, 1994). Inclusive el NO es capaz de nitrosilar los grupos tiol de enzimas citosólicas tales como las caspasas indispensables para el proceso apoptótico (Dimmeler *et al.*, 1997; Melino *et al.*, 1997), así que por medio de la S-nitrosilación de proteínas, el NO puede ser un modulador bifuncional de la muerte celular activándola o inhibiéndola, e incluso puede regular el giro de las células comprometidas a apoptosis hacia la necrosis (Nicotera y Melino, 2004).

Este proceso no ha sido comprobado en las células FA, pero las células Jurkat T ante la exposición combinada al anticuerpo agonista de anti-CD/95 y concentraciones elevadas de SNAP (productor de NO) evitan la apoptosis (Melino, *et al.*, 1997). La inhibición de la apoptosis y el cambio hacia necrosis en las células Jurkat (Leist *et al.*, 1999) y neuronales (Volbracht *et al.*, 2001) puede ocurrir por la obstrucción de la producción del ATP mediada por NO o por prevenir directamente la activación de las caspasas (Melino *et al.*, 1997), pero como ya se mencionó, este proceso aún espera comprobación en las células FA. En la figura 15 se esquematiza como la reacción del NO con el anión superóxido podría mediar la disminución de los niveles de ATP en las células FA con la consecuente necrosis.

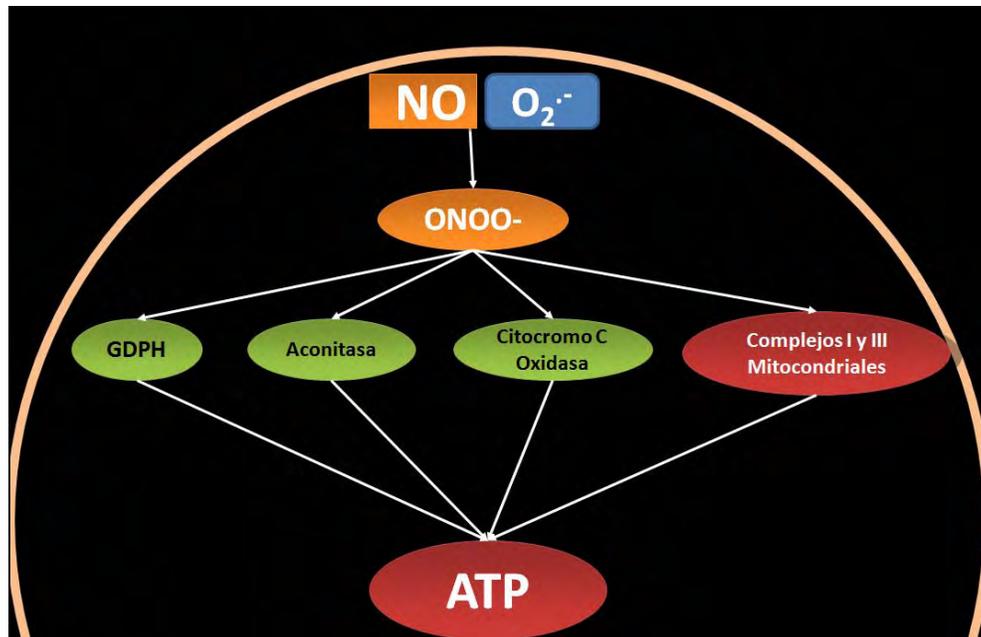


Figura 15. El NO directamente o sus intermediarios metabólicos como el peroxinitrito (ONOO), generado a partir de la reacción del NO con el anión superóxido pueden mediar el bloqueo de la producción de ATP al inactivar a diversas proteínas. La disminución de ATP tiene como consecuencia el giro de la apoptosis hacia la necrosis.

6.6 La proliferación como alternativa

La FA se caracteriza por presentar niveles muy bajos de células sanguíneas (pancitopenia) asociado a un número elevado en la muerte celular, sin embargo entre los pacientes FA las neoplasias son muy comunes, siendo la más frecuente la AML que se presenta en aproximadamente el 9% de los casos (Alter *et al*, 1996). En 2006 Vélez-Ruelas y colaboradores presentaron el caso de un niño FA de 7 años de edad, considerado hasta la fecha como el primer seguimiento en la transformación maligna de FA hacia la AML. Este estudio reveló que el paciente FA presentaba niveles muy bajos de celularidad en médula ósea (alrededor del 5%) comparados con la normalidad, sin embargo 14 meses después cuando la AML fue diagnosticada este porcentaje correspondió al 200% comparado con uno observado en sujetos sanos. Este estudio evidencia lo que desde hace mucho tiempo ha sido planteado, que una subpoblación de las células de médula ósea de los pacientes FA es capaz de escapar a la muerte celular y proliferar de modo maligno. Uno de los mecanismos

sugeridos para el decline inicial en el número de células progenitoras hematopoyéticas conducente al fallo en médula ósea puede ser la alta tasa de apoptosis, sobre lo cual las presiones del microambiente celular pueden mediar la aparición de clones mutantes resistentes a apoptosis las cuales finalmente conducirán el desarrollo de la AML (Lensch *et al*, 1999). En esta última sección abordaremos brevemente los aspectos que podrían permitir a una célula AF continuar con su ciclo celular aún a pesar del daño generado en ella por estrés oxidativo y daño genotóxico.

6.6.1 Mecanismos por medio de los cuales el NO funcionaría como un factor involucrado en la inhibición de la muerte celular en la FA.

La ejecución de la apoptosis puede ser interrumpida por el NO en sus diferentes pasos a través de la S-nitrosilación directa de los residuos de cisteína en los centros catalíticos de las proteínas ejecutoras del proceso. La producción de NO puede inhibir la muerte celular mediada por receptores de membrana celular, esto ha sido demostrado en células linfoides (Mannick *et al.*, 1994; Melino *et al*, 1997) y células endoteliales (Dimmeleer *et al.*, 1997). El NO puede interferir con la señalización río abajo de la apoptosis al actuar sobre las caspasas ejecutoras o río arriba al inhibir a las caspasas iniciadoras como caspasa 8 y factores transcripcionales como AP-1 y NF-kB (Figura 16) (Nicotera y Melino, 2004). La acción del NO podría variar en los distintos tipos celulares, dependiendo de la vía específica activada.

Para el caso de la FA el NO podría ser producto de la producción elevada del TNF- α o de los tratamientos a los que son expuestas la células, como la MMC y la HU, e incluso inhibir los procesos apoptóticos iniciados ante ellos. Esto último ha sido probado en hepatocitos de rata o células endoteliales estimuladas con TNF- α y ROS en los que la apoptosis ha sido inhibida por la adición exógena de NO (Kim *et al*, 1997; Li y Billiar, 1999). Así que la probable resistencia a los tratamientos o agentes que dañan el DNA puede provenir del bloqueo de la apoptosis.

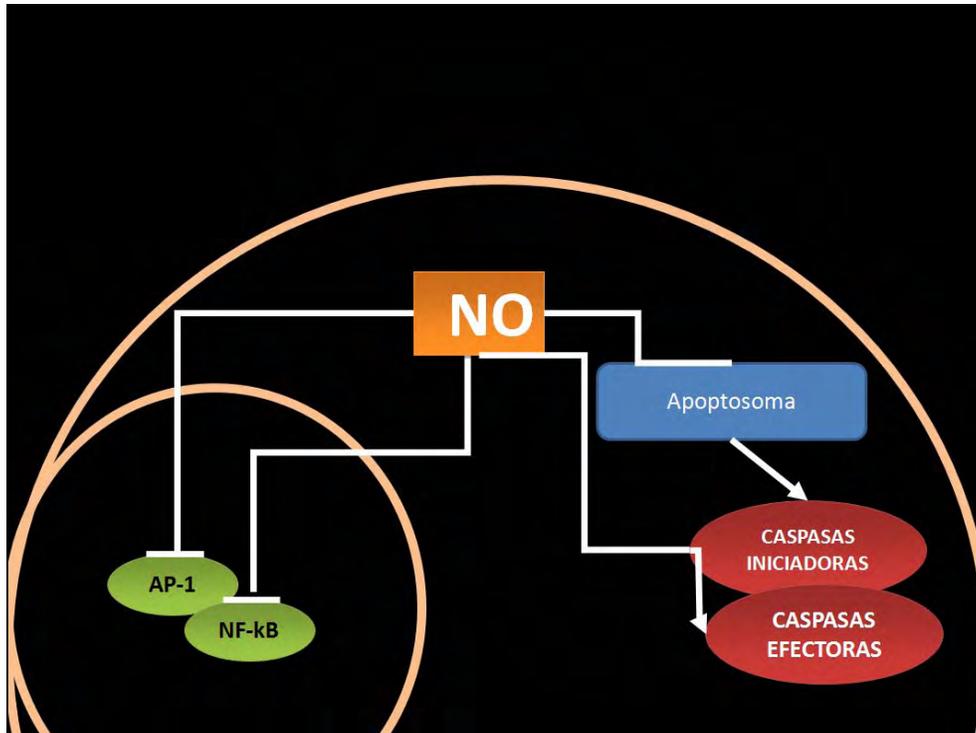


Figura 16. El NO y sus intermediarios metabólicos pueden bloquear la función de las proteínas ejecutoras de la apoptosis como las caspasas o de factores de transcripción necesarios para la síntesis de las proteínas ejecutoras del mismo proceso. De este modo, el NO puede evitar la muerte celular.

6.6.2 Resistencia al daño al DNA por medio de ATM/DNA-PKcs y la PRR.

Chanoux *et al* (2008) sugieren que las cinasas ATM y DNA-PKcs pueden tener un papel de soporte en caso de que la cinasa ATR no se active ante horquillas de replicación arrestadas o no pueda llevar a cabo su función. Entonces, de acuerdo con el modelo de la vía FA/BRCA (de Winter y Joenje, 2008), el remodelamiento de la cromatina por parte de FANCM (Gari *et al*, 2008) con la subsecuente generación de DSB no procesados apropiadamente por el Complejo FA debido a la carencia de alguna de sus proteínas, no activaría a ATR. En este caso las cinasas ATM/DNA-PKcs podrían salir al rescate de las horquillas de replicación arrestadas, entonces las células FA podrían resistir el daño y dividirse. Esto correlaciona con que ATM presenta niveles basales de expresión en células FA (Yamamoto, 2008), probablemente como respuesta a la poca funcionalidad de la vía FA/BRCA, ante lo cual ATM

mediaría la progresión de las horquillas de replicación durante la síntesis del DNA (Kennedy *et al.*, 2007).

La posibilidad de que las células FA sean capaces de proseguir su ciclo celular aún a pesar del daño en su DNA pone en escena a la PRR como probable mecanismo responsable de su proliferación, pero con la acumulación de mutaciones en el DNA como consecuencia. La polimerasa REV1 al parecer es el punto de confluencia entre la TLS mediada por el complejo ID de la vía FA/BRCA y la mediada por PCNA pues se ha mostrado que puede interactuar de modo independiente con pol ζ , pol κ o pol η , funcionando probablemente como un andamio para éstas últimas (Guo *et al.*, 2003, Huang y D'Andrea, 2006), además sus dominios de unión a ubiquitininas, UBM y UBZ, permiten a estas polimerasas interactuar con PCNA monoubiquitinizado (Bienko *et al.*, 2005). Estas polimerasas han tomado importancia debido a que las mutaciones en los genes que codifican para REV1 y/o REV3 (subunidad de la Pol ζ) resultan en hipersensibilidad a los agentes alquilantes en las células DT40 de pollo. Los trabajos de Mirchandani *et al.* (2008) mostraron que el complejo FA se requiere para el correcto funcionamiento de las polimerasas de TLS como REV1, pero también la monoubiquitinación de PCNA contribuye al reclutamiento de REV1 independientemente del complejo FA. Así que en ausencia del complejo FA, PCNA puede funcionar en la tolerancia del daño y permitir la progresión de la células carentes del complejo FA, éstas células recurrirían directamente a las proteínas Rad6/Rad18 para ubiquitinar a PCNA y recurrir a TLS por medio de alguna polimerasa que no necesariamente sea REV1 (Figura 17).

Finalmente, la ubiquitinización así como las funciones de PCNA pueden ser bloqueadas por la proteína p21 (miembro de los inhibidores de las CDKs) después del daño al DNA (Soria *et al.*, 2006), asimismo la proteólisis de p21 puede aumentar después de un estrés genotóxico que promueve la ubiquitinización de PCNA. Por consiguiente, el recambio elevado de p21 representa un aspecto significativo en la respuesta celular a la radiación UV al promover el aumento en la ubiquitinización de PCNA (Soria *et al.*, 2006). PCNA también se puede ubiquitinar después del tratamiento con HU y APH y con la acumulación de horquillas de replicación arrestadas (Kannouche *et al.*, 2004; Kannouche y Lehmann, 2004).

Martinez *et al.* (2008) en sus experimentos con MMC encontraron una expresión diferencial de PCNA en las células FA al compararlas con líneas normales tratadas, mientras que con HU se encontraron diferencias que no fueron significativas; esto quiere decir que lo están expresando para tolerar el daño en el DNA y poder dividirse. Sin embargo, P21 el regulador de PCNA, se observó también con niveles elevados de expresión cuando debería de esperarse lo contrario. Para las células FA la monoubiquitinización de PCNA después del daño al DNA podría prevenir el arresto de la horquilla de replicación al permitir que las lesiones en el DNA sean toleradas (Kannouche *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004) y reclutar a las polimerasas de TLS para continuar con el ciclo celular, mientras que su regulación negativa por p21 a su vez controlaría este proceso.

En FA la enfermedad se manifiesta debido a la carencia o mutación en alguno de los genes de la vía FA/BRCA, sin embargo la célula cuenta aún con las otras proteínas de la vía a las cuales se les han determinado interacciones y funciones adicionales a la vía FA/BRCA. Entre estas, la proteínas FANCC, con localización nuclear y citoplásmica, ha demostrado gran relevancia en procesos que controlan la sobrevivencia y muerte celular debido sobretodo a que su función se asocia con la desintoxicación de radicales libres del oxígeno, a la regulación de apoptosis y al control de la proliferación celular (Kruyt *et al.*, 1998; Cumming *et al.*, 2001), interactúa también con HSP70 (proteína de choque térmico) para prevenir la apoptosis en las células hematopoyéticas expuestas a IFN- γ y TNF α (Pang *et al.*, 2001). Participa en la activación de vías de señalización en respuesta a las citocinas y a los factores de crecimiento, en la regulación de la diferenciación mieloide y en el proceso de inflamación, y protege a las células hematopoyéticas de la apoptosis en vías independientes al complejo nuclear AF (Zanier *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005). Así que, la activación que tienen proteínas como FANC-C ante el estrés celular, las cuales son independientes de su papel en corregir el daño en el DNA, puede mediar las respuestas de sobrevivencia de las células FA.

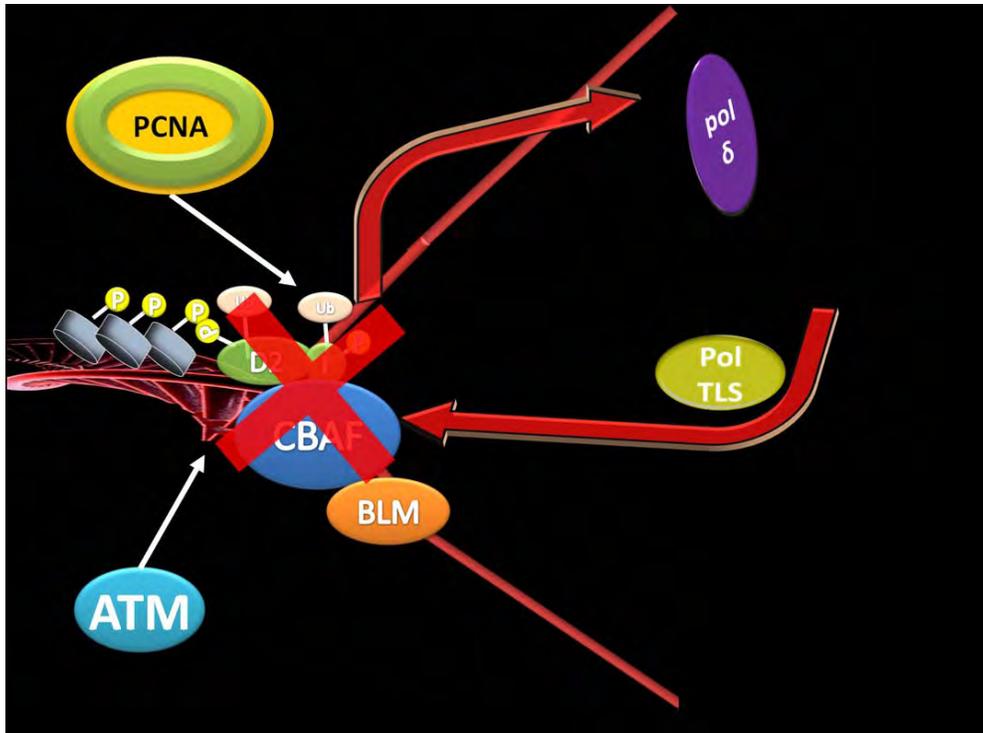


FIGURA 17. Cuando no se puede hacer frente a las lesiones generadas en el DNA por los ICL, debido a la ausencia del complejo FA, la proteína PCNA puede ser la encargada de promover la TLS. Además en ausencia de ATR, las cinasas ATM/DNA-PKcs pueden llevar a cabo las funciones señalizadoras y evitar el arresto de las horquillas de replicación.

7 CONCLUSIONES

Desde la descripción de la FA por el pediatra suizo Guido Fanconi esta enfermedad ha despertado gran curiosidad, tanto por los distintos grupos de enfermos que la conforman mostrando la heterogeneidad genética dentro de la enfermedad, así como por la relevancia que tienen sus mecanismos moleculares en la preservación de la integridad genómica. La vía FA/BRCA, nombre que se ha dado a la vía encargada de reparar los enlace covalentes cruzados en el DNA ha tomado relevancia debido a que su fallo no solo se vincula con la anemia, sino que se extiende más allá hasta la leucemia e incluso el cáncer de mama.

La principal intriga en los estudios sobre la enfermedad es la pancitopenia, pues los mecanismos por medio de los cuales las células de los enfermos son conducidas a la muerte

no han sido del todo aclarados. Desde el descubrimiento de que las células FA son altamente sensibles a los agentes alquilantes bifuncionales la MMC ha sido utilizada en la mayor parte de los estudios para entender la etiología de la enfermedad, ha permitido acercarse a su naturaleza e hizo posible la clasificación en grupos de complementación de la enfermedad. Por su parte la HU se ha integrado recientemente como modelo de estudio al descubrirse que es capaz de inducir aberraciones cromosómicas en los distintos grupos dentro de la enfermedad no solo durante la fase S, sino también durante la fase G2. Los efectos que tienen estas sustancias en las células de los enfermos y su utilización como modelos para entender la enfermedad alentaron que a lo largo de este trabajo se hiciera una revisión de los probables mecanismos por medio de los cuales estos agentes podrían conducir a la muerte celular en sistemas carentes de alguna de las proteínas de la vía FA/BRCA. Este abordaje consistió en un seguimiento de los probables efectos de la MMC y la HU, en conjunto o por separado, sobre las células FA o las cascadas de señalización que serían activadas a lo largo de cada fase del ciclo celular como respuesta a estas sustancias.

Las principales conclusiones a las que se llegó fueron las siguientes:

- 1) En las células FA la HU y la MMC podrían colaborar con el TNF α en la producción NO, el cual a su vez podría activar a la vía de p53 y de este modo inducir el arresto del ciclo celular o la muerte. Esta muerte surgiría como una respuesta al daño en el DNA y a la generación de radicales libres.
- 2) Cuando el daño a las células ocasionado por la MMC es muy grave este será detectado por los puntos de monitoreo de G1, S o G2 y la célula morirá por apoptosis, en cambio si el daño es moderado o no se detecta la célula puede recurrir a un sistema de tolerancia al daño como a PRR.
- 3) La HU es capaz de arrestar a las células FA en fase S del ciclo celular. Pero también se ha observado un mayor número de CA en células que transitan por fase G2 al momento de adicionarla en cultivos previamente dañados con MMC. En estas células la HU podría bloquear la PRR del DNA al inhibir la producción de dNTPs, al alterar la función de las proteínas del sistema NER o la señalización del punto de monitoreo de G2. Esto ha sido asociado con la aceleración de la entrada de las células a mitosis

donde podrían morir por catástrofe mitótica. Incluso si las células FA transitarán hacia la siguiente fase G1 se esperaría que el punto de monitoreo de la poliploidía las detectara y murieran como resultado del fallo mitótico.

- 4) Una célula FA comprometida a un proceso apoptótico podría cambiar hacia uno necrótico a través de la disminución de sus niveles de ATP. En las células FA el NO sería el mediador de este cambio si la hipótesis de su producción elevada fuese cierta y bloqueara la producción de ATP.
- 5) Dos mecanismos podrían mediar la proliferación de algunas de las células FA aún a pesar del daño en su genoma. El primero sería dependiente de la acción dual del NO, que bloquearía la apoptosis al modificar los centros catalíticos de las proteínas ejecutoras del proceso, como las caspasas. El segundo proceso consistiría en el rescate de las horquillas de replicación mediado por las cinasas ATM o DNA-PKcs; y/o la PRR en el que la proteína PCNA reclutaría a las polimerasas de TLS, permitiendo la síntesis del DNA aún a pesar de la presencia de daño.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J.M. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 15; 17(20):2481-95.
- Afanas'ev, I.B. 2005. Superoxide and nitric oxide in pathological conditions associated with iron overload. The effects of antioxidants and chelators. *Curr Med Chem* 12: 2731-2739.
- Alter, B.P. 2003. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer* 97:425-440.
- Alvino, G.M., Collingwood, D., Murphy, J.M., Delrow, J., Brewer, B.J. y Raghuraman, M.K. 2007. Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol Cell Biol* 27(18):6396-406.
- Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Lohez, O.D. y Margolis, R.L. 2001. Neither p21WAF1 nor 14-3-3sigma prevents G2 progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21WAF1 induces stable G1 arrest in resulting tetraploid cells. *Cancer Res* 61(20):7660-8.
- Auerbach A.D., Rogatko A. y Schroeder-Kurt, T.M. 1989. International Fanconi Anemia Registry: Relation of clinical symptoms to diepoxibutane sensitivity. *Blood* 73: 391-396.
- Baliga, B.C., Read, S.H. y Kumar, S. 2004. Biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Diff* 11:1234-1241.
- Barbour, L. y Xiao, W. 2003. Regulation of alternative replication bypass pathways at stalled replication forks and its effects on genome stability: a yeast model. *Mutat Res* 532(1-2):137-55.
- Bartek, J. y Lukas, J. 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3: 421-429.
- Bartek, J., Bartkova, J. y Lukas, J. 1997. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cáncer. *Exp Cell Res* 237: 1-6.
- Bartek, J., Lukas, C. y Lukas, J. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Natur Rev Mol Cell Biol* 5: 792-804.

- Bienko, M., Green, C.M., Crosseto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P. Wider, G., Peter, M., Lehman, A.R. Hofman, K. y Dikic, I. 2005. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulates translesion synthesis. *Science* 310, 1821-1824.
- Blain, S.W., Scher, H.I., Cordon-Cardo, C. y Koff, A. 2003. P27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 3: 111-115.
- Boamah, E.K., White, D.E. Talbott, K.E., Arva, N.C., Berman, D., Tomasz, M. y Bargonetti, J. 2007. Mitomycin-DNA adducts induce p53-dependent and p53 independent cell death pathways. *ACS Chem Biol* 2 (6): 399-407.
- Bogliolo, M., Borghini, S., Abbandonolo, A. y Degan, P. 2002. Alternative metabolic pathways for energy supply and resistance to apoptosis in Fanconi Anemia. *Mutagenesis* 17:25-30.
- Bolaños, J.P., Heales, S.J., Land, J.M. y Clark, J.B. 1995. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 64(5):1965-72.
- Bree, R.T., Neary, C., Samali, A. y Lowndes, N.F. 2004. The switch from survival responses to apoptosis after chromosomal breaks. *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9): 989-95.
- Briot, D., Macé-Aimé, G., Subra, F. y Rosselli, F. 2008. Aberrant activation of stress response pathways leads to TNF-alpha oversecretion in Fanconi anemia. *Blood* 111(4): 1913-23.
- Brown, E.J. y Baltimore, D. 2003. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* 17: 615-628.
- Carnevale, A. y Frias, S. 1985. Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la mitomicina C de los linfocitos de anemia de Fanconi. *Rev Invest Clin (Mex.)* 37: 31-34.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., y Kroemer, G. 2004a. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23: 2825-2837.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Valent, A., Raslova, H., Yakushjin, K., Horne, D., Feunteun, J., Lenoir, G., Medema, R., Vaincheker, W. y Kroemer, G. 2004b. Mitotic

- catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 23:4362-4370.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Yakushjin, K., Horne, D., Medema, R., Vaincheker, W. y Kroemer, G. 2004c. The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. *Oncogene* 23:4353-4361.
- Chanoux, R.A., Yin, B., Urtishak, K.A., Asare, A., Bassing, C.H. y Brown, E.J. 2009. ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J Biol Chem.* 284(9):5994-6003.
- Chien, Y.H., Bau, D.T. y Jan, K.Y. 2004. Nitric oxide inhibits DNA-adduct excision in nucleotides excision repair. *Free Radic Biol Med* 36(8): 1011-1017.
- Clarke, A.A., Gibson, F.M., Scott, J., Myatt, N. y Rutherford, T.R. 2004. Fanconi's anemia cell lines show distinct mechanisms of cell death in response to mytomicin C or agonistic anti-Fas antibody. *Haematological* 89:11-20.
- Clarke, A.A., Philpott, N.J., Gordon-Smith, E.C. y Rutherford, T.R. 1997. The sensitivity of Fanconi Anemia group C cells to apoptosis induced by mitomycin C is due to oxygen radical generation, not DNA crosslinking. *Br J Haematol* 96(2): 240-247.
- Clarke, A.A., Philpott, N.J., Gordon-Smith, E.C. y Rutherford, T.R. 1997. The sensitivity of Fanconi anaemia group C cells to apoptosis induced by mitomycin C is due to oxygen radical generation, not DNA crosslinking. *Br J Haematol* 96(2):240-247.
- Codogno, P. y Meijer, A.J. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Diff* 12: 1509- 1518.
- Cokic, V.P., Beleslin-Cokic, B.B., Noguchi, C.T., Schechter, A.N. 2007. Hydroxyurea increases eNOS protein levels through inhibition of proteasome activity. *Nitric Oxide* 16(3):371-8.
- Corradetti, M.N. y Guan, K.L. 2006. Upstream of the mammalian target of rapamycin, do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 25: 6347-6360.

- Cumming, R.C., Lightfoot, J., Beard, K., Youssoufian, H., O'Brien, P.J. y Buchwald, M. 2001. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Med* 7(7):814-820.
- de Winter J.P. y Joenje, H. 2008. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat Res Nov* 14. PMID: 19061902
- Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W. y Vadenabeele, P. 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 58: 356.
- Dimmeler, S., Rippmann, V., Weiland, U., Haendeler, J. y S  ller, A.M. 1997. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81(6):970-6.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. y Taylor, S.S. 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* 161(2):267-280.
- Dutrillaux, B., Aurias, A., Dutrillaux, A.M., Briot, D. y Prieur, M. 1982. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Human Genet* 62:327-332.
- Ellison, V. y Stillman, B. 2001. Opening of the clamp: an intimate view of an ATP- driven biological machine. *Cell* 106: 655-660.
- Erden, C.D., Ekmekci, A., Sqahin, F.I., Ergun, M.A., Ozturk, G. y Erbas, D. 2002. L-Arginine and mitomycin C-induced nitric oxide release and apoptosis in human lymphocytes. *Cell Biol Int* 27: 337-340.
- Escarceller, M., Buchwald, M., Singleton, B.K., Jeggo, P.A., Jackson, S.P., Moustacchi, E. y Papadopoulo, D. 1997. Fanconi anemia C gene product plays a role in the fidelity of blunt DNA end-joining. *J Moll Biol* 279: 375-385.
- Esmer, M.C., Carnevale, A., Molina, B., Cruz-Alc  var, R., Sánchez, S., Gómez, L. y Frias, S. 1999. Variabilidad clínica y citogenética en doce familias mexicanas con anemia de Fanconi

- y su relación con el grupo de complementación al que pertenecen. *Rev Invest Clin* 51: 273-283.
- Esmer, M.C., Sánchez, S., Ramos, S., Molina, B., Frias, S. y Carnevale, A. 2004. DEB test for Fanconi Anemia detection in patients with atypical phenotypes. *Am J Med Genet* 12A: 35-39.
- Frias, S., Carnevale, A. y Del Castillo V. 1984. Utilidad de la prueba de exposición de linfocitos a mitomicina C en el diagnóstico de anemia de Fanconi. *Rev Invest Clin (Mex)* 36: 219-224.
- Frias, S., Carnevale, A., Molina, B. y Del Castillo, V. 1986. Estudio de heterogeneidad genética en anemia de Fanconi. *Rev Invest Clin (Mex.)* 38: 269-271.
- Frias, S., Gómez, L., Molina, B., Rojas, E., Ostrosky, P. y Carnevale, A. 1996. Effect of Hydroxyurea and normal plasma on DNA in lymphocytes from Fanconi anemia patients. *Mut Res* 357: 115-121.
- Galluzzi, M.C., Maluri, I., Vitale, H., Zischka, M., Castedo, L., Zitvogel y Kroemer, G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Diff* 14:1237-1266.
- Gangavarapu, V., Prakash, S. y Prakash, L. 2007. Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 27(21):7758-64.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M. y D'Andrea, A.D. 2001. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7(2):249-262.
- Gari, K., Décaillet, C., Delanoy, M., Wu, L. y Constantinou, A. 2008. Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(42): 16107-16112.
- Gille J.J., Wortelboer H.M., Joenje, H. 1987. Antioxidant status of Fanconi anemia fibroblasts. *Hum Genet* 77(1):28-31.

- Gozuacik, D. y Kimchi, A. 2004. Autophagy as a cell death tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23:2891-2906.
- Green, D. y Kroemer, G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 8(7):267-271.
- Guo, C., Fischhaber, P.L., Luk-Paszyc, M.J., Masuda, Y., Zhou, J., Kamiya, K., Kisker, C. y Friedberg, E.C. 2003. Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. *EMBO J* 22:6621-6630.
- Gurtan, A.M. y D'Andrea, A.D. 2006. Dedicated to the core: Understanding the Fanconi anemia complex. *DNA repair (Amst)* 5:1119-1125.
- Hadjur, S. y Jirik, F.R. 2003. Increased sensitivity of Fancc-deficient hematopoietic cells to nitric oxide and evidence that this species mediates growth inhibition by cytokines. *Blood* 101(10):3877-3884.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Nudelman, R. y Stamler, J.S. 2001. S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat Cell Biol* 3(2):E46-9.
- Hoeijmakers, J.H.J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nat* 411: 366-374.
- Houghtaling, S., Granville, L., Akkari, Y., Torimaru, Y., Olson, S., Finegold, M. y Grompe, M. 2005. Heterozygosity for p53 (Trp53+/-) accelerates epithelial tumor formation in Fanconi anemia complementation group D2 (FANCD2) knockout mice. *Cancer Res* 65(1): 85-92.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E.A. y D'Andrea, A.D. 2002. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. *Science* 297: 606-609.
- Høyer-Hansen, M. y Jäättelä, M. 2007. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Diff* 14: 1576-1582.
- Huang, T.T. y D'Andrea, A.D. 2006. Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 323-334.

- Jacquemont, C. y Taniguchi, T. 2007. The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochem* 22;8 Suppl 1:S10.
- Jin, J., Ang, X.L., Ye, X., Livingstone, M. y Harper, J.W. 2008. Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of CDC25A protein phosphatase. *J Biol Chem* 283(28):19322-19328.
- Joenje, H. y Oostra, A.B. 1983. Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi Anaemia. *Human Genet* 65(2):99-101.
- Joenje, H. y Patel, K.J. 2001. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Reviews* 2: 446-457.
- Joenje, H., Eriksson, A.W., Frants, R.R., Arwert, F. y Houwen, B. 1978. Erythrocyte superoxide-dismutase deficiency in Fanconi's anaemia. *Lancet* 1(8057):204.
- Joenje, H., Lo Ten Foe, J.R., Oostra, A.B., van Berkel, C.G.M., Rooimans, M.A., Schroeder-Kurt, T., Wegner, R.D., Guille, J.J.P., Buchwald, M. y Arwert, F. 1995. Classification of Fanconi Anemia patients by complementation analysis: Evidence for a fifth genetic subtype. *Blood* 86:2156-2161.
- Kan, Q., Jinno, S., Yamamoto, H. y Okayama, H. 2007. Chemical DNA damage activates p21WAF1/CIP1- dependent intra-S checkpoint. *FEBS Letters* 581(30): 5879-5884.
- Kannouche, P.L, Lehmann, A.R. 2004. Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* 3(8):1011-3.
- Kannouche, P.L., Wing, J. y Lehmann AR. 2004. Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* 21;14(4):491-500.
- Kastan, M.B. y Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nat* 432(7015):316-323.
- Kastan, M.B. y Lim, D.S. 2000. The many substrates and functions of ATM. *Mol Cell Biol* 1: 179-186.

- Kelly, T.J. y Brown, G.W. 2000. Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem* 69:829-880.
- Kennedy, R.D. y D'Andrea, A.D. 2005. The Fanconi anemia/BRCA pathway: new perspectives in the crowd. *Genes Dev* 19: 2925-2940.
- Kennedy, R.D., Chen, C.C., Stuckert, P., Archila, E.M., De la Vega, M.A., Moreau, L.A., Shimamura, A. y D'Andrea, A.D. 2007. Fanconi anemia pathway-deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *J Clin Invest* 117(5):1440-1449.
- Kim, Y.M., Talanian, R.V. y Billiar, T.R. 1997. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 272(49):31138-48.
- King, B. 2004. Serial review: mechanisms and novel directions in the biological applications of nitric oxide donors. *Free Radic Biol Med* 37(6):737-774.
- Kitagawa, R., Bakkenist, C.j., McKinnon, P.J. y Kastan, M.B. 2004. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 18:1423-1438.
- Kops, G.J., Weaver, B.A. y Cleveland, D.W. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5(10):773-785.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Placentini, M., Nagata, S. y Melino, G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death. *Cell Death Diff* 12: 1463-1467.
- Kruyt, F.A., Dijkmans, L.M., van den Berg, T.K. y Joenje, H. 1996. Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 87:936-948.

- Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S.D., Berwick, M., Giampietro, P.F., Hanenberg, H. y Auerbach, A.D. 2003. A 20 –year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 101: 1249-1256.
- Lander, H.M., Ogiste, J.S., Teng, K.K. y Novogrodsky, A. 1995. P21-RAS as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 270(36):21195-8.
- Lanni, J.S. y Jacks, T. 1998. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol* 18(2):1055-1064.
- Lee, K.Y. y Myung, K. 2008. PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Mol Cells* 26(1):5-11.
- Leist, M., Gantner, F., Jilg, S. y Wendel, A. 1995. Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol* 154(3):1307-16.
- Lensch, M.W., Rathhbun, R.K. y Olson, S.B. 1999. Selective pressure as an essential force in molecular evolution of myeloid leukemic clones: A view from the window of Fanconi Anemia. *Leukemia* 13:1784-1789.
- Levine, B. y Klionsky, D.J. 2004. Development by self digestión: molecular mechanism and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463-477.
- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M.A., Pals, G., Arwert, F., Mathew, C.G., Zdzienicka, M.Z., Hiom, K., De Winter, J.P., Joenje H. 2005. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 37(9):934-935.
- Levitus, M.W., Rooimans, M., Steltenpool, J., Cool, N., Oostra, A., Mathew, C., Hoatlin, M., Waisfisz, Q., Arwet, F., de Winter, J. y Joenje, H. 2004. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 103: 2498-2303.

- Li, C.Q., Robles, A.I., Hanigan, C.L., Hofseth, L.J., Trudel, L.J., Harris, C.C. y Wogan, G.N. 2004. Apoptotic signaling pathways induced by nitric oxide in human lymphoblastoid cells expressing wild-type or mutant p53. *Cancer Res* 64: 3022-3029.
- Li, J. y Billiar, T.R. 1999. The anti-apoptotic actions of nitric oxide in hepatocytes. *Cell Death Differ* 6(10):952-5.
- Li, X. y Heyer, W.D. 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18(1):99-113.
- Lin, S.Y., Li, K., Stewart, G.S. y Elledge, S.J. 2004. Human claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6484-6489.
- Lipinsky, M.M. y Jacks, T. 1999. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogen* 18: 7837-7882.
- Mannick, J.B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E. y Stamler J.S. 1994. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79(7):1137-46.
- Marshall, H.E. y Stamler, J.S. 2001. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry*. 40(6):1688-9
- Martínez, A., Hinz, J.M., Gómez, L., Molina, B., Acuña, H., Jones, I.M., Frias, S. y Coleman, M.A. 2008. Differential expression of TP53 associated genes in Fanconi Anemia cells after Mitomycin C and Hidroxyurea treatment. *Mut Res* 656(1-2):1-7.
- Masao, S. y Tonomura, A. 1973. A high susceptibility of Fanconi 's Anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res* 33:1829-1936.
- Massagué, J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nat* 432(7015):298-306.
- Matthews, J.R., Botting, C.H., Panico, M., Morris, H.R. y Hay, R.T. 1996. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 24(12):2236-42.

- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M.B., Katzir, E. y Oren, M. 2001. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 2001 May 1;15(9):1067-1077.
- McManus, K.J. y Hendzel, M.J. 2005. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16(10):5013-5025.
- Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M., Yang, D., Young, M. K., Joenje, H., Hoatlin, M. E. y Wang, W. 2003. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome, *Mol Cell Biol* 23(10):3417-3426.
- Melino, G., Bernassola, F., Knight, R.A., Corasaniti, M.T., Nistico, G. y Finazzi-Agro A. 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 388(6641):432-3.
- Mirchandani, K.D., McCaffrey, R.M., D'Andrea, A.D. 2008. The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. *DNA Repair (Amst)* 1;7(6):902-11.
- Molina, B. y Frias, S. 2006. Anemia de Fanconi: Fenotipo Clínico, Celular y Molecular. En: Pimentel, E., Ortiz, A.R. y Breña, M. (eds). *Tópicos de Genética*. CEDIMSA, Toluca, México. pp 319-344.
- Molina, B., Gómez, L., Hernández-Jardines, A., Ortiz, R., Marchetti, F., Altamirano-Lozano, M., Carnevale, A. y Sara Frias. 2009. Hydroxyurea induces chromosomal aberrations in Fanconi anemia cells from complementation groups A, B, C, D1 and E. En proceso.
- Nakanishi, K., Taniguchi, T., Ranganathan. V., New, H.V., Moreau, L.A., Stotsky, M., Mathew, C.G., Kastan, M.B., Weaver, D.T. y D'Andrea, A.D. 2002. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol* 4 (12):913-920.
- Nicotera, P. y Melino, G. 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23(16):2757-65.

- Niedernhofer L.J. 2007. The Fanconi anemia signalosome anchor. *Mol Cell* 23;25(4):487-90.
- Niedzwiedz, W., Mosedale, G., Johnson, M., Ong, C.Y., Pace, P. y Patel, K.J. 2004. The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. *Mol Cell* 15: 607-620.
- Nigg, E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* ;2(1):21-32
- Noda, T. y Oshumi Y. 1998. TOR, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273: 3963-3966
- Okada, H. y Mak, T.W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4(8):592-603.
- Osborn, A. J., Elledge, S. J y Zou, L. 2002. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* 12: 509-516
- Pagano, G. y Youssoufian, H. 2003. Fanconi Anemia proteins: major roles in cell protection against oxidative damage. *Bioessays* 25(6): 589-95.
- Pang, Q., Keeble, W., Christianson, T.A., Faulkner, G.R. y Bagby, G.C. 2001. FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *EMBO J.* 20(16):4478-4489.
- Pearl-Yafe, M., Halperin, D., Sheueman, O. y Fabian I. 2004. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol* 1;67(3): 539-46
- Pérez de Castro, I., de Cárcer, G., Malumbres, M. 2007. A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis* 28(5):899-912.
- Pines, J. y Rieder, C.L. 2001. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 3(1):E3-6.

- Porfirio B., Ambroso, G., Gianella, G., Isacchi, G. y Dallapicola, B. 1989. Partial correction of chromosome instability in Fanconi anemia by desferrioxamine. *Hum Genet* 83: 49-51.
- Prasanth, S.G., Mendez, J., Prasanth, K.V. y Stillman, B. 2004. Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle. *Phil Trans R Soc Lond B* 359, 7-16
- Pristos, C.A., Brigs, L.A y Gustafson, D.L. 1997. A new celular target for mitomycin C: a case for mitochondrial DNA. *Oncol Res* 9: 333-337
- Robertson, J.D., Enoksson, M., Suomela. M., Zhivotovsky, B. y Orrhenius, S. 2002. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote Cytochrome c relase during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277(33): 29803-29809.
- Rodriguez-Enriquez S., He, L. y Lemasters, J.J. 2004. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2436-2472
- Rosenberg, P.S., Greene, M.H. y Alter B.P. 2003. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 101: 822-826
- Rosselli, F., Sanceae, J., Wietzerbin, J. y Moustacchi, E. 1992. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. *Hum Genet* 89: 42-48.
- Roy, B., Lepoivre, M., Henry, Y. y Fontecave, M. 1995. Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: reversible modifications of both subunits. *Biochemistry* 34(16):5411-8.
- Sabatini, D.M. 2006. mTOR and cancer, insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 6:729-734.
- Salgo, M.G., Squadrito, G.L. y Pryor, W.A. 1995. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 215(3):1111-1118.
- Sclafani, R.A. y Holzen, T.M. 2007. Cell Cycle regulation of DNA replication. *Ann Rev Genet* 41: 237-280.

- Sears, R.C y Nevins, J.R. 2002. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* 277:11617-11620.
- Shechter, D., Costanzo, V y Gautier, J. 2004. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 901-908.
- Shen, X., Jun, S., O'Neal, L.E., Sonoda, E., Bemark, M., Sale, J.E. y Li, L. 2006. REV3 and REV1 play major roles in recombination-independent repair of DNA interstrand cross-links mediated by monoubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Biol Chem* 281(20):13869-13872.
- Sherr, C.J y Roberts, J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1- phase progression. *Genes Dev* 13:1502-1512.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. y Prives, C. 2000. The human homologs of checkpoint kinases CHK1 and CDS1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14: 289-300
- Shultz, J.C y Shahidi, N.T. 1993. Tumor necrosis factor-alpha overproduction in Fanconi's anemia. *Am J Hematol* 42(2): 196-201.
- Smirnova, M. y Klein, H.L. 2003. Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res* 532(1-2):117-135.
- Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R. 3rd., Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D. y Elledge SJ. 2007. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 129(2):289-301.
- Sobeck, A., Stone, S. y Hoatlin, M.E. DNA structure-induced recruitment and activation of the Fanconi anemia pathway protein FANCD2. *Mol Cell Biol* 27(12):4283-4292.
- Soria, G., Podhajcer, O., Prives, C. y Gottifredi, V.. 2006. P21Cip1/WAF1 downregulation is required for efficient PCNA ubiquitination after UV irradiation. *Oncogene* 25(20):2829-38.

- Steveaux, O. y Dyson, N.J. 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14: 684-691
- Strathdee, C.A., Gavish H., Shannon, W.R., Buchwald, M. 1992. Cloning of cDNAs for Fanconi's anemia by functional complementation. *Nat* 356:763.
- Strauss, S.J., Higginbottom, K., Jülicher, S., Maharaj, L., Allen, P., Schenkein, D., Lister, T.A., Joel, S.P. 2007. The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Res* 67(6):2783-90.
- Tabuchi, A., Sano, K., Oh, E., Tsuchiya, T. y Tsuda, M. 1994. Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett.* 351(1):123-7
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M y D'Andrea, A.D. 2002. S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein FANCD2, with BRCA1 and RAD52. *Blood* 1:100(7):2414-20.
- Thompson, L.H., Hinz, J.M., Yamada, N.A. y Jones, N.J. 2005. How Fanconi anemia proteins promote the four Rs: replication, recombination, repair, and recovery *Environ Mol Mutagen* 45(2-3):128-142.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C. y Greenberg, M.E. 2003. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 172: RE5.
- Ulrich, H.D. 2006. Deubiquitinating PCNA: a downside to DNA damage tolerance. *Nat Cell Biol* 8(4):339-47.
- Unsal-Kacmaz, K. y Sancar, A. 2004. Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Mol Cell Biol* 24: 1292-1300.
- van den Heuvel, S. 2005. Cell-cycle regulation. *WormBook* 21:1-16.
- Véles-Ruelas, M.A., Martínez-Jaramillo, G., Arana-Trejo, R.M. y Mayani, H. 2006. Hematopoietic changes during progression from Fanconi Anemia into acute myeloid leukemia: case report and brief review of the literatura. *Hematology* 11(5/6): 331-334.

- Verschuren, E.W., Klefstrom, J., Evan, G.I. y Jones, N. 2002. The oncogenic potential of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin is exposed by p53 loss in vitro and in vivo. *Cancer Cell* 2(3):229-41.
- Vivanco, I. y Sawyers, C.L. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cáncer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.
- Volbracht, C., Leist, M., Kolb, S.A., Nicotera, P. 2001. Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol Med* 7(1):36-48.
- Wang, W. 2007. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 8(10): 735-746.
- Wang, X., Andreassen, P.R. y D'Andrea, A.D. 2004. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* 24(13):5850-5862.
- Wang, Y., Cortez, D. Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. y Qin, J. 2000. BASC, a supercomplex of BRCA1- associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 15; 14(8). 927-39.
- Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsusimoto, T., Inoue, H. y Yamaizumi, M. 2004. Rad18 guide pol eta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J* 23: 3886-3896.
- Welsh, N., Eizirik, D.L., Bendtzen, K. y Sandler, S. 1991. Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. *Endocrinology* 129(6):3167-73
- Wolanin, K., Magalska, A., Mosieniak, G., Klinger, R., McKenna, S., Vejda, S., Sikora, E. y Piwocka K. 2006. Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells. *Mol Cancer Res.* 4(7):457-69.

- Xia, B., Dorsman, J.C., Ameziane, N., de Vries, Y., Rooimans, M.A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J., Wang, W., Livingston, D.M., Joenje, H. y de Winter. J.P. 2007. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet* 39(2):159-161.
- Xu, X. y Stern, D.F. 2003. NFB1/KIAA0170 is a chromatin-associated protein involved in DNA damage signaling pathways. *J Biol Chem* 278: 8795-8803.
- Yamamoto, K., Nihrane, A., Aglipay, J. Sironi, J., Arkin, S., Lipton, J.M., Ouchi, T. y Liu, J.M. 2008. Upregulated ATM gene expression and activated DNA crosslink-induced damage response checkpoint in Fanconi Anemia: implications for carcinogenesis. *Mol Med* 14(3-4): 167-174.
- Yan, H. y Newport, J. 1995. An analysis of the regulation of DNA synthesis by CDK2, CIP1 and Licensing Factor. *J Cell Biol* 129(1): 1-15.
- Yasuda, M., Fujimori, H. y Panhou, H. 1998. NO depletes cellular ATP contents via inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in PC12 cells. *J Toxicol Sci* 23(5):389-94.
- Zakrzewski, S. y Sperling, K. 1980. Genetic heterogeneity of Fanconi's anemia demonstrated by somatic cell hybrids. *Hum Genet* 56: 81-84.
- Zamzami, N. y Kroemer, G. 2003. Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization--the (w)hole story? *Curr Biol* 13(2):R71-3.
- Zanier, R., Briot, D., Dugas du Villard, J.A., Sarasin, A. y Rosselli, F. 2004. Fanconi anemia C gene product regulates expression of genes involved in differentiation and inflammation. *Oncogene* 23(29):5004-5013.
- Zhang, Z., Turner, D.C., Drzewiecki, G.J., Hinshaw, D.B. y Hyslop, P.A. Impairment of integrin-mediated cell-matrix adhesion in oxidant-stressed PC12 cells. *Brain Res* 662(1-2):189-97.
- Zu, L. y Elledge, S.J. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300(5625): 1542 – 1548.