



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Asociación del polimorfismo en la región 5'UTR de XPA (*Xeroderma Pigmentosum* grupo A) con la respuesta al tratamiento con cisplatino, estudio *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

IVÁN SANTANDER RODEA.

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

2012





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.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Abreviaturas empleadas en el texto.....	3
Abreviaturas de medidas y reactivos.....	7
INTRODUCCIÓN	9
1. Daño al DNA	9
1.1. Principales agentes involucrados en el daño al DNA.....	10
1.2. Cisplatino: Mecanismo de acción y aplicación.....	12
2. Mecanismos de reparación del DNA	16
2.1. Reparación por escisión de bases (BER).....	17
2.2. Reparación de bases mal apareadas (MISMATCH REPAIR).....	19
2.3. Reparación por recombinación homóloga (HRR) y reparación de extremos no homólogos (NHEJ).....	19
2.4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	22
2.5. Reparación acoplada a la transcripción (TCR).....	23
2.6. Reparación global del genoma (GGR).....	25
3. Xeroderma Pigmentoso grupo A (XPA). Localización, estructura y función en la vía NER	27
4. Polimorfismos como fuentes de variación del genoma	31
4.1. Polimorfismo 5'UTR de XPA. Localización y posible implicación biológica.....	32
JUSTIFICACIÓN	33
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	34
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	34
- Objetivo general.....	34
- Objetivos particulares.....	34
METODOLOGÍA	35
- Obtención de sangre periférica de una población mexicana de donadores aparentemente sanos.....	35

- Aislamiento de DNA genómico por medio de fenol/cloroformo/isoamílico	35
- Cuantificación de cantidad y pureza del DNA	37
- Amplificación del fragmento de interés mediante PCR	38
- Genotipificación del polimorfismo en la región 5'UTR A→G de XPA mediante análisis de polimorfismo del tamaño de fragmento por enzima de restricción (RFLP por sus siglas en inglés)	39
- Aislamiento y cultivo de linfocitos a partir de sangre periférica	41
- Determinación de la concentración letal citotóxica 50	42
- Evaluación de la viabilidad en función del genotipo	44
- Determinación del daño al DNA mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN)	44
- Análisis estadístico	47
RESULTADOS	48
- Muestras de población mexicana aparentemente sana. Extracción de DNA, amplificación de fragmento de interés y genotipificación del polimorfismo 5'UTR de XPA	48
- Determinación de IC50 y viabilidad en función del genotipo	50
- Evaluación del daño al DNA mediante la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis	51
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIÓN	60
ANEXOS	61
GLOSARIO DE TERMINOS	61
REFERENCIAS	65

RESUMEN.

Introducción. XPA es una proteína de unión al DNA encargada de identificar la cadena dañada dentro de la vía NER. Actúa de manera conjunta con TFIIH, RPA y ERCC1. En 1999 Koberle y cols. demostraron que niveles bajos de la proteína XPA explican la disminuida capacidad de la vía NER para remover aductos inducidos por cisplatino (CDDP) en tumores cáncer de testículo, motivo por el cual, se muestra una alta sensibilidad a la terapia basada en platinos. En el año 2000 Butkiewicz y cols. identificaron un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la región 5'UTR de XPA. Esta modificación consiste en la transición de una Adenina por Guanina (A→G) cuatro nucleótidos río arriba (-4) del codón de inicio ATG. Posteriormente, en el 2009 Feng y cols. observaron que la presencia del SNP 5'UTR A→G de XPA predice la respuesta al tratamiento basado en platino en pacientes de cáncer de pulmón. Demostraron que individuos con mejor respuesta al tratamiento presentaban al menos un alelo polimórfico, proponiendo que el daño inducido por el CDDP no es reparado adecuadamente, generando mayor muerte celular.

Objetivo. Analizar la asociación entre la presencia del SNP 5'UTR A→G de XPA con la respuesta al tratamiento con CDDP en linfocitos.

Hipótesis. Células con genotipo homócigo silvestre tendrán una mayor capacidad de reparación del DNA y, por lo tanto, mayor viabilidad en comparación con las células portadoras del genotipo homócigo polimórfico.

Método. Se obtuvieron muestras de sangre periférica de individuos **aparentemente sanos** para el aislamiento de DNA genómico. Fue determinado el genotipo mediante la técnica de RFLP. La LC50 y la viabilidad celular en función del genotipo fueron establecidas en linfocitos tratados con CDDP después de las 24 h de tratamiento. El daño al DNA se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.

Resultados. Se analizaron 87 muestras de las cuales 13 (15%) fueron homócigos silvestres (AA), 50 (57%) heterócigos (AG) y 24 (28%) homócigos polimórficos (GG). Células con al menos un alelo polimórfico presentan una LC50 menor en comparación con las células portadoras del genotipo homócigo silvestre. Las LC50 fueron las siguientes: homócigos silvestres **>96 μM** , heterócigos **88.3 μM** y homócigos polimórficos **70.9 μM** . Células con genotipos AG y GG fueron más sensibles al daño en el DNA, lo cual se ve reflejado en un mayor conteo de micronúcleos, a diferencia de células con genotipo AA.

Conclusión. Los resultados expuestos en el presente estudio sugieren que la presencia del polimorfismo 5'UTR A→G de XPA, disminuye la viabilidad celular en linfocitos con el genotipo homócigo polimórfico en comparación con células homócigo silvestre. Errores durante la reparación del DNA en respuesta a la exposición a cisplatino, podrían explicar dichos resultados.

ANEXOS.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO.

APE1	Endonucleasa Apurinca/apirimidinica 1
BER	Reparación por escisión de bases.
BRCA1	Cáncer de mama 1
BRCA2	Cáncer de mama 2
CBMN	Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis
CDDP	Cis-diamino-dicloro-platino. Cisplatino
CPD's	Dímeros de pirimidina ciclobutano
CSA	Síndrome de Cocaine grupo A
CSB	Síndrome de Cocaine grupo B
DBS	Rompimientos de doble cadena
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNA Lig	Ligasa de DNA
DNA Pol	Polimerasa de DNA
DNA-PKc	Proteína cinasa dependiente de DNA, subunidad catalítica.
ERCC1	Escision repair cross-complementing 1

EXO1	Exonucleasa 1
FEN-1	Endonucleasa Flap 1
GGR	Reparación global del genoma
HHR	Reparación por recombinación homóloga
LC50	Concentración Letal 50
INcan	Instituto Nacional de Cancerología
KU70-KU80	Heterodímero de reconocimiento daño en la vía NHEJ
MMR	Reparación de bases mal apareadas
MRN	Complejo de reconocimiento de daño en la vía HR (MRE11-RAD50-NBS1)
MSH2/MSH6	Heterodímero de reconocimiento de las bases mal apareadas
MLH1/PMS2	Segundo heterodímero de reconocimiento de bases mal apareadas
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	Reparación de extremos no homólogos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
Radiación UV	Luz ultravioleta

RAD50	Proteína de reparación del DNA Rad50
RAD51	Proteína de reparación del DNA Rad51
RFLP	Polimorfismo de tamaño de fragmento de restricción
RNA Pol	Polimerasa de Ácido Ribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Mensajero de Ácido Ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPA	Proteína de Replicación A
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TCR	Reparación acoplada a la transcripción
TFIIH	Factor de transcripción II H
UTR	Región no codificante
XPA	Xeroderma pigmentoso grupo A
XPB	Xeroderma Pigmentoso grupo B
XPC	XerodermaPigmentoso grupo C
XPD	XerodermaPigmentoso grupo D
XPF	XerodermaPigmentoso grupo F

XPG	XerodermaPigmentoso grupo G
XRCC1	X-ray repair complementing 1
XRCC4	X-ray repair complementing 4

ABREVIATURAS DE MEDIDAS Y REACTIVOS

μl	micro litros
μM	micro Molar
ANE	Aminoácidos no esenciales
Anti-Anti	Antibiótico-antimicótico
dNTP's	Deoxiribonucleótidos
EtOH	Etanol
h	Horas
H₂O	Agua
kb	Kilo bases
kDA	Kilo Daltones
M	Molar
mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos/mililitros
ml	Mililitros
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
mM	mili Molar
MQ	Mili Q
ng	nano gramos
nm	nano metros
pb	Pares de bases
r.p.m.	Revoluciones por minuto

s	Segundos
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSC1x	Citrato de Sodio Salino
Taq Pol	Taq polimerasa
Tris-EDTA	Tris- Ácido Etilen Diamino-Tetra-Acético

INTRODUCCIÓN.

1. Daño al DNA.

El DNA se encuentra bajo constante daño debido a la exposición a productos del metabolismo normal de la célula y factores ambientales que pueden alterar su estructura química y modificar, por lo tanto, su secuencia de nucleótidos. Las alteraciones que afectan la estructura e integridad del DNA surgen espontáneamente a través de inestabilidad intrínseca de puentes químicos en el DNA (p. e. desaminaciones de bases) o inducidas por la interacción con diversos compuestos químicos y radiación (Brian y Vázquez, 2003; Misteli y Soutoglou, 2009).

Las lesiones generadas en el material genético se ven reflejadas de muy diversas formas en la estructura del DNA, las cuales incluyen: rompimientos de cadena doble o sencilla (inducidas por rayos X), enlaces inter o intracatenarios (causados por agentes químicos como el cisplatino), y modificaciones en las bases (desaminaciones) (Boer y Hoeijmakers, 2000).

Aproximadamente 10,000 diferentes tipos de lesiones son inducidas en el DNA en nuestras células cada día (Reed y Waters, 2005). A nivel celular, dichas alteraciones pueden interferir con mecanismos importantes, como la replicación, la transcripción y la recombinación, resultando en arresto del ciclo celular, muerte celular programada o inestabilidad genómica. A nivel de organismo, estas lesiones están relacionadas con el desarrollo de distintas enfermedades de origen

hereditario, carcinogénesis, y envejecimiento prematuro (Boer y Hoeijmakers, 2000; Maddukuri, *et al.* 2007).

La eliminación del daño al DNA requiere la acción dual y coordinada de los puntos de monitoreo del ciclo celular y las maquinarias de reparación del DNA en cada fase del ciclo celular (Branzei y Foiani, 2008; Lazzaro *et al.*, 2009; Luijsterburg *et al.*, 2011; Malumbres, 2011). Debido a esto, todos los organismos han desarrollado complejos mecanismos de reparación que remueven eficientemente cada tipo de lesión y que, en conjunto mantienen la integridad del genoma, siendo esta la primera línea de defensa contra el cáncer (Choi, 2006; Maddukuri, *et al.* 2007; Moore *et al.*, 2009).

1.1. Principales agentes involucrados en el daño al DNA.

Existen una gran variedad de agentes involucrados en el daño al DNA, dichos compuestos son clasificados como endógenos o exógenos de acuerdo a su origen. Los primeros, son resultado del metabolismo normal de las células, entre los cuales se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), errores durante la replicación del DNA o los procesos de recombinación durante la respuesta y diversificación del sistema inmune (Wyman y Kannar, 2006).

Por otro lado, los factores exógenos, se encuentran presentes en el medio ambiente en una forma relativamente inofensiva, y son absorbidos en los alimentos (p. e. nitrosaminas y aflatoxinas) o vía respiratoria (benzo[a]pirenos).

Estos compuestos son activados por el metabolismo celular, posiblemente en un intento de eliminarlos, y desafortunadamente son convertidos a especies altamente reactivas que tienen una fuerte tendencia a formar uniones covalentes con el DNA (Wogan et al., 2004).

La radiación (ultravioleta UV y ionizante) es otra de las fuentes exógenas involucradas en el daño al DNA. La radiación UV de onda corta (UVB 290-320nm y UVC <290nm) genera enlaces covalentes entre las pirimidinas adyacentes. Existen dos tipos de lesiones inducidas por la radiación UV: dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs por sus siglas en inglés) y foto-productos de pirimidina-pirimidona (PPs por sus siglas en inglés), los cuales difieren en el número y posición de los enlaces (Nospikel, 2009). Por otro lado, la radiación ionizante (gamma y rayos-X) generan rompimientos de cadena doble o sencilla en el DNA, así como modificaciones químicas en los nucleótidos, dicho proceso, debido a la producción de ROS o por el efecto directo de la radiación (Gamulin et al., 2008).

Finalmente, existen agentes químicos capaces de generar entrecruzamientos (cross-linking) con el DNA. Estos compuestos tienen la habilidad de formar dos tipos distintos de enlaces covalentes en el DNA: involucrando una (enlaces intracatenarios) o ambas cadenas (enlaces intercatenarios). Ejemplos clásicos de este tipo de agentes lo constituyen los compuestos platinados, principalmente cisplatino (del cual hablaremos con mas detenimiento en el siguiente apartado), las mostazas nitrogenadas y los psoralenos (Trimmer y Essigmann, 1999).

1.2. Cisplatino: Mecanismo de acción y aplicación.

El cis-diamino-dicloro-platino (CDDP), cisplatino, es uno de los agentes antineoplásicos más potentes conocidos actualmente. Su mecanismo de acción es mediado por su interacción con el DNA, formando aductos (principalmente intracatenarios) que interfieren con procesos celulares como la transcripción y la replicación del DNA. La alteración de estos mecanismos celulares desencadena diversas vías de transducción de señales, que involucran ATR, p53, p73 y MAPK, las cuales culminan en la activación de vías de muerte celular programada (Fuertes et al., 2003; Siddik, 2003).

El CDDP se administra vía intravenosa, la sangre lo transporta a través del cuerpo. La alta concentración de cloruro (≈ 100 mM) en el suero sanguíneo inhibe la sustitución de los grupos cloruro del CDDP por moléculas de agua, motivo por el cual, debe ingresar a las células. El mecanismo bioquímico por el cual ingresa a las células es la difusión pasiva (Judson y Kelland, 2000).

Dentro de la célula, las concentraciones de cloruro oscilan entre 2 y 30 mM, permitiendo la hidrólisis del CDDP, de modo que, uno o ambos grupos cloruro son sustituidos por moléculas de agua. El resultado de esta reacción es la formación de los cationes $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$ y $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$. Estas especies de CDDP son altamente reactivas y se unen con facilidad a los centros nucleofílicos de las biomoléculas, esto se debe a que el H_2O es un grupo mucho más intercambiable que el Cl^- (Jamieson y Lippard, 1999).

Una vez hidrolizado en el citoplasma, el CDDP puede unirse a diversos constituyentes celulares que presentan centros nucleofílicos blanco, tal es el caso del citoesqueleto, los microfilamentos, grupos tioles de proteínas, péptidos y RNA (Jordan y Carmo-Fonseca, 2000). Se estima que menos del 1% de las moléculas de CDDP que entran en la célula se unen a DNA, dado que la mayoría de ellas terminan uniéndose a proteínas y otros blancos celulares (**Figura 1**) (Perez, 1998).

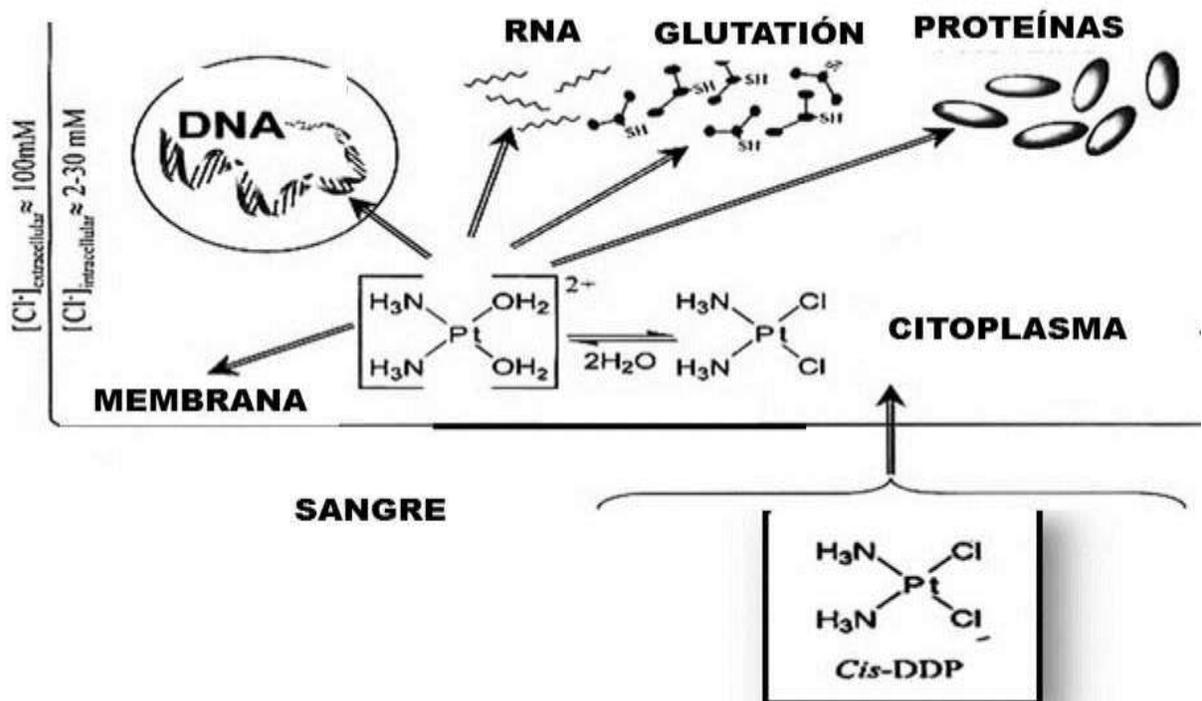


Figura 1. Mecanismo de acción del CDDP. El cisplatino entra a la célula mediante difusión pasiva, una vez en el citoplasma se hidroliza y puede unirse a diversos blancos como RNA, glutatión y proteínas, sin embargo, su mecanismo citotóxico es inducido a través de la unión al DNA. Imagen modificada de Fuertes *et al.*, 2003.

Aún al ser mínima la cantidad de moléculas de CDDP que se unen al DNA, tiene la capacidad de inducir la formación de aductos estructuralmente diferentes. Inicialmente se forman aductos monofuncionales, pero la mayoría de ellos siguen

reaccionando hasta producir enlaces cruzados inter o intracatenarios (Payet et al., 1993). Del 60 a 65% de los aductos formados por el CDDP son intracatenarios y solo 20 a 25% son intercatenarios. Un porcentaje más bajo corresponden a monoadductos (la unión de CDDP con una Guanina del DNA) y a las interacciones DNA-CDDP-proteína (**Figura 2**) (Fuentes et al., 2003).

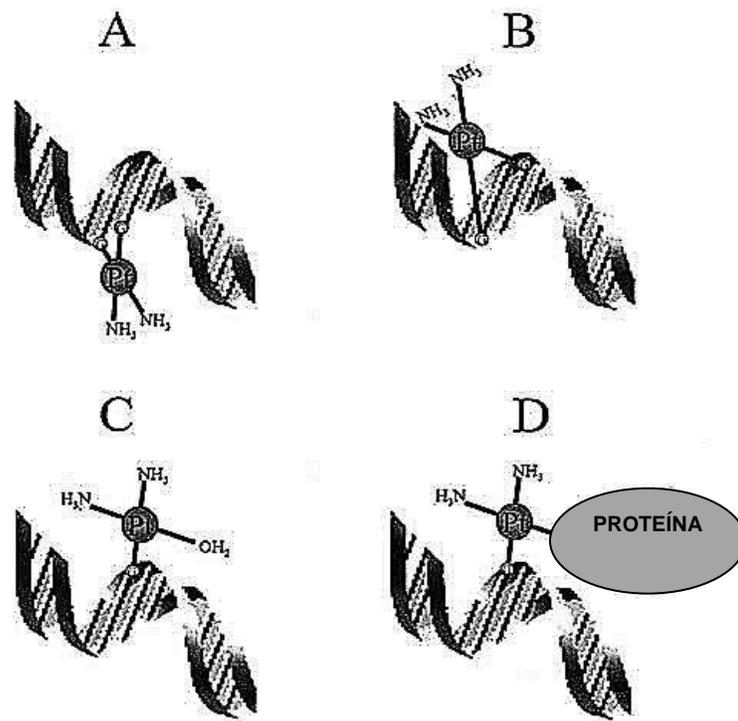


Figura 2. Principales aductos formados por la unión del CDDP al DNA. (A) aductos intracatenarios; (B) aductos intercatenarios; (C) aductos monofuncionales; y (D) aductos DNA-CDDP-proteína. Imagen modificada de Fuentes *et al.*, 2003.

Sin embargo, y a pesar de la eficacia del cisplatino en el tratamiento de diversos tumores (testículo, ovario, vejiga, cervix, cabeza y cuello y cáncer de pulmón de células no pequeñas), tiene dos problemas fundamentales: sus numerosos efectos

secundarios y la resistencia intrínseca o adquirida a la droga, lo cual limita su alto potencial antineoplásico (Wong y Giandomenico, 1999). La resistencia celular está asociada a una disminuida absorción del fármaco, a la inactivación por enzimas de metabolismo de xenobióticos o al incremento en los niveles de expresión de genes involucrados en la reparación del DNA (Rabik y Eileen, 2007).

En cáncer de ovario se demostró que pacientes resistentes a la terapia basada en platinos presentaban alta expresión de los genes XPA y ERCC1-XPF (Dabholkar et al., 1994); por otro lado, en cáncer de testículo, individuos que responden mejor a la terapia basada en platinos presentan bajos niveles de expresión de XPA y ERCC1-XPF, proporcionando evidencia sustentable de la importancia de la vía NER en la resistencia o sensibilidad a agentes platinados como el CDDP (Welsh et al., 2004).

2. Mecanismos de reparación del DNA.

Los mecanismos de reparación del DNA se desarrollaron temprano durante la evolución, son mecanismos muy diversos y específicos que reconocen cada tipo de lesión. Son la primera línea de defensa que tienen las células para contrarrestar el daño al DNA, mismo que podría comprometer la integridad del genoma (Hemmerich et al., 2011; Mathews et al., 2011). El siguiente cuadro muestra los distintos mecanismos de reparación del DNA y sus principales proteínas:

Sistemas de reparación	Principales proteínas involucradas
Reparación de extremos no homólogos (NHEJ)	KU70, KU80, DNA-PKc, XRCC4 y DNA ligasa IV
Reparación por recombinación homóloga (HRR)	BRCA1, BRCA2, RAD50, RAD51, MRE11, NBS1
Reparación de bases mal apareadas (MMR)	MutS α (MSH2/MSH6), MutS β (MSH2/MSH3), MutL α (MLH1/PMS2), MutL β (MLH1/MLH3), EXO1
Reparación por escisión de nucleótidos (NER)	XPC-RAD23B, TFIIH, XPB, XPD, XPA, ERCC1, RPA
Reparación por escisión de bases (BER)	AP-endonucleasa, DNA polimerasa- β , DNA ligasa III, XRCC1, PCNA, DNA ligasa I.

Cuadro 1. Mecanismos de reparación del DNA. A la izquierda se observa el sistema de reparación y a su derecha las principales proteínas involucradas en el mismo. Modificado de Mathews *et al.*, 2011.

2.1. Reparación por escisión de bases (BER).

El mecanismo de reparación por escisión de bases (BER por sus siglas en inglés) actúa previo a la fase G1 del ciclo celular, como un sistema pre-replicativo de reparación del DNA (Dianov, 2011). Reconoce y remueve lesiones inducidas por agentes alquilantes, ROS, metilación y desaminación espontánea de bases. Las ROS generan de 20-30 lesiones en el DNA, mientras que un agente alquilante produce alrededor de una docena de lesiones en el DNA (Kisby et. al., 2004; Sung y Demple, 2006).

La vía BER es iniciada por el reconocimiento y escisión de la base dañada por medio de una DNA glicosilasa, generando un sitio abásico, APE1 se encarga de removerlo dando como resultado la generación de un azúcar con un extremo con un fosfato 5' libre. La Pol β lo elimina y adiciona un nucleótido en el espacio formado. Finalmente, el complejo XRCC1-Ligasa III sella los extremos restantes del DNA. Esta vía es comúnmente conocida como la Vía corta. Sin embargo, si el azúcar fosfato 5' es resistente al corte por la Pol β , entonces actúan las Pol δ/ϵ que adicionan de 2-8 nucleótidos, generando una estructura que es removida por FEN-1 en una manera dependiente de PCNA. Finalmente, la Ligasa I sella los extremos restantes del DNA. Esta vía es conocida como la Vía larga como se observa en la **Figura 3** (Sung y Demple, 2006).

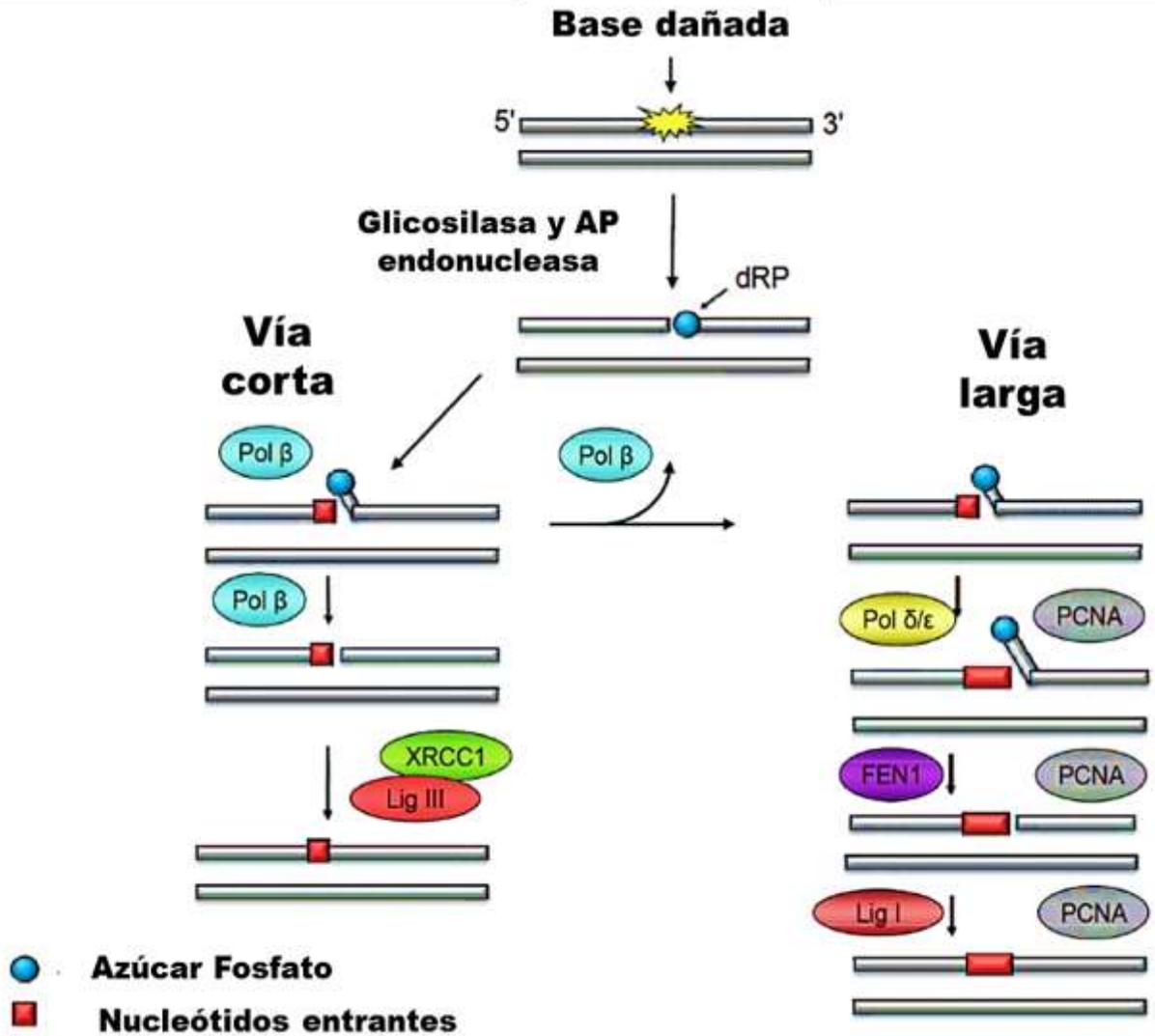


Figura 3. Sistema de reparación por escisión de bases (BER). Vía corta (izquierda) y Vía larga (derecha). Imagen modificada de: Sung y Demple, 2006. dRP→5'-deoxiribosa 5-fosfato.

2.2. Reparación de bases mal apareadas (Mismatch Repair).

La reparación de bases mal apareadas (MMR por sus siglas en inglés) es un mecanismo de reparación post-replicativo involucrado en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La MMR es responsable de corregir inserciones/deleciones, incluyendo las que ocurren en microsátelites del DNA de bases mal apareadas, que surgen principalmente por errores durante la replicación del DNA. Los mecanismos fundamentales y las proteínas involucradas en las primeras reacciones de la vía están altamente conservados en todos los organismos, desde bacterias hasta humanos (Velangi et al., 2004; Fukui, 2010).

La vía MMR está dividida en cinco etapas: reconocimiento de las bases mal apareadas por el heterodímero hMSH2 y hMSH6, unión del heterodímero: hMLH1 y hPMS2 que permite el reconocimiento de la cadena modificada para iniciar la escisión, progreso y terminación de la escisión por medio de EXO1, finalmente la re-síntesis y ligación del DNA (Stojic et al., 2004; Hays et al., 2005).

2.3. Reparación por recombinación homóloga (HRR) y reparación de extremos no homólogos (NHEJ).

Los rompimientos de doble cadena (DBS por sus siglas en inglés) son la forma más peligrosa de daño al DNA, principalmente porque afectan ambas cadenas del DNA. Los DBS pueden ser inducidos por diversos factores como la radiación ionizante, incluyendo la radiación gamma y rayos-X; fármacos utilizados en la quimioterapia como la bleomicina, mitoxantrona y etopósido, así mismo por re-

arreglos genómicos programados (durante la diversificación del sistema inmune) (Norbury y Hickson, 2001; Sinha y Peterson, 2009).

Existen dos vías principales involucradas en la reparación de DSB (**Figura 4**): la recombinación homóloga (HR por sus siglas en inglés) y la reparación de extremos no homólogos (NHEJ por sus siglas en inglés) (Less-Miller y Meek, 2003; Li y Heyer, 2008).

La reparación por HR está restringida a las fases S y G2 del ciclo celular, dado que se requiere la cromátida hermana homóloga o el cromosoma homólogo para llevar a cabo la reparación, resultando en la restauración del material genético perdido con una tasa de error mínima (Li y Heyer, 2008).

La vía involucra los siguientes pasos: reconocimiento de la lesión por el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), el cual es reclutado para generar una resección en la cadena simple del DNA, permitiendo así tomar la cadena homóloga como molde. Los extremos de cada cadena son unidos por RPA, mientras RAD51 y RAD52 invaden el templado homólogo permitiendo la síntesis de un oligómero de DNA, finalmente es copiada y restaurada la información genética perdida (Misteli y Evi, 2009).

Por otro lado, la vía NHEJ no está restringida a ninguna fase del ciclo celular, aunque actúa preferentemente en las fases G1/S. Es un sistema más proclive a error, debido a que, no utiliza ningún templado para la unión de los extremos fragmentados del DNA (Less-Miller y Meek, 2003; Kurosawa y Adachi, 2010).

En el sistema de reparación NHEJ la lesión es reconocida por el heterodímero Ku80-Ku70, reclutando y activando la actividad cinasa de la subunidad catalítica de DNA-PK (DNA-PKcs). Posteriormente, son reclutadas la ligasa IV XRCC4, XFL y Artemisa, ejecutando el proceso de unión y ligación de los extremos afectados (Misteli y Soutoglou, 2009).

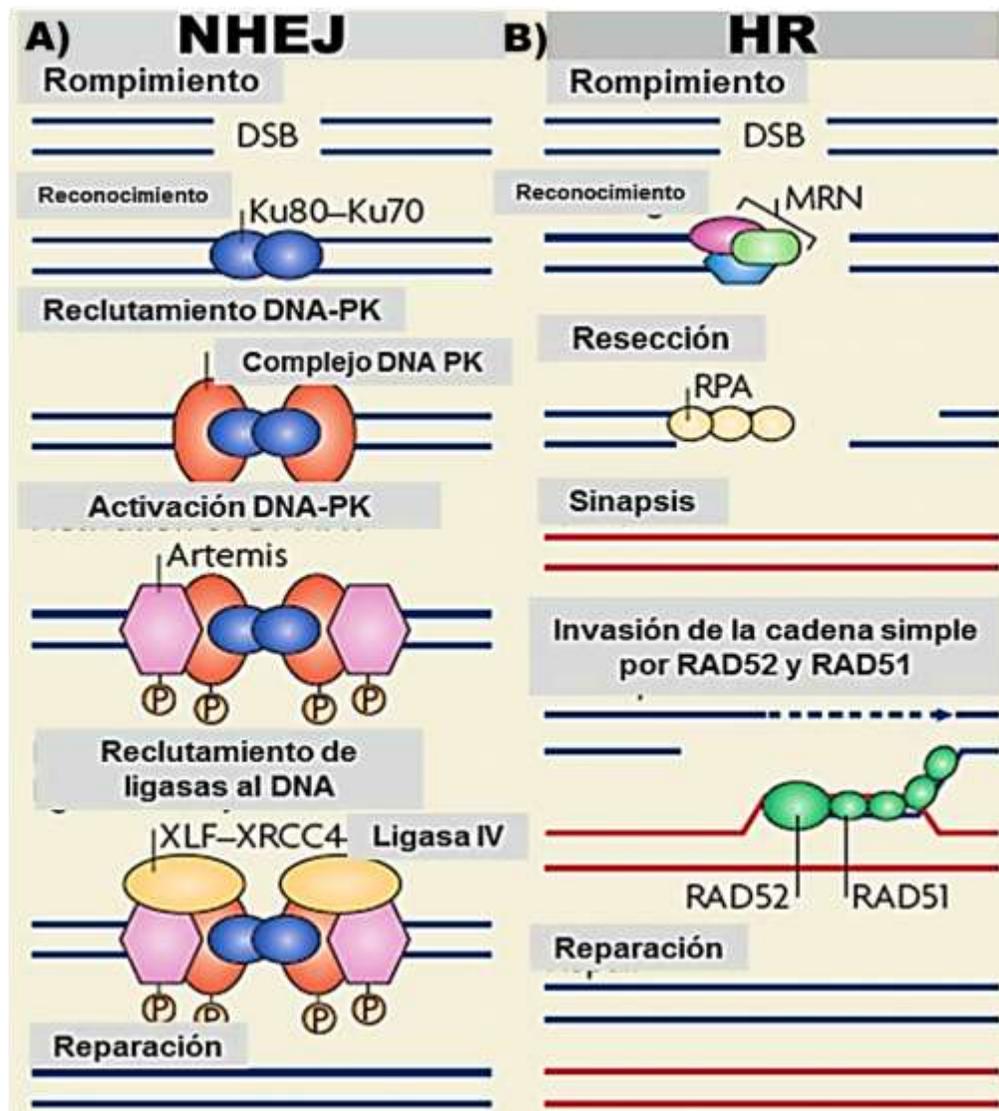


Figura 4. Esquema de las dos vías de reparación involucradas en el reconocimiento de DSB. **A)** Sistema de reparación NHEJ, el cual simplemente une y sella los extremos afectados. **B)** Vía HR, toma como molde la cadena homóloga, resintetiza y liga el DNA. Imagen modificada de: Misteli y Soutoglou, 2009.

2.4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER).

La vía NER es un sistema de reparación altamente conservado en la naturaleza, tiene sistemas análogos en *Escherichia coli*, levaduras y en células de mamíferos (Dabholkar *et al.*, 1994).

A través de la vía participan una gran variedad de proteínas que reconocen específicamente cada tipo de lesión. Dos prerequisites son necesarios para que la vía sea activada: la distorsión en la estructura de la doble hélice y la modificación química en el DNA (Nospikel, 2009). La mayoría de las modificaciones generadas en la estructura del material genético son causadas por agentes químicos que se unen covalentemente al DNA, dicha unión da como resultado la formación de estructuras altamente estables denominadas aductos (Wogan *et al.*, 2004).

La vía NER también está involucrada en la detección de daño inducido por radiación ultravioleta (UV), cuyos principales productos son los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD's por sus siglas en inglés) (Leibeling, 2006; Reed, 2011), y aunque participa de forma más indirecta, repara lesiones inducidas por daño oxidante que modifica la estructura del DNA (Mathews *et al.*, 2011).

Este sistema de reparación consiste de dos subvías diferentes. La primera es la reparación del DNA acoplada a la transcripción (TCR por sus siglas en inglés), la cual se asegura de que la cadena en transcripción sea reparada de forma prioritaria al resto del genoma. La otra vía la constituye la reparación global del

genoma (GGR), dicha vía actúa sobre zonas no codificantes del genoma y en cadenas no transcritas de genes activos (Noussipikel, 2009; Friedberg, 2011).

2.5. Reparación acoplada a la transcripción (TCR).

La reparación acoplada a la transcripción reconoce lesiones que bloquean la transcripción en cadenas transcritas del DNA de genes activos. En esta vía, la RNA polimerasa II es considerada el sensor del daño, cuando detecta la lesión, los factores CSA y CSB están implicados en la activación de la cascada de reparación del DNA, la cual es común en ambas subvías (Friedberg, 2001).

El factor de transcripción TFIIH, que contiene dos helicasas, XPB y XPD, genera una burbuja de desnaturalización en el DNA, esta apertura es estabilizada por RPA y XPA que se encarga de reconocer solo la cadena dañada. La cadena que contiene el daño es escindida por medio de las endonucleasa XPG y XPF/ERCC1, las cuales cortan en dirección 3' y 5' respectivamente. Finalmente, se da la re-síntesis y ligación del DNA (**Figura 5**) (Furuta et al., 2002).

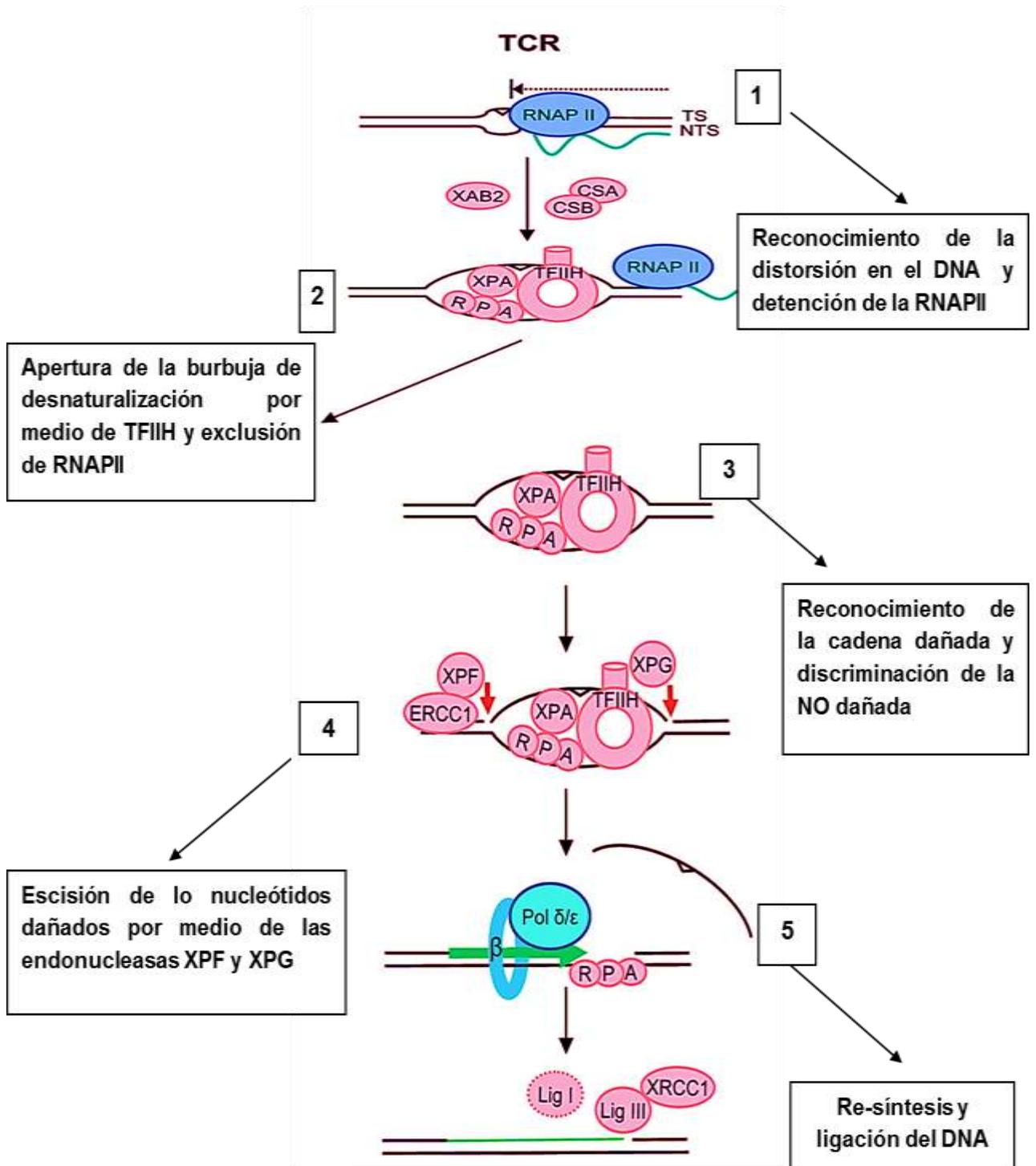


Figura 5. Representación de la vía de reparación acoplada a la transcripción. Imagen modificada de: Nouspikel, 2009.

2.6. Reparación global del genoma (GGR).

La primera fase involucra el reconocimiento del daño. Esta acción es llevada a cabo por un complejo de proteínas de unión al DNA dañado, el cual incluye a XPC, hHR23B y Centrina 2. En la siguiente fase se genera la separación del DNA por medio del complejo TFIIH. Este factor de transcripción está formado por las subunidades helicasas XPD y XPB, encargadas de la apertura de una burbuja de desnaturalización. La siguiente fase involucra el reconocimiento de la cadena dañada y la discriminación de la cadena no dañada, lo cual involucra al complejo XPA-RPA (Choi, 2006). Posteriormente, se realiza la exclusión del fragmento de nucleótidos de la cadena simple dañados, esto se realiza por medio de las endonucleasas ERCC1-XPF y XPG. Finalmente, se lleva a cabo la re-síntesis del DNA por medio de las polimerasas delta y épsilon, para su posterior ligación por la DNA ligasa III (Figura 6).

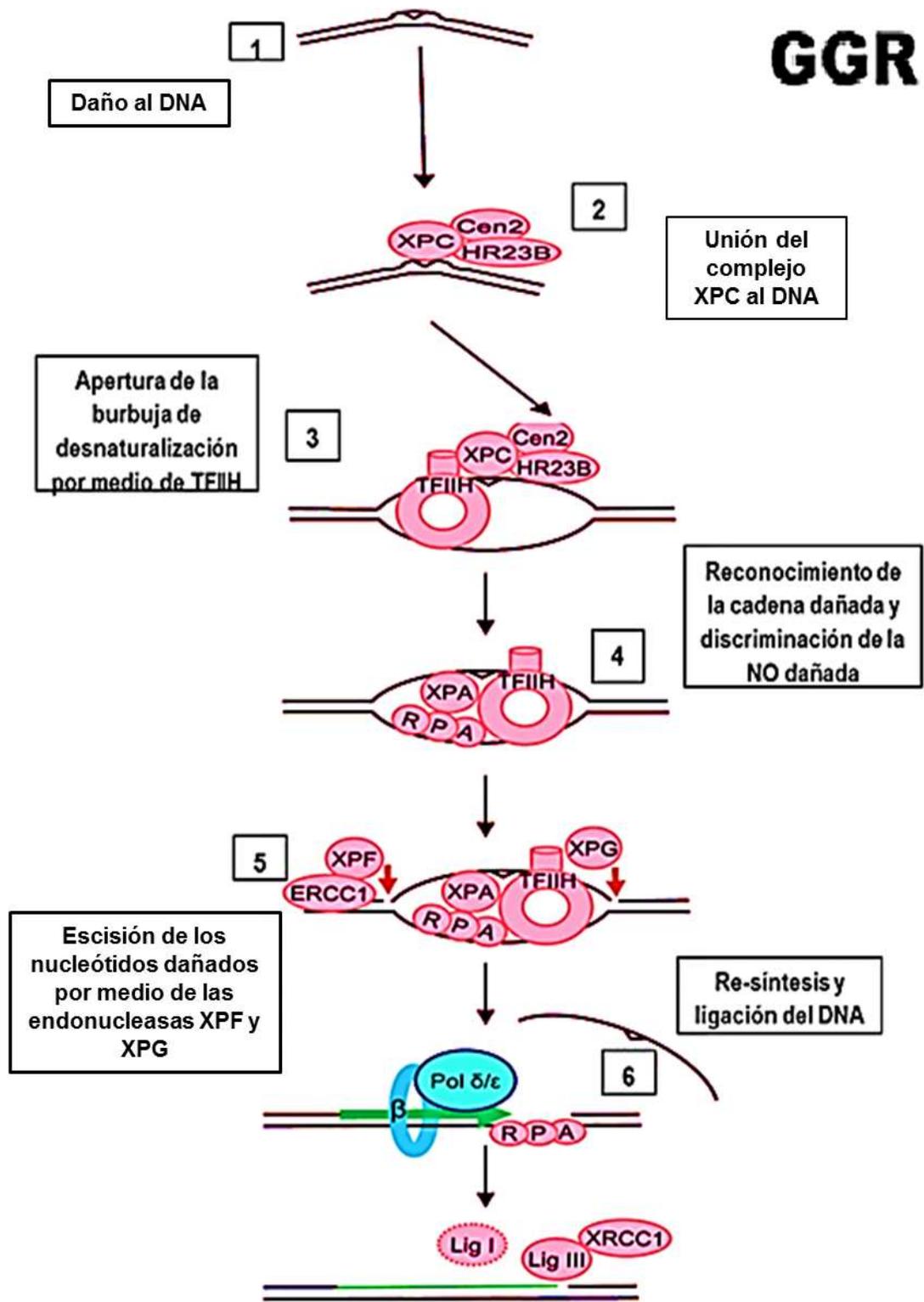


Figura 6. Representación de la vía de reparación por escisión global del genoma. Imagen modificada de: Nouspikel, 2009.

El mecanismo de reparación NER es de suma importancia médica, ya que mutaciones en genes involucrados en esta vía están asociadas con el desarrollo de diversos síndromes, uno de los más importantes lo constituye *Xeroderma Pigmentosum* (XP), una enfermedad cutánea de origen genético, con patrón de herencia autosómico recesivo. Pacientes con XP tienen una marcada hipersensibilidad a la radiación UV y en promedio 1000 veces mayor riesgo a desarrollar cáncer de piel, especialmente en regiones expuestas a radiación, como son manos, cara y cuello (Gillet Y Schärer, 2006; Kraemer et al., 2007).

3. *Xeroderma Pigmentosum* grupo A (XPA). Localización y función en la vía NER.

Gen XPA.

El gen de XPA está localizado en la banda 22.33 del brazo largo del cromosoma 9 (9q22.3), cuenta con seis exones y se extiende aproximadamente por 23 kb (Figura 7) (Layher y Cleaver, 1997).

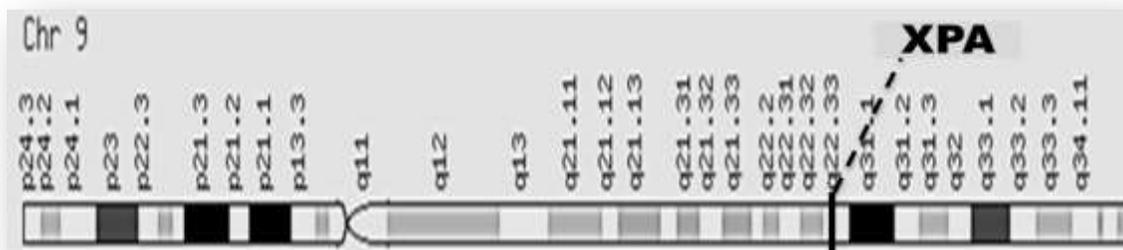


Figura 7. Localización del gen XPA en la banda 22.33 del brazo largo del cromosoma 9 (9q22.3). Modificado de Gene database del Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI).

Proteína XPA.

XPA es una proteína de 38-42 kDa que funciona como monómero y participa en amplias redes de interacciones proteína-proteína (Eker et al., 1992). La localización de XPA es nuclear, sin embargo, su importación hacia el núcleo no es esencial para su función (Miyamoto et al., 1992).

XPA es una de las proteínas más importantes de la vía NER, dado que forma parte del complejo de preincisión, tanto en la reparación global del genoma, como en la reparación acoplada a la transcripción. Reconoce y verifica el sitio de la lesión y posiciona de forma adecuada a otros factores involucrados en la vía (Cummings et al., 2006). XPA interactúa de manera directa con el DNA y otros factores de la vía incluyendo RPA, TFIIH y ERCC1 (Figura 8) (Köberle et al., 2006).

En ausencia de XPA, el complejo de preincisión no se forma y la vía NER no es llevada a cabo (Evans et al., 1997). En consecuencia, células deficientes en XPA son hipersensibles al daño causado por radiación UV y diversos agentes químicos (Satokata et al., 1993).

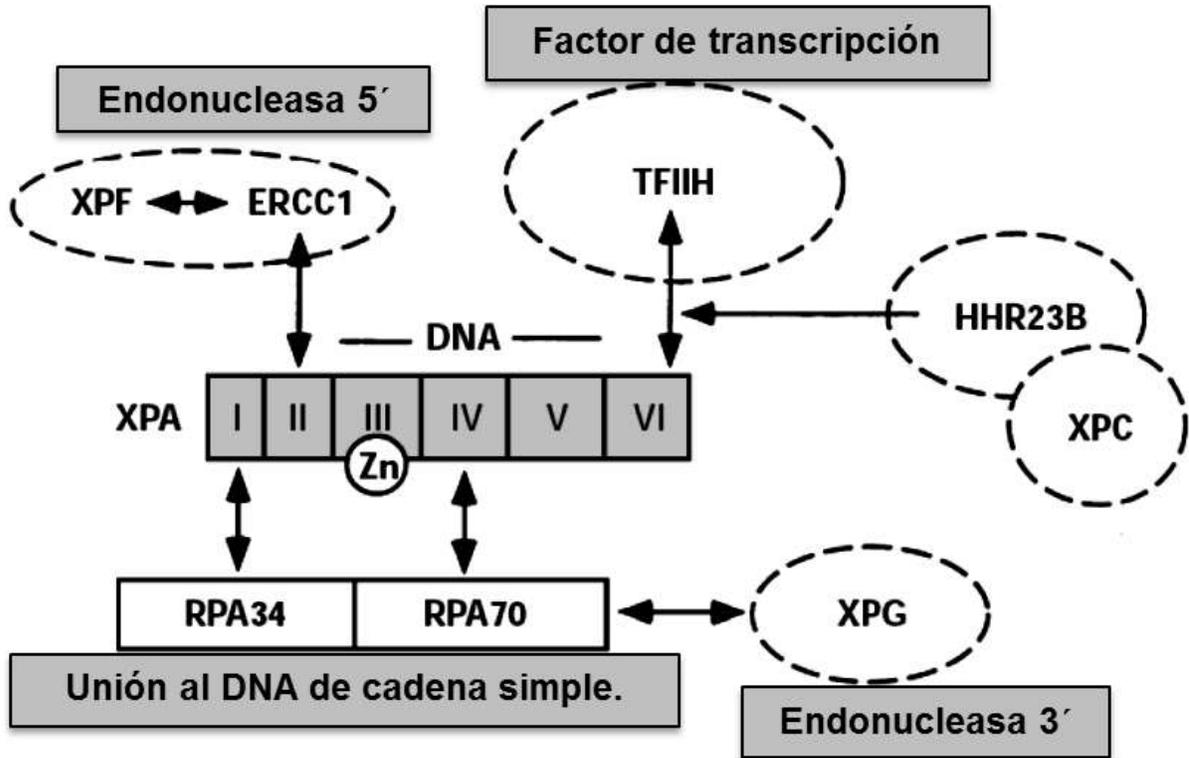


Figura 8. Representación de las interacciones proteína-proteína dentro de la vía NER, enfatizando en el papel central del heterodímero XPA-RPA para la unión al DNA. Imagen modificada de: Cleaver y States, 1997.

A continuación se muestra un cuadro de las características generales del gen XPA, así como las principales diferencias encontradas entre humanos y ratones.

Propiedad	Humanos	Ratones
Tamaño genómico	25kb	21kb
Número de exones	6	6
Localización cromosómica	9q34.1	4C2
Localización del promotor	- 156 nucleótidos río arriba	-313 nucleótidos río arriba
RNA mensajero	1.3-1.4 kb	1.0-1.1 kb
Fragmento de lectura abierto	273 aminoácidos	303 aminoácidos
Peso molecular	40-42 kDa.	-----
Solubilidad	Hidrofílico	Hidrofóbico
Motivos	Dedos de Zinc, Glu 7	Dedos de Zinc

Cuadro 2. Características generales del gen y la proteína XPA. Modificado de: Cleaver y States, 1997.

En 1999 Koberle y cols. demostraron que tumores de testículo de células germinales presentaban bajos niveles de la proteína XPA, lo cual podría explicar la disminuida capacidad de la vía NER para remover aductos inducidos por cisplatino (CDDP), razón por la cual se manifiesta una alta sensibilidad a CDDP en tumores de testículo.

Estos resultados hacen pensar que la presencia de la proteína XPA es de suma importancia en la reparación de aductos generados por CDDP y por lo tanto, es prioritario investigar que factores se encuentran influenciando dicho acontecimiento (Koberle et al., 1999).

4. Polimorfismos como fuente de variación en el genoma.

La variación genética es un evento común en el genoma humano, aproximadamente 1 de cada 1000 pares de bases difieren entre dos individuos. La mayor parte de estas variaciones la constituyen los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés), representando más del 90% de la variación genética (Bosch et al, 2006).

Como su nombre lo dice los SNPs son cambios generados en un solo nucleótido de la cadena del DNA y que se mantienen estables en al menos 1% de la población (Ekhart et al., 2009). Por otro lado, las inserciones, deleciones, repetidos en tándem y microsátelites ocupan solo el 10% de la variación genómica (Marsh et al., 2007).

Los SNPs, en contraste con marcadores más mutables, tales como los microsátelites, tienen una baja tasa de mutación recurrente, haciéndolos indicadores estables de la historia humana (Sachidanandam et. al. 2001). Los SNPs representan un tipo de variación genética de suma importancia. Por tal motivo, polimorfismos dentro y fuera de secuencias codificantes están bajo intensa investigación por su posible asociación con el desarrollo de diversas enfermedades (Wang, et al., 1998; Cargill et al., 1999; Halushka et al., 1999).

4.1. Polimorfismo 5'UTR de XPA. Localización y posible implicación biológica.

En el 2000 Butkiewicz y cols. identificaron mediante PCR y secuenciación, SNP en la región 5' no codificante del gen XPA un polimorfismo consistente en la transición de una Adenina a Guanina (A→G) cuatro nucleótidos río arriba (-4) del codón de inicio ATG (Butkiewicz et al., 2000). Dichos autores argumentan que la localización de este polimorfismo en una región evolutivamente conservada podría tener alguna implicación funcional.

La función específica de este polimorfismo es desconocida, sin embargo, se piensa que al estar cercano al codón de inicio de la traducción, pudiera afectar la correcta producción de mensajero, y consecuentemente de la proteína. Se sabe que los nucleótidos cercanos al codón de inicio son muy importantes para que se lleve a cabo la traducción, dado que, la subunidad ribosomal 40s se une inicialmente al extremo 5' del RNAm permitiendo la unión de factores de traducción. Es posible que la sustitución A→G del polimorfismo este modificando la unión de la subunidad ribosomal 40s (Park et al., 2002; Kiyohara y Yoshimasu, 2007; Ding et al., 2011).

En el estudio realizado por Vogel y cols. en el 2005, observaron que la presencia de al menos un alelo A del polimorfismo 5'UTR de XPA se asoció con un mayor riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en una población danesa, aunque dichos resultados nos arrojaron diferencias estadísticamente significativas.

En el año 2009 Feng y cols. demostraron que la presencia de al menos un alelo polimórfico (G) del polimorfismo 5'UTR A→G de XPA se asoció con una mejor respuesta al tratamiento basado en platinos en pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Ese mismo año, Pan y cols. observaron que individuos con genotipo heterócigo (AG) del polimorfismo 5'UTR de XPA incrementaban 2.1 veces el riesgo a desarrollar cáncer de esófago, riesgo que incremento hasta 3.1 veces con la presencia del genotipo homócigo polimórfico (GG).

Por otro lado, Ding y cols. en el 2011, observaron que individuos con al menos un alelo A del polimorfismo 5'UTR de XPA poseen mayor riesgo a desarrollar cáncer del pulmón, especialmente en poblaciones asiáticas. Finalmente, este año, Zou y cols. realizaron un meta-análisis con el cual demostraron que la presencia de al menos un alelo polimórfico incrementa el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en individuos no caucásicos; encontrando datos opuestos en caucásicos.

JUSTIFICACIÓN

Existen una gran variedad de trabajos relacionados al papel del polimorfismo 5'UTR A→G (-4) de XPA con el riesgo a desarrollar cáncer, o con la respuesta a la terapia basada en platinos, sin embargo, gran parte de estos resultados son contradictorios. Por tal motivo, es preponderante conocer el efecto que podría desempeñar dicho polimorfismo en un estudio *in vitro*, mismo que permitiría evaluar los resultados sin el problema del fondo genético observados células cancerosas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuál es el efecto celular del SNP 5'UTR A→G (-4) de XPA en linfocitos expuestos a CDDP?

HIPÓTESIS.

Células con genotipo homocigo silvestre (AA) tendrán mayor capacidad de reparación del DNA y, por lo tanto, mayor viabilidad en comparación con las células portadoras del genotipo homocigo polimórfico (GG).

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la asociación entre la presencia del polimorfismo 5'UTR A→G de XPA con la sensibilidad al tratamiento con cisplatino en linfocitos humanos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar el genotipo del polimorfismo 5'UTR A→G de XPA en individuos sanos para aislamiento y cultivo de linfocitos.
- Determinar la LC50 en linfocitos tratados con CDDP.
- Determinar la viabilidad celular en función del genotipo en linfocitos tratados con la dosis LC50 de CDDP de cada genotipo.
- Evaluación del daño al DNA mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN por sus siglas en inglés).

METODOLOGÍA.

Obtención de muestras de sangre periférica de población mexicana aparentemente sana.

En primera instancia, los individuos incluidos para nuestra población de estudio estuvieron en un rango de edad de 18 a 35 años, principalmente varones, evitando de esta forma, resultados inespecíficos generados por la edad y sexo. Se sabe que la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica, incrementa con la edad, y este incremento es mayor en mujeres (Fenech, 2007).

Se obtuvieron un total de 87 muestras por donación voluntaria. A donadores se les realizaron encuestas sobre a su estado de salud, estilo de vida y lugar de residencia y se confirmó que no fueran fumadores ni bebedores crónicos. Finalmente se corroboró que los donantes no estuvieran relacionados familiarmente y se ratificó que fueran de nacionalidad mexicana en un mínimo de tres generaciones (padres y abuelos).

Aislamiento de DNA genómico por medio de fenol/cloroformo/isoamílico.

Se obtuvieron 5 ml de sangre periférica (por venopunción de la región cubital del brazo) en tubos Vacutainer™ (Becton Dickinson, USA) adicionados con EDTA. Posteriormente se trasladó dicho volumen a tubos Falcon™ de polipropileno de 15 ml y fueron almacenados a -70°C durante 24 h. Una vez cumplido el tiempo, las

muestras se colocaron en baño maría a 37°C durante 15 min para descongelar la sangre y se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Cada tubo fue llevado a un volumen de 13 ml con buffer de lisis SSC 1X (lisis de glóbulos rojos), se resuspendió por inmersión y se realizó una centrifugación a 3500 xg por 5 min (Labofuge 400, Heraeus Instruments). Una vez terminada la centrifugación se retiró el sobrenadante y se desechó en un vaso de precipitados con cloro para inactivar la sangre, se colocó la misma cantidad de buffer SSC 1X resuspendiendo perfectamente y se realizó otra centrifugación. Este paso se realizó cuantas veces fuera necesario hasta observar que la coloración rojiza en el tubo disminuía lo más posible. En el último paso de centrifugación se retiró el sobrenadante y a la pastilla restante se le adicionó 500 µl de acetato de sodio 0.2 M y se mezcló perfectamente. Finalmente se agregaron 1.4 ml de acetato de sodio, 125 µl de SDS al 10% y 30 µl de proteinasa k (20 mg/ml en agua) y se mezcló ligeramente y se dejó incubando durante 24 h en un baño maría a 55°C.

Transcurridas las 24 h, se agregaron 600 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico a una proporción 25/24/1 respectivamente, y se mezcló durante 10 min en el rotador (ORBITRON ROTATOR I™. Modelo 260200. BOEKEL INDUSTRIES, INC). Paso seguido se realizó una centrifugación a 3500 xg durante 5 min. Terminado el tiempo se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se le añadieron 600 µl de cloroformo y se centrifugó a 3500 xg por 5 min. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y se le agregaron dos y medio volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) para precipitar y recuperar el DNA, trasladando el material a un tubo eppendorf™ de 1.5 ml. Se le adicionó 1 ml EtOH al 70% frío, se mezcló perfectamente para

lavar de sales y se centrifugó a 12000 r.p.m. por 2 min. Se extrajo por completo el EtOH y se dejó secando a temperatura ambiente en un lugar sin flujo de aire. Finalmente se resuspendió el DNA en una solución de Tris-EDTA (10 M/0.1 M, respectivamente) y se dejó incubando a 55°C durante 24 h.

Cuantificación de cantidad y pureza del DNA.

Una vez terminado el proceso de extracción de DNA se procedió a cuantificar la muestra en un espectrofotómetro (ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA). La pureza fue evaluada mediante la relación de lectura 260/280 nm, a 260 nm son leídas las bases del DNA y a 280 nm, las proteínas. La proporción 260/280 se utiliza para determinar la pureza de la extracción, permite evaluar el contenido relativo DNA/proteínas, la proporción óptima debe ser 1.8, una proporción menor indica contaminación con proteínas (Figura 9).

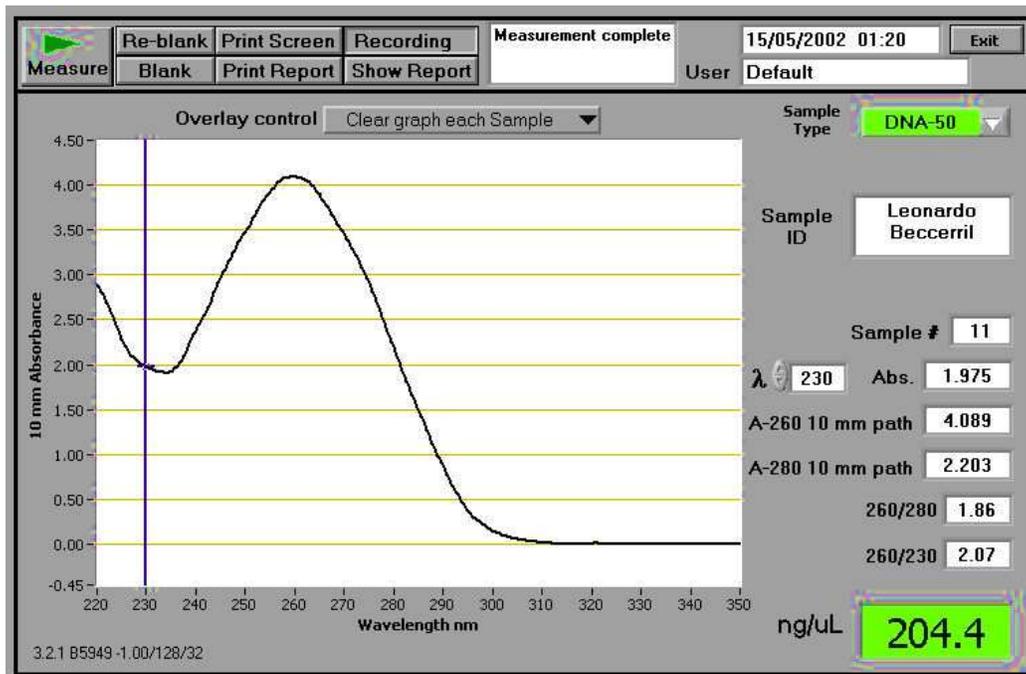


Figura 9. Ejemplo del programa utilizado para la cuantificación del DNA extraído a partir de sangre periférica.

Amplificación del fragmento de interés mediante PCR.

Una vez obtenido el DNA genómico, se realizó una PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Sentido → 5'-CTA GGT CCT CGG AGT GGT CC-3'

Antisentido → 5'-GCC CAA ACC TCC AGT AGC C-3'

Se utilizaron aproximadamente 100 ng de DNA para la PCR, utilizando la siguiente concentración y volumen de reactivos que fueron colocados en el termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems):

Reactivo	Volumen (µl) por reacción
Buffer 10X (Invitrogen)	1
dNTP's (0.8 mM)	0.2
MgCl ₂ (2mM)	0.3
Sentido (0.5 mM)	0.2
Antisentido (0.5 mM)	0.2
Platinum Taq Polimerasa (Invitrogen)	0.1
Templado	1
H ₂ O MQ estéril	7
Volumen final	10

Cuadro 3. Reactivos y concentraciones utilizados en la PCR.

Para la amplificación del fragmento de interés de 204 pb el cual contiene el sitio polimórfico A→G las condiciones fueron las siguientes:

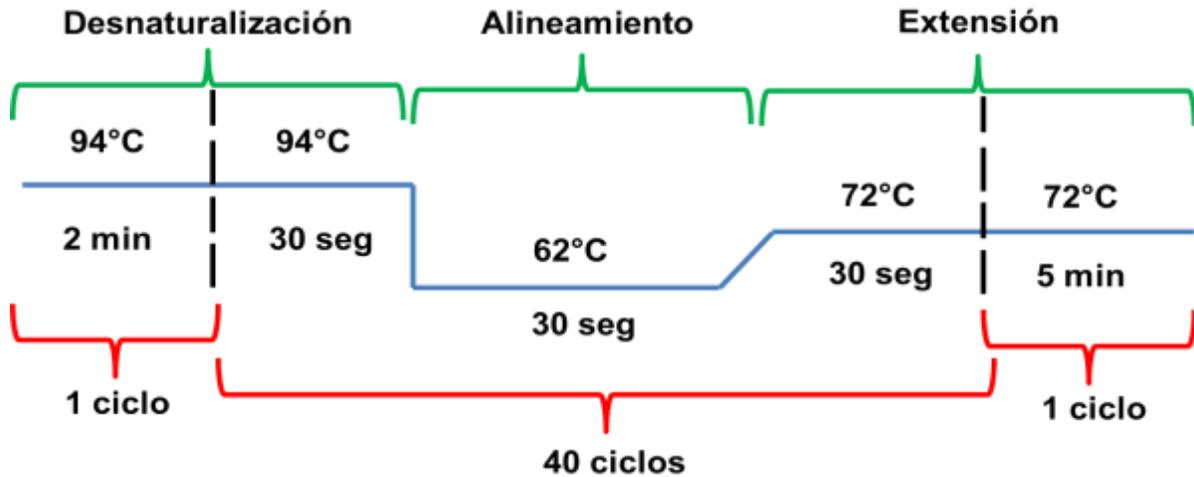


Figura 10. Programa de PCR.

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% para verificar la presencia del fragmento esperado.

Genotipificación del polimorfismo en la región 5'UTR A→G de XPA mediante análisis de polimorfismo del tamaño de fragmento por enzima de restricción (RFLP)

Posteriormente, se llevó a cabo la genotipificación de nuestro polimorfismo, esto se realizó digiriendo el producto de PCR con la enzima de restricción *BspEI* (New England Biolabs, Beverly, MA), tomando en cuenta que la transición A→G en la región 5'UTR crea un sitio de restricción (TCC**G**GA) específico para esta enzima en particular.

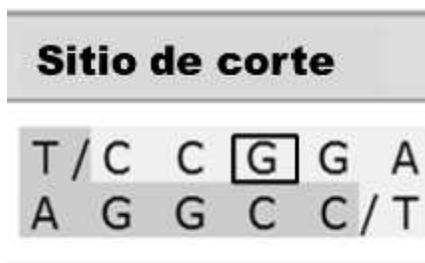


Figura 11. Sitio de reconocimiento de la enzima BspEI. Dentro del cuadro se observa la Guanina que sustituye a la Adenina cuando esta presente el polimorfismo, generando de esta forma el sitio de restricción para la enzima BspEI.

Las condiciones de digestión se muestran en el cuadro 4.

Reactivo	Volumen (µl) por reacción
Producto de PCR	3
Enzima <i>BsPEI</i>	0.2
Buffer de la enzima	1
H ₂ O MQ estéril	5.8
Volumen final	10

Cuadro 4. Condiciones de digestión del polimorfismo 5'UTR de XPA.

La digestión se realizó a 37°C durante 16 h y todo el producto obtenido se corrió en un gel de agarosa al 3%.

Individuos que presentan el genotipo homocigoto polimórfico (GG) producen dos fragmentos de 185 y 19 pb, dado que se presenta el sitio de restricción para la enzima *BspEI*; en muestras de individuos que presentan el genotipo heterocigoto (AG) se generan tres fragmentos de 204, 185 y 19 pb, por último, en el genotipo

homólogo silvestre se produce solamente un fragmento de 204 pb, ya que no existe ningún sitio de restricción.

Aislamiento y cultivo de linfocitos aislados a partir de sangre periférica.

Se obtuvieron 5-6 tubos (20-25 ml) de sangre periférica (por venopunción de la región cubital del brazo) en tubos Vacutainer™ (Becton Dickinson, USA) adicionados con heparina como anticoagulante.

En un tubo cónico de 50 ml se colocó un volumen de 20 ml de Ficoll™, solución que permite separar todos los componentes de la muestra por densidad. Posteriormente se adicionó la misma cantidad de sangre. NOTA: Este paso debe realizarse lenta y cuidadosamente para evitar perder las dos fases, por tal motivo, la sangre se deslizó apoyándose de una pared del tubo y dejándola caer lentamente.

Después se realizó una centrifugación a 1600 rpm durante 30 min con una aceleración de 5 y freno 0. Una vez terminada la centrifugación se extrajo la capa linfocitaria a un tubo de polietileno de 15 ml. La distribución por densidad fue:

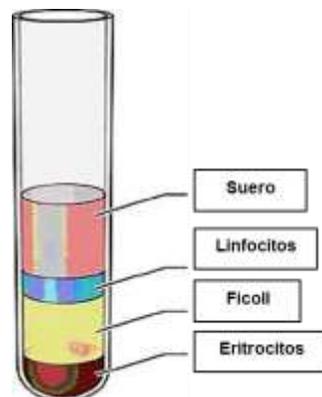


Figura 12. Distribución de los componentes sanguíneos por densidad.

Al tubo con linfocitos se le adicionaron 10 ml de PBS 1X y se mezcló por inversión para lavar de residuos de Ficoll. Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm durante 8 min (se realizaron al menos 2 lavados con sus respectivas centrifugaciones).

Posteriormente se retiró el PBS 1X utilizando una bomba de vacío. A las células se les añadió un volumen arbitrario de medio RPMI suplementado con L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales (ANE), 1% de antibiótico-antimicótico (anti-anti) y 10% de suero bovino fetal (SBF). Finalmente, el botón de células se resuspendió en el medio, se contó utilizando una cámara de Neubauer y se cultivó en una caja de 75 cm² con 30 ml de medio RPMI suplementado. A dicho cultivo se le adicionaron 600 µl de fitohemaglutinina para favorecer el crecimiento de linfocitos T. El cultivo se dejó en proliferación durante 48 h antes de colocar algún tratamiento.

Determinación de la concentración letal citotóxica 50 (LC50).

Para determinar la LC50 se aplicó la fórmula de la pendiente de la recta ($m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$). Se utilizaron cultivos de linfocitos de individuos de cada genotipo.

Los linfocitos fueron extraídos como se mencionó anteriormente, y se realizaron cultivos con 2,000,000 de células en 10 ml de medio RPMI suplementado con +L-glutamina, 1% ANE, 1% anti-anti 10% de SBF y 0.1% de fitohemaglutinina. El conteo de células se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se realizó una dilución 1:3 para el conteo en la cámara de Neubauer: se tomaron 20ul de muestra de nuestra preparación concentrada de células y se le adicionaron 40ul de azul tripano. Sólo se contaron los cuatro cuadrantes principales y se llevó a cabo el cálculo de la siguiente manera: N° total de células/4 X factor de dilución (3) X 10,000 X N° de ml en los cuales se resuspendió. El resultado es nuestro N° total de células.

Los cultivos se mantuvieron en proliferación durante 48 h y posteriormente se inició el tratamiento. Las concentraciones de CDDP utilizadas para determinar la LC50 fueron las siguientes: 8 μ M, 16 μ M, 32 μ M, 64 μ M y 94 μ M. La exposición a CDDP comenzó después de que los cultivos cumplieron dos ciclos de división celular, es decir 48 h de proliferación. El tratamiento duró 24 h, permitiendo de esta manera que el CDDP actuará durante un ciclo de división celular. Cumplido el período de exposición el cultivo contaba ya con 72 h de proliferación, tiempo suficiente para evitar falsos resultados por el envejecimiento natural de las células. Los conteos de viabilidad celular se llevaron a cabo mediante la técnica de azul tripano a un dilución 1:3. Para tener la relación vivas-muertas se hizo el conteo de ambos tipos de células (absorción del colorante por parte de las células muertas y no absorción por parte de las vivas).

Evaluación de la viabilidad en función del genotipo.

Se realizaron utilizando cultivos de cinco individuos distintos por genotipo con sus respectivos triplicados técnicos. Los conteos de viabilidad celular se llevaron a cabo utilizando azul tripano a una dilución 1:3.

Los ensayos fueron realizados utilizando el mismo tiempo establecido para la determinación de la LC50. Todas y cada una de las condiciones evaluadas contó con sus respectivos controles.

Determinación del daño al DNA mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN).

- Cultivo celular.

Se obtuvieron 10 a 20 ml de sangre periférica (por venopunción de la región cubital del brazo) en tubos Vacutainer™ (Becton Dickinson, USA) con heparina como anticoagulante. Se realizó el cultivo de sangre total de la siguiente manera: 1ml de sangre en 10 ml de medio RPMI suplementado con 10% SBF, 1% ANE y 1% anti/anti y se le adicionaron 200 µl de fitohemaglutinina. Se dejó proliferando el cultivo durante 44 h en una incubadora con 5% de CO₂ y 37°C.

Una vez transcurrido el periodo de incubación se aplicó el tratamiento, se expuso a los cultivos a dosis crecientes de CDDP para determinar la condición idónea para la evaluación de micronúcleos. Las concentraciones de CDDP utilizadas fueron 0.5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM y 20 µM.

El tiempo de exposición a CDDP fue el mismo utilizado en los ensayos de LC50 y viabilidad celular, por lo cual la citocalasina b se adicionó al mismo tiempo que el tratamiento, esto para permitir que actúe sólo durante un ciclo de división celular, facilitando de esta forma, la generación de un mayor número de células binucleadas. Se dejó proliferando el cultivo en la incubadora con 5% de CO₂ y 37°C.

- **Fijación de células con solución fijadora metanol- ácido acético (3:1).**

Pasadas las 24 h de tratamiento se resuspendió cada caja de cultivo agitando suavemente. Se trasladó el medio a tubos de fijación (de preferencia tubos de cristal sellados perfectamente con papel ParafilmTM para evitar que se saliera la muestra). Se realizó una prefijación adicionando un volumen de pipeta Pasteur de nuestra solución fijadora tubo por tubo, agitando cada uno por inmersión suavemente. **NOTA:** De preferencia se coloca la solución fijadora y se resuspende cada tubo al instante, esto se realiza para evitar la formación de grumos de células.

Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a 1200 rpm durante 8 min. Una vez terminada la centrifugación se retiró el sobrenadante con pipetas de 5 o 10 ml, según el volumen de medio presente en los tubos. Al paquete celular se le adicionaron 5 ml de solución fijadora, se sellaron con papel ParafilmTM y se agitaron por inmersión. Los tubos se dejaron durante 20 min a -20°C.

Transcurrido el tiempo, los tubos fueron centrifugados a 1200 rpm durante 8 min. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se realizaron lavados con el mismo

volumen de solución fijadora. Este proceso se realizó hasta observar una coloración transparente en los tubos. En el último lavado, se retiró la mayor cantidad de sobrenadante (dejando aproximadamente 1 ml). Se resuspendió el botón de células obtenido con una pipeta y el volumen fue trasladado a tubos eppendorf de 1.5 ml.

Una vez lavado el paquete de células se realizaron laminillas mediante goteo.

NOTA. Las laminillas estaban en un frasco con etanol al 70% frío, y el goteo se realizó suavemente a poca distancia. Por último, se dejaron secar las laminillas en la campana de extracción durante 24 h.

- **Tinción de laminillas con Eosina y Azul de metileno.**

Se llevó a cabo una primera tinción con Eosina durante 30 s, agitando suavemente. Posteriormente se realizó un lavado durante 5 s en agua destilada. En seguida se hizo una segunda tinción con azul de metileno durante 3 s. Se lavó durante 10 s en agua destilada. Por último, se secó la contraparte de cada laminilla y se dejó secar totalmente durante 24 h para iniciar el conteo.

- **Conteo de laminillas. (Heterogeneidad de laminillas)**

Se realizó un conteo de 500 células en toda la laminilla. De esta forma se determinó el porcentaje de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas y apoptóticas. **NOTA:** porcentaje óptimo de células binucleadas varía del 30 al 60% de total de células.

- **Conteo de micronúcleos.**

Se realizó un conteo de 1000 células binucleadas para determinar el porcentaje de micronúcleos.

NOTA. Todos los conteos fueron realizados utilizando el objetivo de 100X del microscopio de campo claro (Leica, Model DME microscope, modelo: 13595XXX). El conteo fue realizado en tres cultivos distintos por genotipo (dos en el caso del genotipo silvestre AA). De cada cultivo se obtuvieron tres distintas laminillas por condición (control y tratado). Cada conteo fue comparado con el de un segundo conteo independiente, es decir, se le pidió a un individuo ajeno al proyecto realizar el conteo de la misma laminilla sin saber las condiciones de las mismas. Dicho individuo contaba con todas las bases y fundamentos para llevar a cabo el conteo.

Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como las medias más desviación estándar y se realizó el análisis utilizando la prueba t de Student. Valores de probabilidad <0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Se empleó el programa Microsoft Excel 2010 para el análisis estadístico.

Resultados.

Muestras de población mexicana aparentemente sana. Extracción de DNA, amplificación de fragmento de interés y genotipificación del polimorfismo 5'UTR de XPA.

Fueron analizadas un total de 87 muestras de sangre periférica de individuos aparentemente sanos. Se realizó la extracción del DNA y su posterior amplificación mediante la técnica de PCR con las condiciones previamente descritas. El producto de interés que contiene el polimorfismo 5'UTR de XPA, es un fragmento de 204 pb (Figura 12).

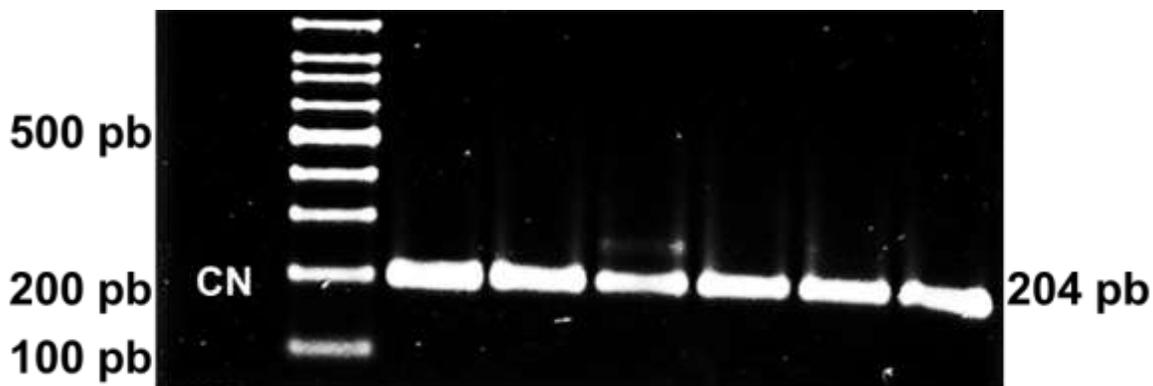


Figura 12. Amplificación del fragmento de interés con peso molecular de 204 pb. CN→Control Negativo.

Para la genotipificación del polimorfismo 5'UTR de XPA, el producto de PCR de las 87 muestras fue analizado mediante la técnica RFLP empleando la enzima de restricción *BspEI* (Figura 13).

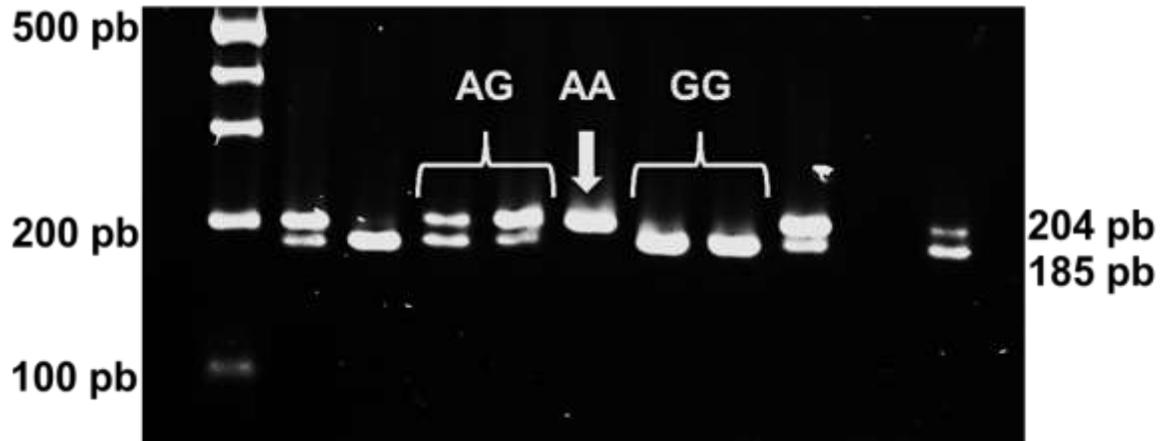


Figura 13. Gel de agarosa que muestra los distintos fragmentos obtenidos durante la genotipificación del polimorfismo 5'UTR de XPA. **GG**→ homocigo polimórfico, **AG** → heterocigo y **AA**→ homocigo silvestre.

El porcentaje genotípico del polimorfismo 5'UTR A→G de XPA derivado de dicho análisis fue: 13 (15%) silvestres (AA), 50 (57%) heterocigos (AG) y 24 (28%) polimórficos (GG) (Figura 14).

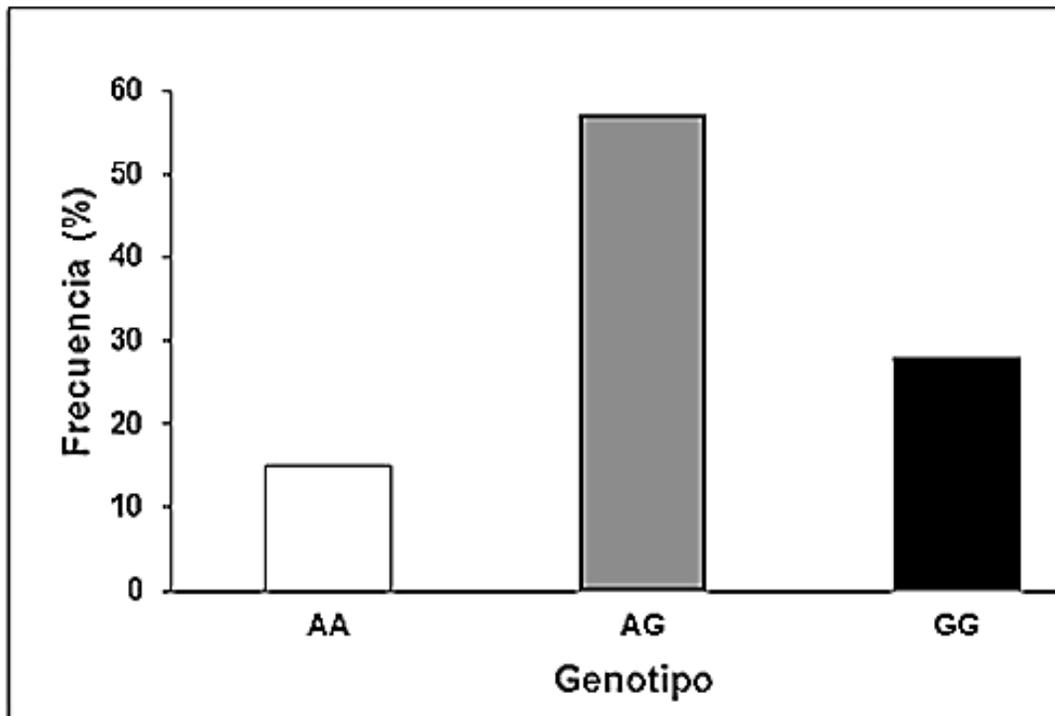


Figura 14. Porcentaje genotípico del polimorfismo 5'UTR de XPA en 87 muestras analizadas. AA→ 15%, AG→57% y GG→28%.

Se observó que el genotipo heterocigoto (AG) y el polimórfico (GG) son los mayor representados en nuestra población del estudio: AA → 15%, AG → 57% y GG → 28%. La frecuencia del alelo A fue de 43.5% y del alelo G fue de 56.5%.

Determinación de LC50 y viabilidad en función del genotipo.

Fue observado que células que presentan al menos un alelo polimórfico tenían una LC50 menor en comparación con las células portadoras del genotipo homocigoto silvestre. Las LC50 fueron las siguientes: homocigotos silvestres (AA) → **>96 µM**, heterocigotos (AG) → **88.3 µM** y homocigotos polimórficos (GG) → **70.9 µM**. Los ensayos fueron realizados utilizando cultivos de cinco individuos distintos por genotipo (AG y GG) realizando conteos por triplicado. Sin embargo, dado el bajo porcentaje de los individuos homocigotos silvestres, no fue posible reclutar a todos los individuos, por lo cual, solo fueron realizados los conteos en cultivos de dos individuos distintos por triplicado (Figura 15). Estos resultados demuestran una diferencia de viabilidad entre cultivos de los distintos genotipos del polimorfismo 5'UTR de XPA, sin embargo, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa.

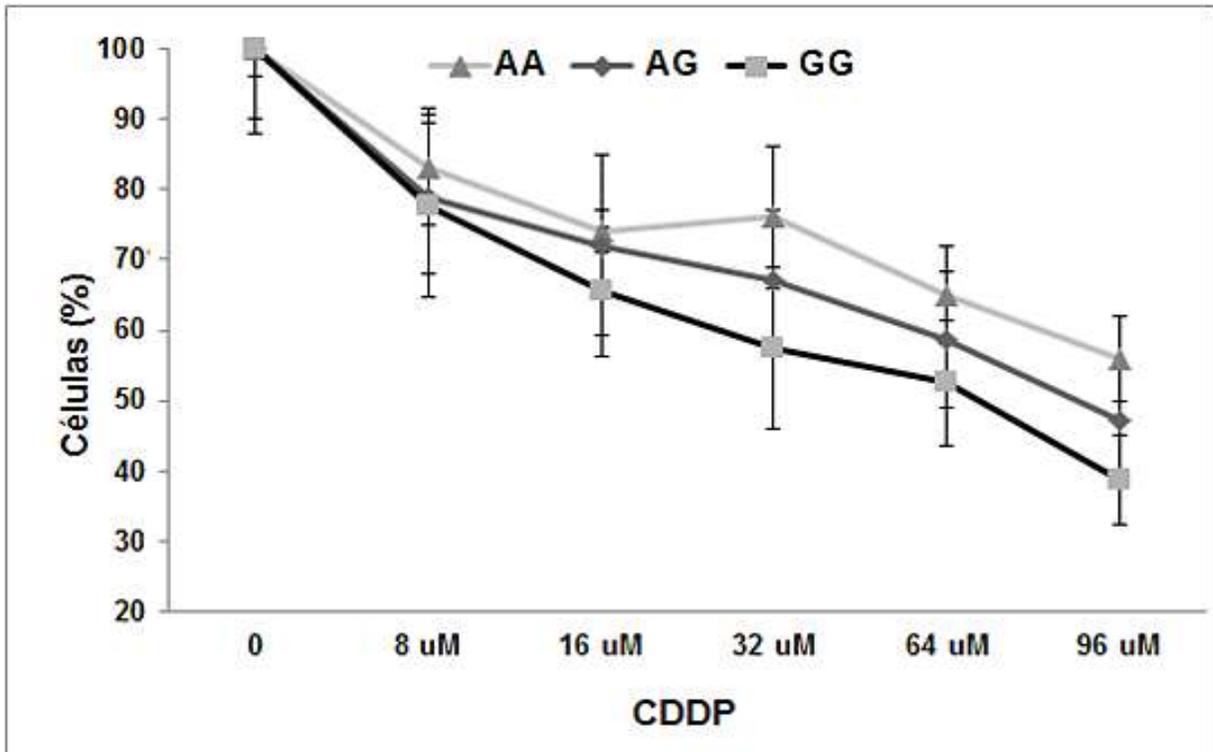


Figura 15. Determinación de LC50 en función del genotipo. Se utilizó la fórmula de la pendiente para la obtención de las LC50. La gráfica es el resultado del conteo en 12 cultivos con distintos genotipos (5 GG, 5 AG y 2 AA, por triplicado). Se muestran diferencias significativas entre los distintos genotipos evaluados.

Evaluación del daño al DNA mediante la técnica de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.

Tomando en cuenta la gráfica de viabilidad se realizó una curva de concentración de CDDP para determinar las dosis adecuadas para evaluar daño al DNA por medio de la técnica de micronúcleos. Se utilizaron las concentraciones a partir de las cuales se observó una separación en las curvas de viabilidad entre genotipos. Dichas dosis fueron observadas entre 10 y 15 μM . Para tener una visión más amplia de evaluación se decidió tomar dos concentraciones mayores y dos

menores a dichas dosis. Por lo tanto, la curva de CDDP utilizada fue con las siguientes concentraciones: 0.5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM y 20 μM .

La dosis elegida para el análisis de micronúcleos en función del genotipo fue 15 μM , concentración a la cual logró observarse diferencias estadísticamente significativas entre todos los genotipos ($p < 0.05$), además de contar con un número adecuado de células binucleadas para realizar nuestro conteo (Figura 16).

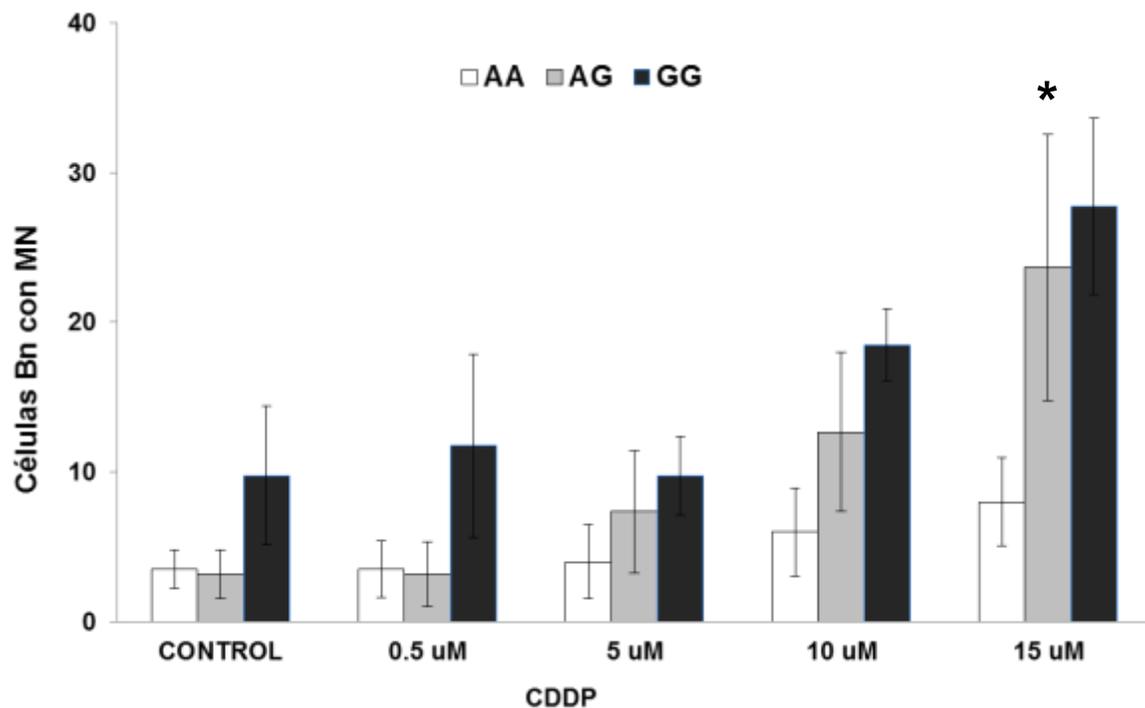


Figura 16. Curva de concentración de CDDP. Se determinó 15 μM como la dosis idónea para la evaluación de micronúcleos en función del genotipo, concentración a la cual se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). AA \rightarrow Homocig silvestre, AG \rightarrow heterocigos y GG \rightarrow Homocig polimórfico. La gráfica representa conteo de seis cultivos distintos, dos AG, dos GG y dos AA, cada uno con su respectivo triplicado (tres laminilla por condición) y por doble conteo (dos individuos contaron las laminillas). **MN** = micronúcleo **Bn**= binucleadas. * $p < 0.05$ entre los grupos tratados y controles de cada genotipo.

Posteriormente se realizaron los ensayos de micronúcleos utilizando la concentración de 15 μ M. Se observó que células portadoras de al menos un alelo polimórfico exhibían mayor daño al DNA, lo cual se ve reflejado en un conteo mayor de micronúcleos, a diferencia de células con genotipo homócigo silvestre, mostrándose una diferencia estadística ($p < 0.05$) cuando se compararon los genotipos AG y GG contra AA; diferencia que no fue observada cuando se compararon entre sí (Figura 17).

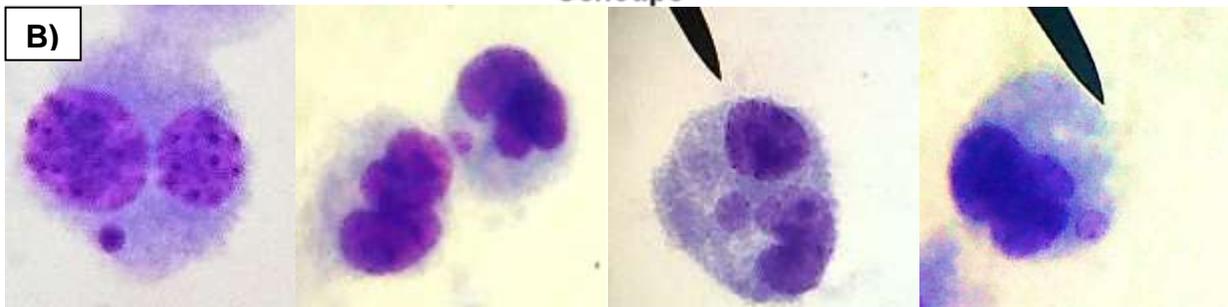
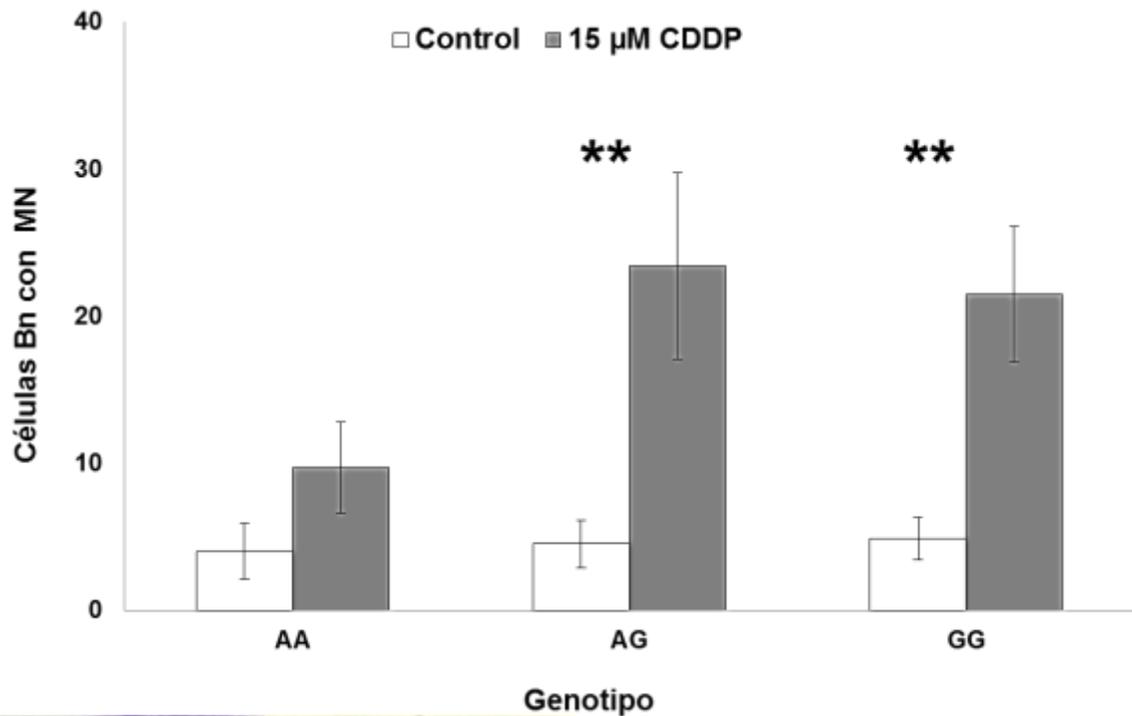


Figura 17. A) Frecuencia de micronúcleos en función del genotipo. Células portadoras de al menos un alelo polimórfico exhiben mayor daño reflejado en un conteo de micronúcleos más alto ($p < 0.05$). La gráfica representa el conteo de ocho cultivos distintos, tres AG, tres GG y dos AA, cada uno con su respectivo triplicado y por doble conteo. **B)** Células binucleadas exhibiendo micronúcleos después del tratamiento con CDDP durante 24 h con CDDP. **MN** = micronúcleo **Bn**= binucleadas. ** $p < 0.05$ entre grupos homócigo silvestre (AA) y homócigos polimórficos (GG) y heterócigos (AG).

DISCUSIÓN.

Los sistemas de reparación del DNA tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del genoma, son mecanismos muy diversos y específicos que reconocen cada tipo de lesión. Uno de los principales mecanismos lo constituye el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), el cual interviene en la remoción de aductos en el DNA. La proteína XPA está involucrada en el reconocimiento de la cadena del DNA dañada, dicha función la realiza después de la unión del complejo XPC-hHR23B. XPA juega un papel central dentro de la vía NER a través de su interacción con RPA, TFIIH y el complejo ERCC1-XPF (Ding *et al.*, 2011).

Polimorfismos en secuencias codificantes o regulatorias del gen *XPA* pueden resultar en alteraciones funcionales de la vía NER. En el año 2000 el grupo de Butkiewicz identificó un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la secuencia de *XPA*, dicho polimorfismo está localizado cuatro nucleótidos río arriba del codón de inicio ATG (5'UTR) y consiste en una transición de una adenina a una guanina (A→G).

Nuestro trabajo se enfocó en un estudio *in vitro* que evaluó la asociación entre el polimorfismo 5'UTR A→G de *XPA* con la respuesta celular al tratamiento con CDDP en una población abierta de individuos aparentemente sanos.

Se observó que los genotipos heterocigoto (AG) y homocigoto para el polimorfismo (GG) presentan la mayor frecuencia en nuestra población de estudio, el alelo G fue el más representativo (56.5%). Al comparar nuestros resultados con los

reportes en otras poblaciones (Butkiewicz et al, 2000; Park et al., 2002; Kiyohara y Yoshimasu, 2007) observamos que las frecuencias genotípicas del polimorfismo 5'UTR de *XPA* tienen un comportamiento similar, siendo el alelo G el más frecuente, lo cual hace evidente la necesidad de estudios más detallados que permitan determinar el papel de dichas variaciones a nivel interpoblacional.

Existe una asociación entre la presencia del polimorfismo 5'UTR A→G de *XPA* y la sensibilidad al tratamiento con CDDP en linfocitos humanos. Las células portadoras de al menos un alelo polimórfico (G) mostraron una menor viabilidad comparado con células portadoras del genotipo homocigoto silvestre (AA). La LC₅₀ obtenida en los distintos genotipos demuestra que células con los genotipos AG y GG requieren una menor dosis de CDDP para alcanzar este punto. Estas diferencias pueden ser resultado de una reparación deficiente del DNA. Nuestros datos contrastan con los obtenidos por Wu et al. (2003) y Park et al. (2002), donde observaron que la presencia del polimorfismo 5'UTR A→G de *XPA* se asocia con una mayor capacidad de reparación del DNA, y por tanto, menor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Dichos contrastes pueden deberse no solo al polimorfismo, sino también a diferencias interpoblacionales que podrían determinar la respuesta o no al tratamiento.

Los resultados de nuestro estudio coinciden con lo reportado por Feng y cols. en 2009, donde se observó que la presencia del polimorfismo 5'UTR A→G de *XPA* incrementó significativamente la respuesta al tratamiento basado en platino en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas.

A pesar de que el efecto de la transición de adenina a guanina (A→G) no ha sido caracterizado con precisión (Butkiewicz et al., 2000), se ha propuesto que esta región cercana al codón de inicio, conocida como secuencia Kozak, puede tener implicaciones importantes en la unión de la subunidad ribosomal 40S al RNAm y como resultado, influenciar los niveles proteicos en las células. En este sentido, se sabe que el contexto óptimo para el inicio de la traducción en el RNAm de vertebrados es **GCCACCatgG** (secuencia Kozak). Dentro de este motivo consenso, nucleótidos en dos posiciones altamente conservadas ejercen un gran efecto durante la unión de los ribosomas: una guanina localizada inmediatamente después del codón de inicio ATG (posición +4) y una purina, preferentemente adenina, tres nucleótidos río arriba (posición -3) (Kozak, 1996), la contribución de dichos nucleótidos ha sido verificada por mutagénesis en diversos estudios (Cao y Geballe 1995; Descombes y Schibler 1991; Dinesh-Kumar y Miller 1993). Por tal motivo, un cambio en la secuencia podría tener llegar a tener una importante implicación biológica en la célula. Con este antecedente, se propone que la presencia del polimorfismo 5' UTR XPA (A→G) podría alterar la capacidad de síntesis de la proteína XPA, disminuyendo así los niveles proteicos, viéndose reflejado en un pobre reconocimiento del daño al DNA. También se ha postulado que las modificaciones en la secuencia 5' UTR podrían llegar a alterar la estructura terciaria del RNAm, haciéndolo menos estable (Park et al., 2002; Kiyohara y Yoshimasu, 2007; Ding et al., 2011).

Para realizar nuestros análisis de daño al DNA utilizamos el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN), el cual nos permite evaluar los

efectos citotóxicos y citostáticos de una gran variedad de compuestos químicos capaces de alterar la estructura del DNA. La técnica evalúa el daño al DNA (rompimientos de doble cadena y aneuploidías) que causa un agente al ser suministrado a un cultivo celular, siendo los linfocitos T el mejor modelo empleado en estudios de toxicología ambiental (Thomas y Fenech, 2011). En nuestro estudio se utilizó el CDDP, que al inducir aductos en el DNA, ocasiona rompimientos de doble cadena (Fenech, 2000).

Se realizó un análisis para determinar la concentración de CDDP adecuada para el conteo de micronúcleos, utilizando dosis desde 0.5 μM a 20 μM . Estas concentraciones fueron utilizadas basándonos en nuestros conteos de viabilidad. La concentración idónea para el análisis se estableció en 15 μM , debido a que la viabilidad mantuvo valores similares entre los distintos genotipos. Esto nos permitió mantener el mismo rango de células binucleadas (aprox. 30-60%) por experimento, reduciendo así el sesgo asociado a una muerte celular por daño al DNA.

Al realizar el conteo de micronúcleos se observó que las células portadoras de al menos un alelo polimórfico tuvieron una mayor frecuencia de micronúcleos comparada con las células que poseen el genotipo silvestre. Esto sugiere que el polimorfismo 5'UTR de *XPA* juega un papel importante en la modulación de la respuesta al daño en el DNA en linfocitos tratados con CDDP.

En el año 2009 Kazimírova y cols. evaluaron el daño al DNA (mediante la formación de micronúcleos) asociando los polimorfismos 5'UTR A23G de *XPA*,

Lys939Gln de *XPC*, *XPC*in9, *XPC* IVS11 y Asp312Asn de *XPD*, Lys751Gln de la vía NER. Utilizaron una población europea y analizaron el daño en función de la edad. La frecuencia del alelo polimórfico (G) fue de 0.60 en jóvenes y 0.66 en adultos. Dichos investigadores no encontraron asociación entre la presencia de micronúcleos y el polimorfismo 5'UTR de A→ de *XPA*.

Nuestros resultados demuestran que el polimorfismo 5'UTR A→G de *XPA* modifica la respuesta al tratamiento con CDDP en linfocitos humanos, posiblemente asociado a deficiencias en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos. Dicho polimorfismo al estar localizado cercano al codón de inicio ATG, podría alterar la estructura del RNA mensajero y probablemente disminuir la traducción hacia proteína, de tal forma que el reconocimiento del daño no sería el adecuado, impidiendo de esta forma, el reclutamiento de toda la maquinaria NER necesaria para la reparación del DNA.

CONCLUSIÓN.

La presencia del polimorfismo 5'UTR A→G de *XPA* disminuye la viabilidad celular e incrementa el daño al DNA en linfocitos con al menos un alelo polimórfico, comparado con células AA. Un abordaje distinto al evaluar daño al DNA podría definir con mayor precisión el papel específico de este polimorfismo en la respuesta al tratamiento con CDDP y su posible implicación en la práctica clínica. Asimismo, es necesario realizar experimentos que permitieran evaluar el efecto de este SNP en la expresión de RNAm (vida media), ya que, al estar en una secuencia regulatoria podría afectar la estabilidad del mensajero. Este es el primer estudio en determinar la asociación entre el polimorfismo 5'UTR de *XPA* y la respuesta al tratamiento con CDDP en células de individuos aparentemente sanos, como parte de un estudio *in vitro*.

ANEXOS.

GLOSARIO DE TERMINOS.

Aducto en el DNA: Complejo que se forma cuando un compuesto inorgánico (químico) se une covalentemente a la estructura del DNA.

Aflatoxina: Son micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, son tóxicas y carcinogénicas para animales, incluyendo humanos.

Agente alquilante: Son compuestos capaces de unir grupos alquilo al DNA. Estos medicamentos pueden operar en cualquier momento del ciclo celular. Sin embargo, son más eficaces durante la síntesis de DNA.

Alelo: Uno de los posibles estados de un gen, que se distinguen de otros alelos por sus propios efectos fenotípicos.

Anticoagulante: Es una sustancia endógena o exógena que interfiere o inhibe la coagulación de la sangre, creando un estado pro-hemorrágico.

Antineoplásico: Sustancia que impide el desarrollo, crecimiento, y/o proliferación de células tumorales malignas. Estas sustancias pueden ser de origen natural o sintético.

Apoptosis: Es un proceso celular genéticamente controlado por el cual las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos.

Benzo[a]pireno: Es un hidrocarburo policíclico aromático de cinco anillos, cuya fórmula global es C₂₀H₁₂. Se produce por Combustión incompleta de materia

orgánica. Es altamente tóxico, principalmente debido a su elevada mutagenicidad y carcinogenicidad.

Bleomicina: Es una mezcla de antibióticos citotóxicos, inhibe la síntesis del DNA, y en un nivel menor la síntesis del ARN y las proteínas. Esta acción previene la **división celular**.

Centros nucleofílicos: Se refieren a sitios ricos en electrones tales como los grupos amino, sulfhidrilo, hidroxilo y tioles, presentes en diversas moléculas (proteínas, RNA y DNA), lo cual permite la formación de aductos con diversos agentes químicos.

Delección: es un tipo de anomalía estructural cromosómica que consiste en la pérdida de un fragmento de DNA de un cromosoma.

Desaminación de bases: Es una reacción química que se caracteriza por la ruptura de un grupo amino en las bases del DNA.

Dímero: Es una molécula compuesta por dos unidades similares o monómeros enlazados, tanto por enlaces covalentes como no covalentes como los puentes de hidrógeno. Mismo que podría ser causado por algún agente externo como la radiación UV.

Enlaces intercatenarios: Se refiere a la unión de algún agente químico entre las dos cadenas del DNA.

Enlaces intracatenarios: Enlaces formados entre la misma cadena del DNA.

Enzima de restricción: Es una enzima que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de la molécula del DNA y cortar en ese punto concreto.

Etopósido: Es una podofilina semi-sintética derivada de la planta *Podophyllum notatum*. El etopósido daña el DNA al inhibir a la topoisomerasa II, una enzima que normalmente desenrolla el DNA durante la replicación para aliviar la tensión en las cadenas del DNA. Esto genera rompimientos en las cadenas del DNA, mismas que no pueden ser reparadas eficazmente.

Fitoheماغلوتينina: Es una lectina reconocida por su capacidad para aglutinar eritrocitos y leucocitos. Además estimula inespecíficamente la proliferación de células T

Glutati6n: Es el principal antioxidante end6geno producido por las células, participa en la neutralizaci6n de radicales libres, especies reactivas de ox6geno y el mantenimiento de antioxidantes ex6genos como las vitaminas C y E y sus formas reducidas.

Mostazas nitrogenadas: son agentes alquilantes que poseen dos sitios electrof6licos que inhiben la replicaci6n del DNA.

Nitrosamina: Las nitrosaminas son compuestos orgánicos que generalmente se originan debido a la reacci6n de una amina secundaria con nitritos en un medio muy ácido.

Tioles: Son compuestos que contienen un grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH), tales como la Glutación.

Xenobiótico: Todo compuesto químico que no forme parte de la composición de los organismos.

REFERENCIAS.

1. Boer J and Hoeijmakers J. H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 21(3):453-60. Review. (2000).
2. Bosch T. M., Meijerman I., Beijnen J. H. and Schellens J. H. Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the hemotherapeutic treatment of cancer. *Clin. Pharmacokinet.* 45(3):253–85. (2006).
3. Branzei D. and Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 297–308. (2008).
4. Brian S. T. and Vasquez K. M. Critical DNA Damage Recognition Functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in Nucleotide Excision Repair. *Molecular Carcinogenesis*, 38:1–13 (2003).
5. Butkiewicz D., Rusin M., Harris C. C., Chorazy M. Identification of four single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in Polish population. *Hum Mutat.* Jun; 15(6):577-8. (2000).
6. Cao J. and Geballe A. P. Translational inhibition by a human cytomegalovirus upstream open reading frame despite inefficient utilization of its AUG codon. *J. Virol.* 69, 1030-1036. (1995).
7. Cargill M., Altshules D., Ireland J. et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature genetics*. 22, 231-238. (1999).

8. Choi B. S. In need of repair. Preserving the genome. FEBS Journal 273. 1599 (2006).
9. Cummings M., Higginbottom K., McGurk C. J., Wong O. G. , Köberle B., Oliver R. T. and Masters J. R. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: role of ERCC1 in homologous recombination repair. Biochem Pharmacol. 14; 72(2):166-75. (2006).
10. Dabholkar M, et al. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. J Clin Invest 94 (2):703–8. . (1994).
11. Descombes P. and Schibler U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. Cell 67, 569-579. (1991).
12. Dianov G. L. Base excision repair targets for cancer therapy. Am J Cancer Res. 1(7):845-51. Epub 2011 Aug 12. (2011).
13. Dinesh-Kumar S.P. and Miller W.A. Control of start codon choice on a plant viral RNA encoding overlapping genes. Plant Cell 5, 679-692. (1993).
14. Ding D., Zhang Y., Yu H., Guo Y., Jiang L., He X., Ma W. and Zheng W. Genetic variation of XPA gene and risk of cancer: A systematic review and pooled analysis. Int J. Cancer. 15; 131(2):488-96. (2011).
15. Eker A. P. M., Vermeulen W., Miura N., Tanaka K., Jaspers N. G. J., Hoeijmakers J. H. J. and Bootsma D. Mutat. Res. 274, 211-224 (1992).

16. Ekhart C., S. Rodenhuis, P. P. H. M. Smits, J. H. Beijnen and A. D. R. Huitema. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treatment Reviews* 35, 18– 31. (2009).
17. Evans E., Moggs J. G., Hwang J. R., Egly J.-M. and R. D. Wood. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors, *EMBO J.* 16 6559–6573. (1997)
18. Feng J., Sun X., Sun N., Qin S., Li F., Cheng H., Chen B., Cao Y., Ma J., Cheng L., Lu Z., Ji J. and Zhou Y. XPA A23G polymorphism is associated with the elevated response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 41(5):429-35. (2009).
19. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 20;455(1-2):81-95. Review. (2000).
20. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2(5):1084-104. (2007).
21. Friedberg E. C. Nucleotide excision repair of DNA: The very early history. *DNA Repair* 10: 668-672 (2011).
22. Friedberg, E. C. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 1: 22–33. (2001).
23. Fuertes M. A., Castilla J., Alonso C. and Pérez J. M. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem.* 10(3):257-66. Review. (2003).

24. Fukui K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids*. 27; 2010. (2010).
25. Furuta T., Ueda T., Aune G., Sarasin A., Kraemer K. H. and Pommier Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res*. 1;62(17):4899-902. (2002).
26. Gamulin M., Kopjar N., Grgić M., Ramić S., Bisof V. and Garaj-Vrhovac V. Genome damage in oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy. *Croat Med J*. 49(4):515-27. (2008).
27. Gillet L. C. and Schärer O. D. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*. Feb;106(2):253-76. Review. (2006).
28. Halushka M., Fan J., Bentley K., Hsie L., Shen N., Weder A., Cooper R., Lipshutz R. and Chakravarti A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature Genetics*. 22, 239- 247. (1999).
29. Hays J. B., Hoffman P. D. and Wang H. Discrimination and versatility in mismatch repair. *DNA Repair (Amst)*. 8;4(12):1463-74. (2005).
30. Hemmerich P., Schmiedeberg L. and Diekmann S. Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance. *Chromosome Res* 19:131–151 (2011).
31. Jamieson E. R. and Lippard S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*. 8;99(9):2467-98. (1999).

32. Jordan P. and Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 57(8-9):1229-35. Review. (2000).
33. Judson I. and Kelland L.R. New developments and approaches in the platinum arena. *Drugs.* 59 Suppl 4:29-36; discussion 37-8. Review. (2000).
34. Kazimírova A., Barancoková M., Džupinková Z., Wsólová L. and Dusinská M. Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing: possible association with XPC and XPD polymorphisms. *Mutat Res.* 10;661(1-2):35-40. (2009).
35. Kisby G. E., Lesselroth H., Olivas A., Samson L., Gold B. and Tanaka K, Turker M. S. Role of nucleotide- and base-excision repair in genotoxin-induced neuronal cell death. *DNA Repair (Amst).* 3;3(6):617-27. (2004).
36. Kiyohara C. and Yoshimasu K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int. J. Med. Sci.* 4, 59-71. (2007).
37. Köberle B., Masters J. R., Hartley J. A. and Wood RD. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol.* 11; 9(5):273-6. (1999).
38. Köberle B., Roginskaya V. and Wood R. D. XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair (Amst).* 10; 5(5):641-8. (2006).
39. Kozak M. Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mammalian Genome* 7, 563-574 (1996).

40. Kraemer K. H., Patronas N. J., Schiffmann R., Brooks B. P., Tamura D. and DiGiovanna J.J. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience*. 14; 145(4):1388-96. Epub 2007 Feb 1. Review. (2007).
41. Kurosawa A. and Adachi N. Functions and regulation of Artemis: a goddess in the maintenance of genome integrity. *J Radiat Res*. 51(5):503-9. Epub 2010 Jun 11. Review. (2010).
42. Layher S. K. and Cleaver J. E. *Mutat. Res*. 383, 9-19 (1997).
43. Lazzaro F., M. Giannattasio, F. Puddu, M. Granata, A. Pellicoli, P. Plevani and M. Muzi-Falconi. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA Damage and repair. *DNA Repair*. 8, 1055-1067 (2009).
44. Lees-Miller S. P. and Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, 85, 1161-1173. (2003).
45. Leibel D., Laspe P., Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol*. 37(5-7):225-38. Epub 2006 Jul 20. Review. (2006).
46. Li X. and Heyer W. D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*. 18, 99-113. (2008).
47. Luijsterburg, M.S. and Van Attikum H. Chromatin and the DNA damage response: The cancer connection, *Molecular Oncology* (2011).
48. Maddukuri L., Dudzińska D. and Tudek B. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: The role of nucleotide excision DNA repair (NER) system in mammalian cells. *Acta Biochimica Polonica*. Vol. 54 No. 3, 469–482 (2007).

49. Malumbres M. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev* 91: 973–1007 (2011).
50. Marsh S, McLeod HL. Pharmacogenetics and oncology treatment for breast cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 8 (2):119–27. (2007).
51. Mathews L. A., Cabarcas S. M. and Farrar W. L. DNA repair: the culprit for tumor-initiating cell survival? *Cancer Metastasis Rev* 30:185–197 (2011).
52. Misteli T. and Soutoglou E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(4):243-54. Epub 2009 Mar 11. Review. (2009).
53. Miyamoto, I., Miura N., Niwa H., Miyazaki J. and Tanaka K. *J. Biol. Chem.* 267, 19786-19789 (1992).
54. Moore, B. S., Lydia M. P. and Paul D.W. DNA Damage. In: *Encyclopedia of Life Sciences.* (2009).
55. Norbury C. J. and Hickson, I. D. Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, 41, 367-401. (2001).
56. Nospikel T. Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 994 – 1009 (2009).
57. Pan J., Lin J., Izzo J. G., Liu Y., Xing J., Huang M., Ajani J. A. and Wu X. Genetic susceptibility to esophageal cancer: the role of the nucleotide excision repair pathway. *Carcinogenesis.* 30(5):785-92. (2009).
58. Park J. Y. et al. Polymorphisms of the DNA repair gene xeroderma pigmentosum group A and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 993-997. (2002).

59. Payet D., Gaucheron F., Sip M. and Leng M. Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH₃)₂(N₇-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl]₂⁺-modified DNA: rates of cross-linking reactions in cis-platinum-modified DNA. *Nucleic Acids Res.* 25; 21(25):5846-51. (1993).
60. Perez R. P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer.* 34(10):1535-42. Review. (1998).
61. Rabik C. A. and Dolan M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 33(1):9-23. Review. (2007).
62. Reed H. S. and Waters R. DNA Repair. In: *Encyclopedia of Life Sciences.* (2005).
63. Reed S. H. Nucleotide excision repair in chromatin: Damage removal at the drop of a HAT. *DNA Repair* 10: 734– 742. (2011).
64. Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S. C., Kakol J. M., Stein L. D., Marth G., Sherry S., Mullikin J. C., Mortimore B. J., Willey D. L., Hunt S. E., Cole C. G., Coggill P. C., Rice C. M., Ning Z., Rogers J., Bentley D. R., Kwok P. Y., Mardis E. R., Yeh R. T., Schultz B., Cook L., Davenport R., Dante M., Fulton L., Hillier L., Waterston R. H., McPherson J. D., Gilman B., Schaffner S., Van Etten W. J., Reich D., Higgins J., Daly M. J., Blumenstiel B., Baldwin J., Stange-Thomann N., Zody M. C., Linton L., Lander E. S. and Altshuler D.; International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation

- containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. Feb 15; 409 (6822):928-33. (2001).
65. Saldivar J. S., Lu K. H., Liang D., Gu J., Huang M., Vlastos A. T., Follen M. and Wu X. Moving toward individualized therapy based on NER polymorphisms that predict platinum sensitivity in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol*. 107 (1 Suppl1):S223-9. (2007).
66. Satokata I., Iwai K., Matsuda T., Okada Y. and Tanaka K. Genomic characterization of the human DNA excision repair-controlling gene XPAC. *Gene*. 22; 136(1-2):345-8. (1993).
67. Siddik Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 20;22(47):7265-79. Review. (2003).
68. Sinha M. and Peterson C.L. Chromatin dynamics during repair of chromosomal DNA double-strand breaks. *Epigenomics*. 1(2):371-85. Review. (2009).
69. Stojic L., Brun R. and Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNARepair (Amst)*. 3(8-9):1091-101. Review. (2004).
70. Sung J. S. and Dimple B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *FEBS J*. 273(8):1620-9. Review. (2006).
71. Takata M., et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17: 5497–5508. (1998).

72. Thomas P. and Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods Mol Biol.* 682:217-34. (2011).
73. Trimmer E. E. and Essigmann J. M. Cisplatin. *Essays Biochem.* 34, 191-211. (1999).
74. Velangi M. R., Matheson E. C., Morgan G. J., Jackson G. H., Taylor P. R., Hall A. G. and Irving J. A. DNA mismatch repair pathway defects in the pathogenesis and evolution of myeloma. *Carcinogenesis.* 25(10):1795-803. (2004).
75. Vogel U., Overvad K., Wallin H., Tjønneland A., Nexø B. A. and Raaschou-Nielsen O. Combinations of polymorphisms in XPD, XPC and XPA in relation to risk of lung cancer. *Cancer Lett.* 10; 222(1):67-74. (2005).
76. Wang D., Fan J.-B., Siao C.-J. et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 280, 1077-1082. (1998).
77. Welsh C, et al. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer.* 110(3):352–61. (2004).
78. Wogan G. N., Hecht S. S., Felton J. S., Conney A. H., Loeb L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 14(6):473-86. Review. (2004).
79. Wong E. and Giandomenico C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev.* 8;99(9):2451-66. (1999).
80. Wood R.D., Mitchell M., Sgouros J. and Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science.* 16; 291(5507):1284-9. (2001).

81. Wu X., Zhao H., Wei Q., Amos CI., Zhang K., Guo Z., Qiao Y., Hong W. K. and Spitz M.R. XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity. *Carcinogenesis*. 24(3):505-9. (2003).
82. Wyman C. and Kannar R. DNA double-strand break repair: all's well that end well. *Annu. Rev. Genet.* 40, 363-383. (2006).
83. Zou J. H., An L., Chen S. and Ren L. Q. XPA A23G polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 39(2):1435-40. (2012).