



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DE LA CATALASA EN LINFOBLASTOS DE ANEMIA DE FANCONI C, D1 Y E TRATADOS CON HIDROXIUREA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
LUIS ALFREDO AGUAYO VAZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. BERTHA MOLINA ALVAREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

2005



0350263



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Efecto de la Catalasa en linfoblastos de Anemia de Fanconi C, D1 y E tratados con Hidroxiurea"

realizado por Luis Alfredo Aguayo Vazquez

con número de cuenta 09227355-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

M. en C. Bertha Molina Alvarez

Bertha Molina A

Propietario

Dra. Sara Frías Vázquez

Sara Frías V

Propietario

M. en C. Angélica Graciela Martínez Hernández

Angélica

Suplente

M. en C. Laura Gómez Laguna

Laura G.L.

Suplente

Biól. Silvia Rosalía Sánchez Sandoval

Silvia

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

[Firma]
~~M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez~~



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

**A Domingo y Memo
por ser
lo mejor que tengo.**

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de citogenética humana del Instituto Nacional de Pediatría por todo el apoyo para la realización de este trabajo.

A mis mejores maestras la Dra. Sara Frias y la M. en C. Bertha Molina por su paciencia y por transmitir su conocimiento de forma excelsa.

A las mujeres que me formaron académicamente: Sara, Bertha, Laura, Sandra, Silvia, Luz y Angélica por enseñarme que la citogenética, es aún en estos tiempos del gen, un conocimiento invaluable y por regalarme siempre una sonrisa.

A Carlos por ser tan eficiente y veloz.

A mi padre por el apoyo y los genes.

A Paloma por enseñarme a volar.

A Yadira por ser mi mejor amiga y apoyarme en esta larga travesía de la escritura.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias: Rodrigo, Yadira, Carlos, Juan, Ivonne, Katy, Abraham, Edson, Elena, por hacer de la licenciatura la mejor época de mi vida.

A la Dra. Edna por el apoyo para la realización de este trabajo.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
I GENERALIDADES.....	2
Características clínicas.....	2
Características citogenéticas.....	3
Heterogeneidad genética.....	4
Características moleculares.....	6
Complejo AF.....	11
Alteraciones del ciclo celular AF.....	13
II ANTECEDENTES.....	15
Sensibilidad al Oxígeno.....	15
Ribonucleótido reductasa.....	16
Hidroxiurea.....	17
Catalasa.....	18
JUSTIFICACION.....	20
OBJETIVO.....	21
HIPÓTESIS.....	21
METODOLOGÍA.....	21
Líneas celulares.....	21
Diseño experimental.....	22
Cosecha	
Laminillas y tinción	
Análisis	
RESULTADOS.....	26
Línea normal 6846.....	26
AF-C HSC536.....	27
AF- D HSC62N.....	28
AF-E VU130.....	29
Respuesta general.....	30
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	37
REFERENCIAS.....	38

ABREVIATURAS

AC	Aberraciones cromosómicas
AF	Anemia de Fanconi
ATM	Ataxia telangiectasia
BLM	Síndrome de Bloom
CAT	Catalasa
DEB	Diepoxibutano
dNTP	2´desoxirribonucleótido trifosfato
HU	Hidroxiurea
ICH	Intercambio de cromátides hermanas
MMC	Mitomicina C
M-W	Mann Whitney (prueba no paramétrica)
PAAF	Polipéptido asociados a anemia de Fanconi
RNR	Ribonucleótido reductasa
SOD	Superóxido dismutasa
XPF	Xeroderma pigmentosum

RESUMEN

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva y ligada al cromosoma X caracterizada por alteraciones hematológicas y predisposición a desarrollar cáncer. Las células con anemia de Fanconi presentan una gran sensibilidad a agentes que producen enlaces cruzados como la mitomicina C (MMC) y genera una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas. Se ha demostrado que la hidroxIUrea (HU) disminuye la síntesis de DNA en linfocitos AF y aumenta de manera significativa la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en linfoblastos AF-A, B, C, D1, E y células normales, específicamente en fase G2; adicionalmente la HU incrementa de dos a tres veces el daño al ADN causado por la MMC en células AF-A y B. Se conocen dos mecanismos por los cuales éste incremento puede ser explicado: la HU inactiva a la ribonucleótido reductasa (RNR) con lo que la disponibilidad de nucleótidos necesarios en la reparación del ADN disminuye, pero también al activarse es un agente potencialmente reactivo que puede generar radicales como el H_2O_2 que pueden dañar directa o indirectamente al ADN.

Por otro lado la catalasa (CAT) es una enzima eficiente en la eliminación de especies como el H_2O_2 en las células, por lo que en este trabajo se utilizó con la finalidad de eliminar los radicales libres que se generan por la acción de la HU y determinar entonces si el incremento de AC en las células AF-C, AF-D1 y AF-E se debe a la generación de radicales libres. Se realizaron ocho cultivos de cada una de las líneas celulares AF y una línea normal, la mitad de los cultivos fueron tratados con MMC, después de 24 hrs fue retirada y se adicionó HU y CAT en 6 diferentes combinaciones para valorar el efecto individual y en conjunto de estos agentes.

Los resultados muestran que con la adición de CAT no hay una reducción significativa en la frecuencia de AC después del tratamiento con MMC y HU en ninguna de las líneas AF, lo que sugiere que el incremento de AC no se debe a la generación de radicales libres producidos por la HU sino por la disminución de la disponibilidad de nucleótidos necesarios en los procesos de reparación del ADN, o bien que la HU interfiere directamente con los procesos de reparación al generar inestabilidad a la horquilla de replicación.

INTRODUCCIÓN

I GENERALIDADES

Características clínicas

La anemia de Fanconi (AF) fue descrita por primera vez en 1927 por Guido Fanconi, es una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X. Tiene una prevalencia mundial de 1/350,000 se encuentra en todos los grupos étnicos y se estima que hay de 0.3 a 1 % de heterocigotos portadores de algún gen AF (Joenje H y Patel K, 2001).

Las manifestaciones clínicas más importantes son: retraso en el crecimiento, hiperpigmentación en la piel, manchas color café con leche ó áreas hipopigmentadas, microcefalia, microftalmia, anormalidades esqueléticas principalmente en radio y/o pulgar, alteraciones renales y genitales, aunque existe una gran variabilidad de manifestaciones dentro de la misma enfermedad ya que mientras alrededor de un 30% desarrollan anemia tardíamente y carecen de otras alteraciones clínicas, otros pacientes presentan anormalidades congénitas severas (Kupfer *et al*, 1997a). A nivel hematológico los pacientes con AF desarrollan entre los 5 y 10 años de edad una disminución progresiva de las células de la médula ósea que se conoce como pancitopenia y tiene un riesgo del 98% de presentarse en pacientes AF (Alter, 1999).

La mayoría de los pacientes AF tienen una alta predisposición a desarrollar neoplasias del tipo hematológico (leucemia mieloblastica aguda generalmente) y carcinomas (orofaríngeos y celular escamoso principalmente) (Auerbach *et al*, 1997; Alter, 1999).

La infertilidad es una característica importante sobre todo en los varones con hipogonadismo y espermatogénesis anormal, en mujeres la fertilidad está disminuida aunque no ausente (Alter, 1999).

La expectativa de vida de estos pacientes es de 20 años (Auerbach *et al*, 1991), en 1999 Esmer y colaboradores reportaron que en México la vida media es de 12.44 ± 6.4 años, aunque con datos de una población pequeña.

Características citogenéticas

La AF pertenece a un grupo de enfermedades con inestabilidad cromosómica, dentro de las cuales se encuentran la Ataxia telangiectasia (ATM), Xeroderma pigmentosum (XPF), síndrome de Cockayne y síndrome de Bloom (BLM) entre otras. Una característica común de estas enfermedades es que los individuos con estos padecimientos tienen células con una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) espontáneas, presentan hipersensibilidad a mutágenos específicos y una elevada predisposición a desarrollar cáncer (Kupfer y D'Andrea, 1996).

En 1964 Schroeder y colaboradores descubrieron que los linfocitos AF presentan un elevado número de rupturas cromosómicas espontáneas. Posteriormente Sasaki y Tonomura en 1973 reportaron una alta sensibilidad de los linfocitos AF a la mitomicina C (MMC) y a la mostaza nitrogenada. Otras investigaciones sugieren que la sensibilidad a la MMC se debe a que ésta produce enlaces covalentes en el ADN y monoadductos (Sognier M y Hittelman W, 1986; Pagano G, 2000) genera con esto enlaces tanto intra como intercadena que son los causantes de las AC (Remers A, 1979).

Debido a la gran variabilidad de características clínicas de esta enfermedad se han utilizado agentes como la MMC que inducen enlaces cruzados en el ADN lo que provoca un aumento de AC, de tal manera que esta característica puede ser utilizada en el diagnóstico certero de la enfermedad.

La MMC fue aislada de la levadura *Streptomyces caespitosus* en forma de cristales azul-violeta, tiene un peso molecular de 334 daltones es soluble en agua y solventes orgánicos (Gutiérrez L, 1979). Este compuesto ha sido utilizado como antibiótico y agente antitumoral dado que inhibe la división celular tanto de bacterias como de células tumorales (Lown J, 1979). Además del daño al ADN la MMC reduce la tasa de replicación y de manera dosis dependiente aumenta el tiempo de duración del ciclo celular, con lo que se ha argumentado que las células que tienen daño inducido con MMC, eventualmente pueden pasar por mitosis sin haber completado la replicación de ADN (Sognier M y Hittelman W, 1986). En comparación con células de individuos normales, las células de pacientes AF pueden presentar hasta 30 veces más AC cuando el daño es inducido con MMC, aunque hay una gran variabilidad en la respuesta a este agente debido a la heterogeneidad genética (Frias *et al*, 1991). Las rupturas cromatídicas y las figuras de intercambio son el principal tipo de daño al ADN en las células de pacientes AF, tanto de manera espontánea como inducida.

Heterogeneidad genética

Con los estudios de hibridación celular realizados en fibroblastos de pacientes con AF en 1980 por Zakrzewski y Sperling, y en 1985 por Duckworth-Rysiecki y cols en linfoblastos, se logró determinar el grupo de complementación AF-A. Los grupos de

complementación se determinaron por ensayos de hibridación de células somáticas procedentes de pacientes AF no emparentados, los híbridos fueron tratados con agentes inductores de enlaces cruzados, si corregían el fenotipo de inestabilidad cromosómica debido a que había complementación genética, entonces las células originales pertenecían a grupos diferentes, mientras que las células híbridas en las que prevalecían las AC no había complementación genética, por lo que las células que las originaban pertenecían al mismo grupo de complementación (figura 1). Los grupos de complementación son indicativos de la heterogeneidad genética debido a que distintos genes producen un mismo fenotipo celular, y a cada grupo de complementación le corresponde un gen diferente (tabla 1) cuyas mutaciones provocan el fenotipo de esta enfermedad. Hasta el momento se conocen doce grupos de complementación denominados AF-A, AF-B, AF-C, AF-D1/BRCA2, AF-D2, AF-E, AF-F, AF-G, AF-I, AF-J, AF-L y AF-M (Meetei *et al*, 2005).

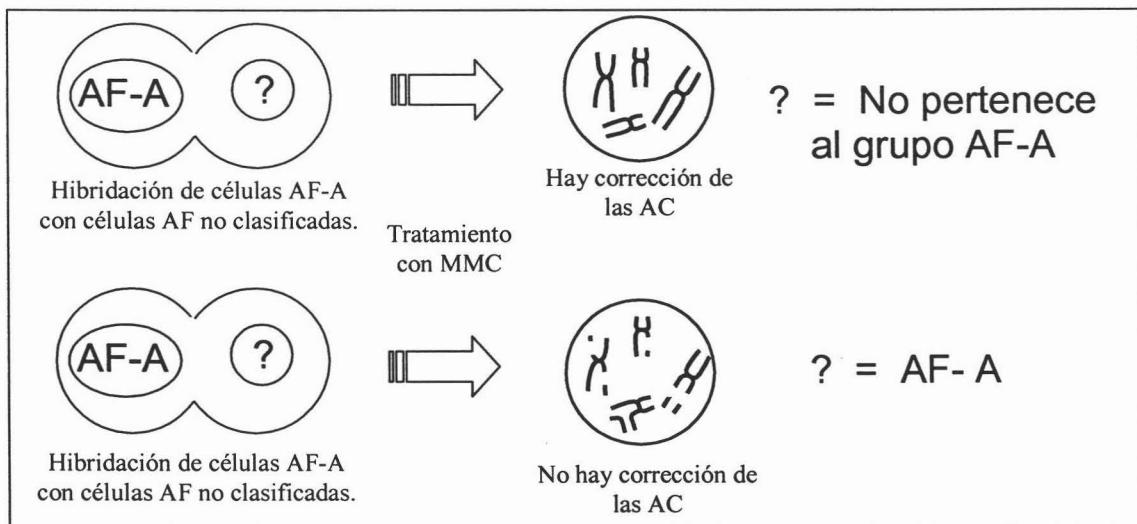


Figura 1. Los grupos de complementación se determinan mediante experimentos de hibridación de células AF de referencia internacional con células AF sin clasificar y son tratadas con agentes como la MMC, si hay complementación genética debido a la corrección del fenotipo, entonces la célula sin clasificar no pertenece al grupo de complementación de la célula conocida, mientras que si no hay complementación genética, entonces pertenece al mismo grupo de complementación que la célula conocida.

Características moleculares

De los doce grupos de complementación a la fecha se clonaron diez genes denominados: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI* y *FANCL*. Aunque en la mayoría de las proteínas AF la secuencia primaria de aminoácidos ya se reveló, la función de sus dominios se desconoce (Grompe M y D'Andrea A, 2001), sin embargo, se sabe que *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCL* y *FANCI* interactúan entre sí y forman un complejo proteico en respuesta al daño al ADN. De manera evolutiva *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF* y *FANCG* se encuentran conservados en los vertebrados, no así en los invertebrados, sin embargo se logró aislar la proteína *FANCD2* de la planta *Arabidopsis thaliana* y del insecto *Drosophila melanogaster* (Timmers *et al*, 2001). Esto indica que la vía de acción de *FANCD2* tiene una gran conservación evolutiva y que los demás genes AF se han incorporado tardíamente en la evolución de esta vía (Joenje H y Patel K, 2001).

El gen *FANCA* se clonó de manera independiente por clonación posicional, está localizado en 16q24.3 y consta de 43 exones (Wikjer *et al*, 1999). Las principales alteraciones encontradas en *FANCA* son grandes deleciones y mutaciones puntuales que producen proteínas truncadas (Joenje H y Patel K, 2001). La proteína *FANCA* consta de 1455 aminoácidos (Wikjer *et al*, 1999). El transporte nuclear de *FANCA* es complejo, pero se sabe que la región carboxilo terminal es necesaria ya que mutaciones de *FANCA* en HIII0P, R951Q y microdeleciones en 1263delF impiden que la proteína se acumule en el núcleo (Joenje H y Patel K, 2001).

Recientemente se encontró que uno de los componentes del complejo proteico AF denominados Polipéptidos Asociados a Anemia de Fanconi (PAAF) se trataba de FANCB llamado anteriormente PAAF95 y se localiza en el cromosoma X en la región p22.31, el producto FANCB tiene un peso molecular de 95 kDa (Meetei *et al*, 2004a) y se localiza en el núcleo bajo condiciones normales (Rahman N y Ashworth A, 2004).

El gen *FANCC* se localiza en el cromosoma 9q22.3, está integrado por 14 exones que codifican para un polipéptido de 558 aminoácidos (Strathdee *et al*, 1992). Se sabe que la proteína FANCC se une a cdc2 fosforilada en la región amino terminal y corrige la anomalía de la fase G2 del ciclo celular, pero se desconoce el mecanismo de acción (Kupfer *et al*, 1997b).

FANCD1/BRCA2 se localiza en el cromosoma 13 en la región 13q12.3 y está conformado por 27 exones (Rosselli *et al*, 2003), antes de su identificación se encontró que mutaciones en condición homocigota del gen *BRCA2* generaban consecuencias celulares parecidas a las AF, como la inestabilidad cromosómica e hipersensibilidad a agentes productores de enlaces cruzados (Witt E y Ashworth A, 2002); adicionalmente se detectaron mutaciones bialélicas de *BRCA2* en células provenientes del grupo de complementación AF-D1 y cuando se les agregó el gen *BRCA2* de tipo silvestre se observó una corrección en cuanto a la sensibilidad a MMC, por lo que se propuso a *BRCA2* como el gen *FANCD1*, actualmente denominado *FANCD1/BRCA2* (Howlett *et al*, 2002). *FANCD1/BRCA2* consta de 1451 aminoácidos (Timmers *et al*, 2001) y se piensa que una de sus funciones es transportar la proteína de recombinación de homólogos en el humano RAD51, al sitio de daño del ADN (Rosselli F *et al*, 2003).

El gen *FANCD2* se clonó con la combinación de los métodos de clonación posicional y complementación, la región donde se localiza es 3p22-26 con un intervalo de 200 Kb y 44 exones (Timmers *et al*, 2001). La proteína FANCD2 existe en dos isoformas; FANCD2-L (larga) y FANCD2-S (corta) con un peso molecular de 162 y 155 kDa, respectivamente, la versión larga está ubiquitinizada en la lisina 561 y mutaciones a este nivel traen como resultado la pérdida de la actividad de ubiquitinación, además de que FANCD2-L está ausente en los grupos de complementación AF-A, B, C, E, F y G, donde el complejo proteico es defectuoso (Garcia-Higuera *et al*, 2001).

FANCE está ubicado en 6p21.2-21.3 y las principales mutaciones descritas para este gen producen una proteína truncada (De Winter *et al*, 2000a). FANCE está compuesta de 536 aminoácidos y se sabe que interactúa fuertemente con la proteína FANCC ya que es necesaria para su acumulación nuclear (Taniguchi T y D'Andrea, 2002).

FANCF está localizado en 11p15, no tiene intrones y se han encontrado deleciones y substituciones que generan la ausencia de la proteína (De Winter *et al*, 2000a). La proteína FANCF está formada por 374 aminoácidos y tiene regiones altamente conservadas, una de las cuales es homóloga con la proteína procarionte de unión al ARN (ROM) cuya estructura tiene la forma α -helicoidal, lo cual sugiere que FANCF puede tener la capacidad de intervenir en los procesos de unión del ADN y/o ARN (De Winter *et al*, 2000b).

El gen *FANCG* se encuentra en 9p13 (De Winter *et al*, 1998), presenta varias mutaciones tales como deleciones y substituciones a las que se les confiere responsabilidad en los cuadros severos de la enfermedad, sin embargo se han encontrado mutaciones de sentido erróneo que resultan en cuadros clínicos no severos (Auerbach *et al*, 1999). La proteína FANCG es un polipéptido de 622 aminoácidos que al ser clonada resultó ser idéntica con la proteína XRCC9 del humano, por lo cual se denomina FANCG/XRCC9 (Auerbach A *et al*, 2003), está localizado tanto en núcleo como citoplasma y se ha demostrado su interacción con el citocromo P450E1 (CYP2E1) lo que sugiere que FANCG está relacionada en algunos aspectos del metabolismo redox (Futaki M *et al*, 2002). Además esta proteína cuenta con una serie de repetidos tetratricopéptidos que juegan un papel importante en la interacción proteína-proteína y en este caso intervienen en el ensamblaje y/o estabilidad al complejo proteico AF (Blom E *et al*, 2004).

El grupo de complementación AF-I fue identificado recientemente pero se desconoce la ubicación del gen, así como su producto proteico (Levitus *et al*, 2004).

El grupo de complementación AF-J se descubrió casi al mismo tiempo que AF-I, y se sabe que el gen *FANCI* antes llamado *BRIP1* se encuentra localizado en el cromosoma 17 entre la región q23.1 y q23.2 y codifica para la caja DEAH DNA Helicasa, que pertenece a la familia de las helicasas RecQ DEAH que pueden desenrollar estructuras de ADN del tipo no Watson-Crick como las uniones Holliday formadas durante la recombinación de homólogos o durante la resolución de las horquillas de replicación detenidas (Levitus *et al*, 2005).

El grupo de complementación AF-L también se descubrió recientemente y se sabe que el gen *FANCL* se localiza en el cromosoma 2 en la región p16.1 (Wanng X y D'Andrea A, 2004). Esta proteína ha sido llamada FANCL/PHF9 y tiene actividad de ubiquitin ligasa E3 sugiriendo con esto que es una subunidad catalítica para la monoubiquitinización de FANCD2 (Meetei *et al*, 2003).

Hasta el momento el último grupo de complementación descubierto es el AF-M y se trata de otro de los componentes del complejo proteico AF hasta entonces conocidos como PAAFs específicamente FAAP250 (siglas en ingles), es una fosfoproteína que puede ser hiperfosforilada en respuesta al stress genotoxico. Tiene dos formas una larga y otra corta, la versión larga puede sufrir modificaciones post-traduccionales en respuesta al daño al ADN o bloqueo en la replicación. Tiene regiones homólogas con otras proteínas como dos dominios funcionales importantes: helicasa y endonucleasa, aunque en FANCM no se ha observado la actividad de helicasa. Se proponen tres papeles importantes de la proteína FANCM: a) es parte estructural del complejo proteico AF, b) funciona como un motor para translocar el complejo AF a lo largo del ADN y c) al ser hiperfosforilada en respuesta al daño al ADN puede ser un transductor de señales con lo que puede regular la actividad del complejo AF (Meetei *et al*, 2005).

Tabla 1. Localización de los genes de los diferentes grupos de complementación.

Grupos de complementación	Genes	Localización	Exones	Tamaño (kDa)
AF-A	<i>FANCA</i>	16q24.3	43	163
AF-B	<i>FANCB</i>	Xp22.31	10	95
AF-C	<i>FANCC</i>	9q22.3	14	65
AF-D1	<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12.3	27	384
AF-D2	<i>FANCD2</i>	3p25.3	44	155
AF-E	<i>FANCE</i>	6p21-22	10	59
AF-F	<i>FANCF</i>	11p15	1	42
AF-G	<i>FANCG/XRCC9</i>	9p13	14	68
AF-I	--	--	--	--
AF-J	<i>FANCI</i>	17q23.1	18	--
AF-L	<i>FANCL</i>	2p16.1		43
AF-M	<i>FAAP250-FANCM</i>	----	----	----

Modificado de Rosselli *et al*, 2003, Digweed, 2003, Xiaozhe y D'Andrea, 2004 y Meetei *et al*, 2005.

Complejo AF

Las proteínas AF-A, B, C, E, F, G, L y M se asocian en un complejo proteico que se forma y activa como respuesta al daño al ADN para monoubiquitinar a FANCD2 que posteriormente, en foci nucleares sirve como señal de blanco a otras proteínas, una de las cuales es BRCA1 (por estudios de colocalización), se sabe que las células con BRCA1 mutado tienen una respuesta similar a las células AF cuando se induce daño con agentes que generan enlaces cruzados (Grompe M y D'Andrea A, 2001). No hay evidencia de interacción física entre FANCD2 y las otras proteínas AF, de hecho no es parte del complejo y no es requerida para su ensamblaje, sino que actúa como blanco (señalizadora) en pasos río abajo de la vía (García-Higuera *et al*, 2001). Algunos autores sugirieron que BRCA1 es un fuerte candidato para monoubiquitinar a FANCD2 ya que tiene un dominio ubiquitin-ligasa E3 (Howlett *et al*, 2002), sin embargo, en estudios recientes con células mutantes de FANCL y de BRCA1 mostraron

que en FANCL-mutante, FANCD2 no se asocia a la cromatina ni a la matriz nuclear al no ser monoubiquitinizado, mientras que en las células BRCA1-mutantes si hay asociación lo que indica que FANCD2 es monoubiquitinizada, por lo que se propone al producto FANCL como la ubiquitin-ligasa responsable de la monoubiquitinización de FANCD2 (Meetei *et al*, 2004b) (figura 2).

El daño al ADN activa la monoubiquitinización de FANCD2, mientras que FANCD1/BRCA2 actúa río arriba en la vía promoviendo el ensamblaje del complejo AF y/o río abajo por transducción de señales de las proteínas AF a RAD51 y la maquinaria de reparación por recombinación de homólogos (Howlett *et al*, 2002).

Todo esto indica que una parte de este complejo AF se transloca a la cromatina dentro de compartimientos en células que han sido expuestas a agentes que generan enlaces cruzados intercadena (Qiao *et al*, 2001), una vez que ha sido ensamblado en el citoplasma FANCD1/BRCA2, FANCD2 y BRCA1 participan en su activación en respuesta al daño al ADN (figura 2).

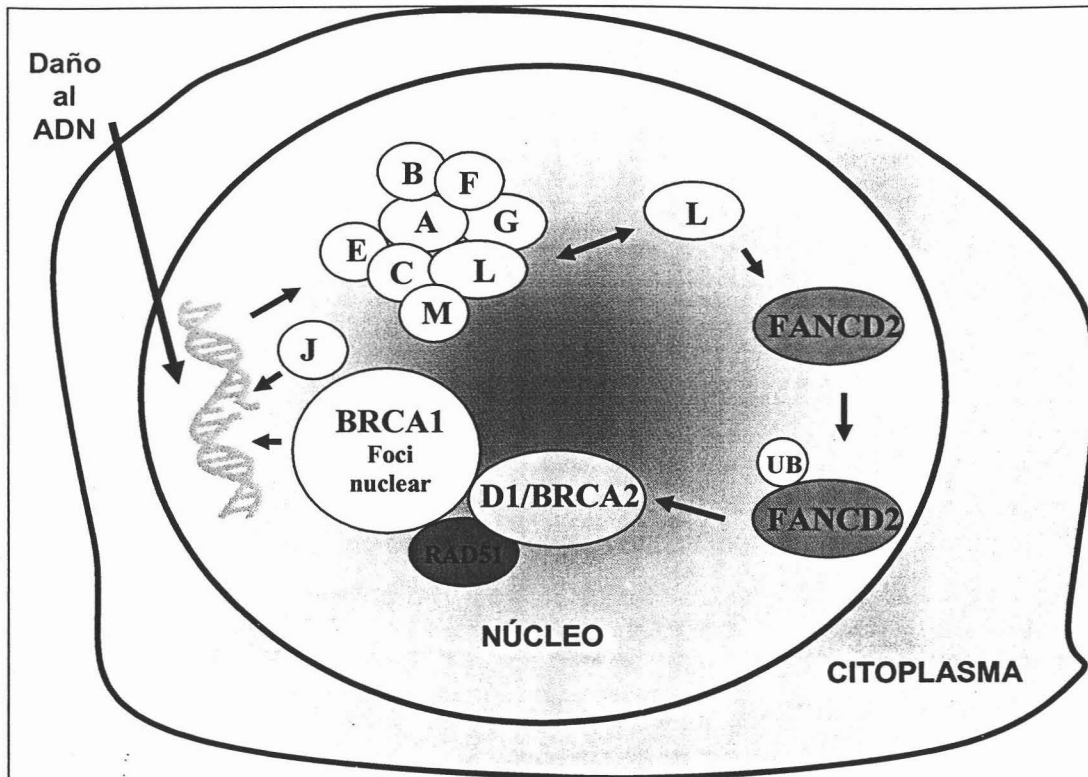


Figura 2. Muestra esquemática del complejo AF. El daño al ADN activa la asociación de las proteínas AF-A, B, C, E, F, G, M (amarillo) y L (naranja) para la formación del complejo AF en el que FANCL se encarga de monoubiquitinar a FANCD2 (verde). Esta proteína actúa como señalizador en foci nucleares interactuando con BRCA1 y otras proteínas de reparación del ADN. FANCD1/BRCA2 participa en el transporte y transducción de señales de proteínas de reparación como Rad50 y Rad51. Se sabe que FANCL es una helicasa que puede actuar directamente con el ADN y probablemente también en asociación con FANCM y BLM.

Alteraciones del ciclo celular AF

En 1982 Dutrillaux y colaboradores, encontraron una disminución significativa en el porcentaje de mitosis en células AF sin tratamiento, después del segundo ciclo de división en comparación con los controles normales. Adicionalmente se sabe que las células AF tienen un ciclo celular más largo con picos en G2/M, aumentando a casi el doble el número de células que transitan por G2 cuando se les compara contra las normales (Seyschab *et al*, 1993). Posteriormente se asumió que esta característica forma parte del fenotipo celular AF, pues al tratar a las células AF con agentes que generan

daño al ADN tales como la mostaza nitrogenada y MMC, el número de células en G2/M aumenta significativamente; por lo que esta respuesta ha sido empleada en el diagnóstico celular de la enfermedad.

Los estudios del ciclo celular y de apoptosis en células AF han aportado datos controversiales tales como que los grupos AF-A, B, C y D1 tienen una respuesta dosis-dependiente a incrementar el porcentaje de células apoptóticas cuando son tratadas con MMC, mientras que otros estudios revelan que la muerte celular inducida por la MMC en los grupos de complementación AF-A y D no es por la vía de la apoptosis sino por necrosis (Ridet *et al*, 1997). Recientemente se ha encontrado que algunas proteínas AF pueden actuar en un complejo con las proteínas BLM, ATM, BRCA1, XPF y el complejo MRE11-RAD50-NBS1 que responden al daño al ADN en los puntos de restricción del ciclo celular y/o en la reparación. Esto indica que la vía AF puede actuar en coordinación con los puntos de restricción del ciclo celular y la reparación del daño al ADN (Rosselli *et al*, 2003); sin embargo, se ha demostrado que por lo menos en las células AF-C el punto de restricción G2/M es normal y que la acumulación de éstas células se debe a un daño excesivo del ADN (Heinrich *et al*, 1998).

II ANTECEDENTES

Sensibilidad al Oxígeno

Se sabe que niveles altos de oxígeno en las células normales afecta el tránsito de la fase G2 de forma similar al comportamiento del ciclo celular de las células AF (Balin *et al*, 1978). Estudios posteriores mostraron que el número de AC en linfocitos AF aumenta considerablemente cuando se encuentran expuestos a altas concentraciones de oxígeno con una relación dosis-dependiente (Joenje *et al*, 1981), además de una detención y/o retraso en la fase G2 del ciclo celular (Joenje H y Patel K, 2001), por lo que se piensa que las células AF son muy sensibles a los radicales libres producidos por el metabolismo del oxígeno; aunque se ha observado que la superóxido dismutasa (SOD), una de las enzimas encargadas de la detoxificación de especies reactivas de O₂, es normal en células AF (Yoshimitsu *et al*, 1984) y los valores de ésta enzima en actividad siempre están sobre el límite normal (Mavelli I *et al*, 1982).

Los agentes denominados xenobióticos generan especies reactivas de oxígeno como resultado del procesamiento normal de las células (Pagano G *et al*, 2003), estos pueden ser: el radical libre superóxido, peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno no molecular y pueden producir daño por interacción directa con la cromatina o por lipoperoxidación cuyos productos pueden dañar a la cromatina, pero también de forma indirecta por la alteración a las enzimas de reparación del ADN (Joenje *et al*, 1981). De forma alternativa se sabe que los aldehídos reactivos formados por la oxidación de aminoácidos o proteínas, pueden ser los productores de los enlaces cruzados del ADN con exociclina o el nitrógeno de la guanina (Costa *et al*, 1996).

La MMC es un agente alquilante bifuncional y cuando entra a la célula, se activa por enzimas se transforma y genera metabolitos alquilantes altamente reactivos (Doroshov, 1992), esta acción está regulada por enzimas reductoras como la NADPH citocromo-P450 reductasa (RED); por otro lado se sabe que la MMC causa apoptosis en células AF-C en condiciones normales de oxígeno, mientras que en condiciones de hipoxia no induce apoptosis aunque prevalecen los enlaces cruzados (Clarke *et al*, 1997). Investigaciones posteriores con MMC y Diepoxibutano (DEB) demostraron que ambos tienen una actividad tóxica de manera oxígeno-dependiente, por lo que se piensa que existe una relación entre los mecanismos redox celulares y el fenotipo AF (Pagano G, 2000).

Ribonucleótido reductasa

Dentro de los procesos de síntesis de ADN participan varias moléculas para la generación de la materia prima de este proceso, una de las cuales son los 2´desoxirribonucleótidos difosfato que al fosforilarse generan 2´desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP). Los dNTPs se sintetizan a partir de una reducción del carbono 2 de la pentosa de los ribonucleótidos difosfato, la ribonucleótido reductasa (RNR) es la enzima que realiza esta reacción para obtener 2´desoxirribonucleotido difosfato. La RNR está constituida de cuatro subunidades ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$) que forman los dímeros M1 y M2, la región enzimática se encuentra en el dímero M2 pues contiene un grupo hierro no hemo además de un radical tirosil (Reichard P y Ehrenberg A, 1983). Cuando la RNR es afectada, los dNTPs disminuyen con lo que la síntesis de replicación programada (fase S) y de reparación no programada disminuyen, aún cuando el daño

sea mínimo se producen AC en sitios del ADN que están bajo reparación en la fase G2 del ciclo celular (Erixon K y Ahnström G, 1979).

Hidroxiurea

La hidroxiurea (HU) es un compuesto químico relativamente simple (NH_2CONHOH) (Hanft, *et al* 2000), es una droga con potencial biológico antineoplásico y se usa como tratamiento en gran variedad de enfermedades hematológicas y neoplásicas (Donehower, 1992; Kennedy, 1992). Desde que se descubrió que la HU actuaba en contra de células con leucemia se han realizado experimentos para demostrar la capacidad que tiene de inhibir la síntesis de ADN sin que ésta afecte la transcripción o traducción. La HU actúa sobre la RNR inactivando a la subunidad M2 de la siguiente manera: la HU tiene un radical libre que atrapa exclusivamente al radical tirosil de la RNR, no modifica el grupo hierro pero la enzima pierde su función en la síntesis de dNTPs (Reichard P y Ehrenberg A, 1983; Yarbrow, 1992). El uso de esta droga es efectivo pues sólo actúa en células que realizan síntesis activa de ADN ya que causa un desabasto de los dNTPs en la célula debido a la inactivación de la RNR (Schilsky *et al*, 1992). Por otro lado la HU tiene la capacidad de generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como resultado de su bioactivación que puede dañar directamente al ADN o reaccionar con otras especies reactivas de O_2 y formar radicales libres que también dañan al ADN (Desesso *et al*, 1994).

En células de la planta *Vicia faba* en la fase S/G2 la HU produce rupturas isocromatídicas, cromatídicas y translocaciones incompletas (Hartley-Asp, *et al* 1980) y se ha demostrado que la mayoría de las aberraciones coinciden con los patrones de ICH,

en las cromátidas unifilarmente substituidas con bromodesoxiuridina (Lindenhahn M y Schubert I, 1983). En la AF se ha demostrado también que la HU disminuye la síntesis de ADN en linfocitos sin clasificar en grupos de complementación (Frias *et al*, 1996) e incrementa de manera significativa la frecuencia de AC en linfoblastos AF- A, B, C, D1, E y células normales cuando se adiciona en fase S tardía y/o G2. Por otro lado en el laboratorio se ha observado que la HU incrementa de dos a tres veces el daño al ADN causado por la MMC en células AF-A y AF-B. Con estos resultados se piensa que la acción de la HU en células AF puede afectar la reparación al disminuir la cantidad de dNTPs necesarios en este proceso post-replicativo, o bien que la activación de la HU genera radicales libres que dañan al ADN. En un trabajo anterior se encontró que el incremento de las AC en células AF-A y AF-B no está relacionado con la acción de los radicales libres generados por la HU (Legarreta, 2001).

Catalasa

Dentro de los peroxisomas se encuentra la catalasa (CAT) que es una enzima de 250 kDa, esta compuesta de cuatro subunidades con un grupo hemo y un NADH. Se considera una de las enzimas más eficientes de su clase en cuanto a su acción desintoxicante de H₂O₂ al transformarlo en oxígeno molecular y agua. Debido a su acción se emplea en cultivos celulares con el objetivo de evaluar su capacidad desintoxicante al agregar especies reactivas de oxígeno, y ha probado ser muy eficiente en linfocitos humanos (Anderson *et al*, 1994) y en células CHO (Testoni *et al*, 1997). Como se mencionó anteriormente las células AF son sensibles a los radicales libres y altas concentraciones de oxígeno, con la finalidad de demostrar la acción de los radicales libres se ha empleado a ésta enzima como un colector de los mismos,

demostrándose que la adición de CAT a cultivos de células AF sin clasificar y sin tratamiento resulta en una disminución de AC (Nordenson, 1977), sin embargo, cuando las células se tratan con MMC, se observa una disminución de la frecuencia de micronúcleos sólo cuando la CAT es agregada al inicio del cultivo (Raj y Heddle, 1980), aunque también hay reportes en los que la CAT no tiene un efecto significativo en la protección antioxidante en fibroblastos AF (Gille JJ *et al*, 1987). Estos hallazgos muestran que la CAT disminuye la cantidad de daño en células AF y la variabilidad observada en cuanto a la respuesta se debe al tipo de tratamiento y/o al tipo celular que se estudia.

En un experimento previo se determinó la capacidad de la CAT para disminuir el daño al ADN producido por el H₂O₂ en linfocitos por medio de la técnica de electroforesis unicelular (ensayo COMETA), encontrando que la CAT disminuye el daño al ADN a una concentración de 250 U/ml.

JUSTIFICACION

Como ya se ha mencionado, la HU incrementa significativamente el daño al ADN causado por la MMC, se piensa que esto puede deberse a que la HU inactiva a la RNR y la cantidad de dNTP's necesarios en la reparación del ADN disminuye o bien, por la generación de H_2O_2 que daña al ADN. Es necesario conocer cual de las dos probables vías que tiene la HU, es la responsable para incrementar el daño en las células AF; por medio de la adición de CAT, cuya capacidad desintoxicante de especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 ya ha sido probada, se podrá determinar si la generación de radicales libres producto de la activación de la HU es un factor importante. Se ha probado que en los grupos de complementación AF-A y AF-B los radicales libres no son un factor significativo en la producción de AC, sin embargo es necesario conocer cual es el efecto de la HU en cada grupo de complementación, debido a la heterogeneidad del padecimiento. Por otro lado el defecto básico de la AF no se conoce por lo que es necesario realizar experimentos que conduzcan a su esclarecimiento.

OBJETIVO

Determinar si las aberraciones cromosómicas producidas por la HU en las líneas linfoblastoides AF-C, AF-D1 y AF-E en la fase G2, disminuyen con la aplicación de catalasa en el cultivo celular.

HIPÓTESIS

Si el incremento de aberraciones cromosómicas producido por la HU se debe a la producción de radicales libres, entonces al adicionar un atrapador de radicales libres como la catalasa, la frecuencia de aberraciones cromosómicas disminuirá significativamente.

METODOLOGÍA

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas linfoblastoides de los grupos de complementación AF- C (HSC536), AF-D1/BRCA2 (HSC62N), AF-E (VU130) y una línea normal NL-6846 transformada en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría por infección de linfocitos de un individuo normal con el virus Epstein-Barr. Las líneas linfoblastoides se cultivaron en botellas de cultivo (NUNC) con medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (GIBCO) al 10%, L-Glutamina (GIBCO) al 1%, piruvato (GIBCO) al 1%, aminoácidos no esenciales (GIBCO) al 1% y gentamicina (GIBCO) al 1%. El suero fetal bovino se inactiva a 56 °C durante treinta minutos. Las líneas celulares se mantuvieron en incubación a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Diseño experimental

Para cada línea linfoblastoide se realizó viabilidad celular por el método de exclusión con Azul Tripano (SIGMA) en un hemocitómetro, sólo se utilizaron los cultivos con una viabilidad igual o mayor al 90%, se sembraron ocho cultivos en tubos estériles de 11 ml de capacidad (NUNC); con 1,500,000 células en un volumen de 5 ml de medio RPMI suplementado. A la mitad de los cultivos se les agregó MMC (Sigma) a una concentración de 10 ng/ml (figura 3). Después de 24 horas de incubación con el clastógeno, se realizaron dos lavados con solución salina Hank's (GIBCO) a los cultivos con MMC y un lavado a los cultivos sin MMC; las células fueron reincubadas con 5 ml de medio RPMI suplementado durante 21 hrs más, posteriormente se agregó HU 2 mM (Amersham) y CAT 0.6 mg/ml (Sigma) a los tubos correspondientes (figura 3), una hora después se adicionó Colcemida (Sigma) 1.6 µg/ml. Con la finalidad de asegurar que las células obtenidas en metafase estuvieran expuestas a la HU y la CAT solamente durante la fase G2, se agregaron tres horas antes de la cosecha. Este experimento se realizó por triplicado para cada línea celular.

Cosecha

La cosecha se realizó agregando Colcemida (Sigma) 1.6 µg/ml durante las 2 últimas horas del experimento para obtener células en metafase, posteriormente se centrifugaron a 400g durante 10 min se eliminó el sobrenadante y se agregó 10 ml de solución hipotónica de KCL 0.075M (MERCK), se incubó a 37°C durante 10 min. Se prefijó con 1 ml de solución fijadora Carnoy (metanol - ácido acético 3:1) (MERCK) se homogenizó y se centrifugó a 400g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se fijaron los paquetes celulares con 5ml de fijador. Finalmente se realizaron tres lavados que consistieron en resuspender el paquete celular y agregar fijador nuevo hasta obtener un botón limpio.

Laminillas y Tinción

Se hicieron laminillas de cada uno de los 8 diferentes cultivos de cada repetición, mediante el goteo de la solución concentrada de células fijadas, en laminillas previamente lavadas y frías. Se etiquetaron y se maduraron en estufa a 37 °C para eliminar la humedad. Para teñir las laminillas se utilizó el colorante Giemsa (GIBCO) en buffer de fosfatos al 10% pH 6.8 durante 3 min, posteriormente fueron codificadas por una persona ajena al estudio para evitar el sesgo durante su análisis.

Análisis

Se realizó un análisis de las AC cuantificando la frecuencia de rupturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos céntricos, acéntricos y dicéntricos, anillos y figuras radiales. Por cada tratamiento y repetición se analizaron 50 metafases y se calculó la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

Para el análisis de los resultados se comparó la frecuencia de AC dentro de la misma línea y también entre las diferentes líneas, mediante la utilización de la prueba no paramétrica U de Mann Whitney (U de M-W). Se consideraron diferencias significativas con $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Línea normal 6846

En los cultivos de la línea Normal se encontró que la frecuencia de AC en el cultivo control no es diferente a la de los cultivos tratados con CAT. Al adicionar HU la frecuencia de AC aumentó de manera significativa ($p = 0.02$). En el cultivo tratado con HU y CAT se observó que las AC disminuyeron de manera significativa ($p = 0.02$) con respecto al cultivo que sólo se trató con HU (tabla 2). Cuando se adicionó MMC se incrementaron las aberraciones cromosómicas significativamente ($p = 0.02$) con respecto a las AC del cultivo control, de igual forma aumentó la frecuencia de AC en el cultivo MMC+CAT al ser comparado con el tratamiento MMC. En los cultivos tratados con MMC+HU se observó un incremento del doble de las AC que causa la MMC por si sola. Por otro lado la CAT no mostró ningún efecto pues la frecuencia de AC de los cultivos tratados con MMC+HU+CAT no fue significativamente diferente que en el cultivo MMC+HU.

Tabla 2. Frecuencia de AC de la línea Normal (6846)

Tratamiento	1°	2°	3°	Promedio	Desv est
Control	0.08	0.05	0.04	0.06 ^a	0.02
CAT	0.08	0.04	0.04	0.05	0.02
HU	0.32	0.24	0.22	0.26 * ^a	0.05
HU+CAT	0.16	0.1	0.16	0.14 *	0.03
MMC	0.16	0.15	0.12	0.14	0.02
MMC+CAT	0.24	0.28	0.21	0.24	0.04
MMC+HU	0.28	0.36	0.27	0.30	0.05
MMC+HU+CAT	0.32	0.45	0.31	0.36	0.08

(α) $p = 0.02$. (*) $p = 0.02$.

AF-C HSC536

En el cultivo con CAT hay una frecuencia de AC menor que en el cultivo control, aunque la diferencia entre estos dos tratamientos no es significativa. La HU genera un incremento aunque no significativo de las AC con respecto a las del cultivo control. En el cultivo con HU+CAT se observó que la CAT disminuye la frecuencia de AC que genera la HU aunque no de forma significativa (tabla 3). Por otro lado en los cultivos tratados con MMC se observó un incremento de tres veces la frecuencia de AC con respecto a la del cultivo control ($p = 0.02$). En el tratamiento con MMC+CAT hay una frecuencia similar a la observada en el cultivo con MMC. Cuando se adicionó HU el daño se incrementó significativamente ($p = 0.02$) con respecto al daño generado por la MMC. Al comparar los cultivos CAT contra MMC+HU+CAT se encontró que no existen diferencias significativas.

Tabla 3. Frecuencia de AC de la línea AF-C (HSC536)

Tratamiento	1°	2°	3°	Promedio	Desv est
Control	0.68	0.16	0.21	0.35	0.29
CAT	0.28	0.28	0.28	0.28	0.00
HU	1.2	0.48	0.63	0.77	0.38
HU+CAT	0.36	0.48	0.4	0.41	0.06
MMC	1.2	1.08	1.1	1.13 *	0.06
MMC+CAT	1.52	0.8	1.3	1.21	0.37
MMC+HU	2.44	2.24	2.32	2.33 *	0.10
MMC+HU+CAT	2.96	2.52	2.56	2.68	0.24

(*) $p = 0.02$.

AF-D HSC62N

El cultivo tratado con CAT mostró una frecuencia de AC muy similar a la del cultivo control. La HU aumentó las aberraciones cromosómicas con respecto a las del control aunque no de manera significativa (tabla 4). Cuando se adicionó CAT y HU no hay una disminución en la frecuencia de AC generada por la HU. En general todos los cultivos que fueron tratados con MMC incrementaron significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas ($p \leq 0.02$). La MMC por si sola generó un daño significativamente mayor ($p = 0.02$) al ser comparado con el cultivo control. Cuando se adicionó MMC+CAT hubo un aumento no significativo de aberraciones con respecto al tratamiento de MMC sola. En las células tratadas con MMC y HU se observó un aumento en la frecuencia de AC de más del doble ($p = 0.02$) con respecto al cultivo con MMC (tabla 4). El cultivo tratado con MMC+HU+CAT mostró una disminución en la frecuencia de AC comparado con el tratamiento MMC+HU pero no de manera significativa.

Tabla 4. Frecuencia de AC de la línea AF-D (HSC62N)

Tratamiento	1°	2°	3°	Promedio	Desv est
Control	0.06	0.44	0.56	0.35	0.26
CAT	0.12	0.7	0.46	0.43	0.29
HU	0.5	1.62	0.84	0.99	0.57
HU+CAT	0.38	1.3	1.66	1.11	0.66
MMC	3.76	4.52	2.58	3.62 *	0.98
MMC+CAT	2.4	5.4	5.14	4.31	1.66
MMC+HU	8	8.94	10.24	9.06 *	1.12
MMC+HU+CAT	4.6	9.98	10.44	8.34	3.25

(*) $p = 0.02$.

AF-E VU130

En las células tratadas con CAT no se observó daño cromosómico, mientras que las células tratadas con HU las AC se incrementaron con respecto al cultivo control. En el cultivo tratado con MMC se observó un incremento significativo ($p = 0.02$) en la frecuencia de AC con respecto a la frecuencia del control. La adición de CAT no modificó significativamente la frecuencia de AC en los cultivos tratados con HU, MMC y MMC+HU.

Tabla 5. Frecuencia de AC de la línea AF-E (VU130)

Tratamiento	1°	2°	3°	Promedio	Desv est
Control	0.14	0.3	0.44	0.29	0.15
CAT	0.26	0.22	0.32	0.27	0.05
HU	0.74	0.72	0.36	0.61	0.21
HU+CAT	0.72	0.8	0.8	0.77	0.05
MMC	2.06	1.94	2.64	2.21 *	0.37
MMC+CAT	2.56	2.12	3.56	2.75	0.74
MMC+HU	6.03	6.26	4.48	5.59 *	0.97
MMC+HU+CAT	7.84	5.62	6.48	6.65	1.12

(*) $p = 0.02$.

Respuesta general

De manera espontánea las aberraciones cromosómicas que se encontraron en la línea Normal fueron significativamente menores ($p \leq 0.04$) en comparación con las observadas en las líneas AF-C, D1 y E; así mismo no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de AC espontáneas entre las líneas AF analizadas. Tanto en la línea Normal como en las AF el tratamiento con CAT produjo una frecuencia de AC similar a la observada en los cultivos control.

En todas las líneas estudiadas la HU generó un incremento de AC, aunque solo en la línea Normal este aumento es significativo ($p = 0.02$) y el efecto de disminución de AC producido en el tratamiento HU+CAT, a diferencia de las líneas AF, en la línea Normal fue significativo ($p = 0.02$).

La MMC incrementó significativamente la frecuencia de AC en todas las líneas estudiadas, sin embargo, la frecuencia de AC observada en las líneas AF es significativamente mayor que en las Normales.

Por otro lado el tratamiento con HU a las células previamente tratadas con MMC mostraron un incremento significativo de las AC ($p \leq 0.02$), pero el nivel de daño fue diferente, la línea normal mostró la frecuencia más baja (0.3 ab/cel) mientras que AF-D1 fue la más alta (9.06 ab/cel).

La CAT solo disminuyó significativamente ($p = 0.02$) la frecuencia de AC generadas por la HU en la línea Normal (tabla 2). Cuando se adicionó CAT a las líneas normal y AF tratadas con MMC y HU no hubo disminución significativa de AC aunque

la respuesta observada es diferente en cuanto al grado de daño en donde AF-D1 y AF- E fueron significativamente más sensibles ($p \leq 0.02$) que la línea AF-C y la línea normal (figura 4).

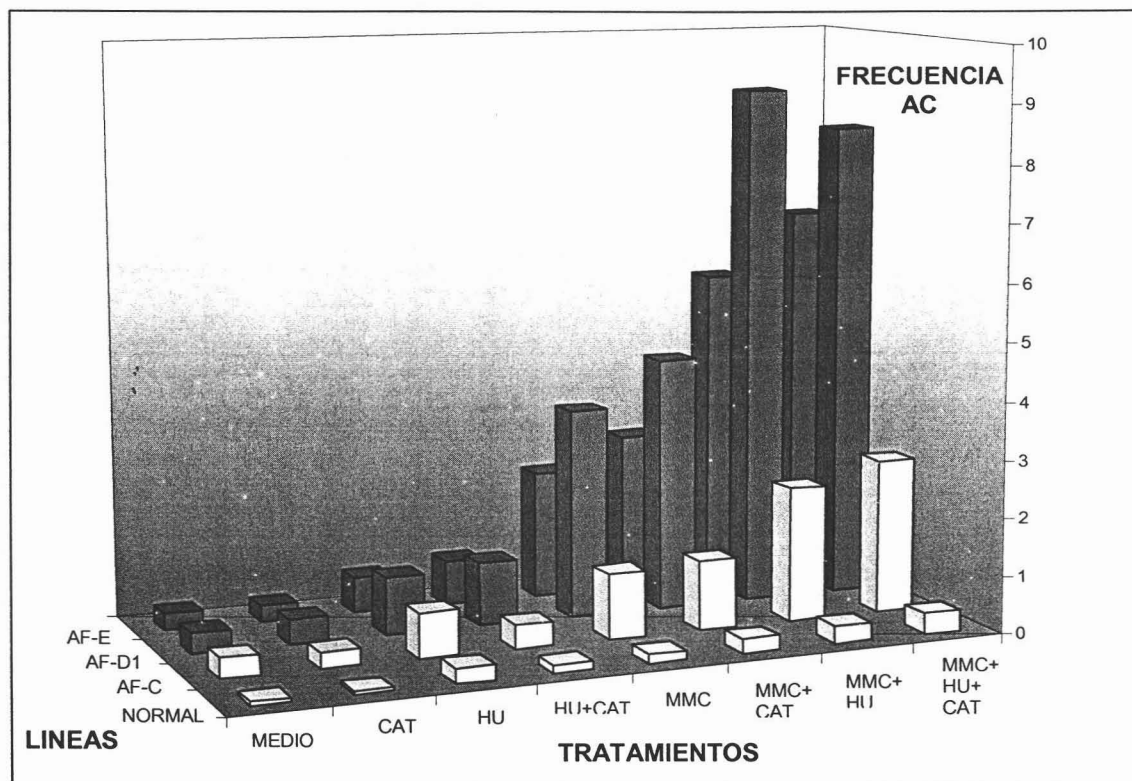


Figura 4. Muestra los promedios de las frecuencias de las AC de las tres líneas AF y la línea normal, la línea AF-D1 es significativamente más sensible que AF-E y AF-C ($p \leq 0.02$), la línea normal es la menos sensible.

DISCUSION

En el presente trabajo se evaluó si el aumento de las AC que genera la HU en las células, se debe principalmente a la generación de radicales libres de oxígeno producidos por la activación de la HU, mediante la adición de CAT que es un excelente colector de éstos radicales, los resultados mostraron que en las líneas AF la CAT no disminuyó la frecuencia de AC.

Tanto las AC espontáneas como las inducidas con MMC en las líneas AF-C, D1 y E son significativamente mayores que en la línea normal 6846, lo cual es congruente con lo que ha sido reportado en la literatura (Sasaki y Tonomura, 1973; Schroeder, 1964) ya que ésta sensibilidad a la MMC es una característica fenotípica constante de las células AF por lo que incluso se utiliza para el diagnóstico citogenético. Existe una diferencia en cuanto a la sensibilidad de las líneas AF estudiadas en la respuesta a los tratamientos, la línea con mayor daño es AF-D1 seguida por la línea AF-E y con menos daño la línea AF-C (figura 4), esto probablemente se debe a la heterogeneidad genética propia del padecimiento (Zakrzewski y Sperling, 1980; Duckworth-Rysiecki *et al*, 1985) ya que al estar afectados diferentes genes para cada una de las líneas el defecto en la vía de reparación del ADN está a diferentes niveles.

Las células AF son muy sensibles a las fluctuaciones de oxígeno aún cuando las enzimas protectoras del daño oxidativo como la CAT y SOD no están afectadas (Schindler D y Hoehn H, 1988). Aunque se sabe que algunos agentes denominados xenobióticos generan especies reactivas de oxígeno como resultado del procesamiento normal de las células (Pagano G *et al*, 2003), no está claro como es que estos agentes

podrían generar AC (Pagano G y Youssoufian H, 2003; Joenje H y Gille, 1989; Smith J *et al*, 1998). Uno de estos compuestos es la HU que al entrar en la célula puede generar H_2O_2 como producto de su activación además de tener actividad genotóxica.

En nuestros resultados la HU por si sola generó un incremento de las AC en las células AF aunque dada la variabilidad en la respuesta éste no fue significativo (figura 4), en el caso de la línea normal el incremento de AC si es significativo (tabla 2), esto puede deberse a que la acción de la HU es dependiente de la dosis (Erixon K y Ahnström G, 1979) de tal manera que la dosis utilizada en este trabajo afecta la síntesis de las células normales lo suficiente como para registrar un incremento de AC con respecto a las basales, pero en el caso de las líneas AF el índice de AC espontáneo es significativamente más alto que en las normales, por lo que el efecto de la HU es apenas perceptible, y la HU suministrada no afecta de manera significativa a las células AF, probablemente por que en éstas células existen otros factores involucrados con la inestabilidad cromosómica con un efecto sumatorio. En este sentido el efecto protector de la CAT en los cultivos que fueron tratados con HU sola tampoco sería perceptible, lo cual se aprecia en nuestros resultados de las líneas AF-C, D1 y E (tablas 3, 4 y 5).

La línea normal mostró una frecuencia de AC muy similar entre el tratamiento con HU y MMC+HU (tabla 2), sin embargo, y de manera interesante la CAT disminuye la frecuencia de AC en los cultivos tratados con HU sola, mientras que no lo hace en las células tratadas con MMC+HU donde incluso se observó un incremento de AC, lo que demuestra que al menos en la línea normal los radicales libres no tienen un efecto significativo en la generación de AC cuando las células han sido tratadas previamente con MMC.

Por otro lado la HU aumenta significativamente la frecuencia de AC en las líneas AF cuando éstas han sido tratadas previamente con MMC y con la adición de CAT no disminuyó. Esto hace pensar que la HU tiene un efecto que no puede ser contrarrestado por la CAT cuando existe un daño previo como el que genera la MMC lo que podría indicar que este incremento en el daño se debe a la falta de nucleótidos. Esta respuesta celular a la HU y MMC es consistente con los resultados de un trabajo previo con las líneas AF-A y AF-B (Legarreta, 2001) en el cual la CAT tampoco disminuyó la frecuencia de AC, sin embargo difieren con lo reportado por otros autores donde la CAT si disminuyó eficientemente las AC en linfocitos no tratados con agentes clastogénicos (Anderson *et al*, 1994). En células AF tratadas con MMC se ha demostrado la efectividad de la CAT y SOD para desintoxicar de especies reactivas de oxígeno como el O_2^- que es el producto de la conversión del H_2O_2 disminuyendo la frecuencia de AC (Sudharsan R y Heddle J, 1980; Emerit *et al*, 1982), aunque en este último trabajo adicionan la CAT antes del tratamiento con agentes oxidantes por lo que la CAT podría actuar contra las especies reactivas de oxígeno antes de que éstas actúen sobre el ADN. La diferencia con este trabajo principalmente está dada porque nosotros adicionamos la HU y CAT al mismo tiempo y en la fase G2 a células AF que previamente fueron dañadas con MMC. Cabe mencionar que un trabajo similar no se ha realizado.

Una de las razones por la que la CAT podría no haber disminuido la frecuencia de AC, es que al tratarse de una molécula demasiado grande (250 kDa), la CAT no logró penetrar fácil y rápidamente al interior de una célula viva, hay reportes en los que se demuestra que la adición de CAT por sí sola no protege del daño oxidativo a células vivas de cerebro de rata, pero cuando se conjuga la CAT con el anticuerpo mAb 3E10

éste es capaz de permitir la permeabilidad del conjugado y proteger del daño oxidativo a células vivas (Weisbart R *et al*, 2000). La HU se activa y actúa en el interior de la célula, de tal forma que si la CAT no puede permear al interior de la célula o lo hace de forma más lenta que la HU, no podría ejercer su efecto protector de manera eficiente contra los metabolitos reactivos resultantes del procesamiento de la HU. Sin embargo, en la línea Normal la CAT disminuyó significativamente la frecuencia de AC que genera la HU lo cual indica que la CAT puede disminuir los radicales libres pero éstos no tienen un efecto significativo en el elevado incremento de las AC.

De acuerdo con la hipótesis de este trabajo, entonces la HU podría incrementar el daño a través de otra vía que no es la generación de radicales libres. Se sabe que la HU destruye el radical libre B2 de la RNR con lo que la inactiva (Reichard P y Ehrenberg A, 1983) y la cantidad de dNTP's necesarios para la reparación (síntesis no programada), por lo que en éste trabajo podría ser ésta la causa del aumento en la frecuencia de AC. Un aspecto interesante es que para las líneas D1 y E la HU tiene un efecto sinérgico en cuanto al daño producido por la MMC (tablas 4 y 5) por lo que este daño no solo se debe a la falta de dNTPs necesarios para la reparación sino que se generó aún más daño. Existen estudios con HU en los que se ha concluido que la disminución de dNTP's que impide el proceso de sellado de la cadena de ADN no es concomitante con el daño, cuando éste es inducido para formar enlaces cruzados (Erixon K y Ahnström G, 1979).

Todo esto parece indicar que la generación de radicales libres y la inhibición de la RNR por la HU, no son los únicos factores en el incremento del daño en células que han sido tratadas con MMC, sino que la HU afecta directamente los procesos de

replicación, reparación o indirectamente en el funcionamiento del complejo proteico AF.

Se sabe que cuando el ADN tiene enlaces cruzados, durante la replicación las horquillas se estancan y posteriormente se colapsan (Rothfuss A y Grompe M, 2004). Un elemento que está involucrado en la estabilidad de la horquilla de replicación cuando ésta se detiene, es la proteína Swi1 que no es parte indispensable para la elongación de la horquilla, pero si en su estabilidad ante un colapso (Noguchi E *et al*, 2003; Rothfuss A y Grompe M, 2004). Se ha probado que en presencia de HU la proteína Swi1 no se asocia a la horquilla (Noguchi E *et al*, 2003), con lo que pierde estabilidad generando más rupturas en el ADN. En este trabajo la HU se adicionó en fase S/G2 por lo que las células que lograron transitar por la fase S con un daño inducido con MMC necesitan reparar este daño, hasta el momento no se sabe cual es el tipo de reparación que esta alterada en las células AF, sin embargo es aceptable que cualquiera que sea necesita reestablecer la estructura e información de la cadena dañada lo cual puede suceder mediante la síntesis de ADN, pero en presencia de HU la proteína Swi1 no se asocia a la horquilla de replicación con lo que la frecuencia de AC generadas por la MMC se incrementarían de manera significativa en presencia de HU (figura 4).

Estas evidencias sugieren que la HU además de afectar al ADN indirectamente por la generación de radicales libres e inhibir a la RNR, podría intervenir directamente con los mecanismos de reparación en los procesos de síntesis y recombinación de homólogos, de tal manera que el incremento de AC observado en la líneas AF- C, D1 y E tratadas con MMC y HU es significativamente mayor que el daño que genera la MMC.

Finalmente la CAT es demasiado grande como para asegurar en este trabajo que logró penetrar eficientemente en las células vivas, sin embargo existe la posibilidad de realizar nuevos experimentos utilizando anticuerpos como el mAb 3E10 para facilitar la permeabilidad de la CAT.

CONCLUSIONES

Existe una diferencia en la sensibilidad a la MMC y HU en las líneas celulares AF-C, AF-D1 y AF-E, no obstante, la respuesta de las tres líneas a todos los tratamientos tiene un comportamiento similar.

La HU no incrementa por la vía de los radicales libres, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células tratadas con MMC.

La HU puede estar generando el incremento de AC de manera indirecta por el desabasto de dNTP's y/o de forma directa en los procesos de reparación afectando la estabilidad de la horquilla de replicación.

Finalmente la CAT es demasiado grande como para asegurar en este trabajo que logró penetrar eficientemente en las células vivas, sin embargo existe la posibilidad de realizar nuevos experimentos utilizando anticuerpos como el mAb 3E10 para facilitar la permeabilidad de la CAT.

CONCLUSIONES

Existe una diferencia en la sensibilidad a la MMC y HU en las líneas celulares AF-C, AF-D1 y AF-E, no obstante, la respuesta de las tres líneas a todos los tratamientos tiene un comportamiento similar.

La HU no incrementa por la vía de los radicales libres, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células tratadas con MMC.

La HU puede estar generando el incremento de AC de manera indirecta por el desabasto de dNTP's y/o de forma directa en los procesos de reparación afectando la estabilidad de la horquilla de replicación.

REFERENCIAS

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

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

Auerbach A and Allen R (1991) Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients: a review of the literature and report of international Fanconi anemia registry. *Cancer Genet*. 51: 1-12.

Auerbach A, Buchwald M, Joenje H (1997). Fanconi anemia. In: Vogelstein B. and Kinzler KW. The Genetics Basis of Human Cancer. Mc Graw Hill. U.S.A. pp317-332.

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

Auerbach A, Greenbaum J, Pujara K, Batish SD, Bitencourt MA, Kokemohr I, Schneider H, Lobitz S, Pasquini R, Giampietro PF, Hanenberg H, Levran O; International Fanconi Anemia Registry (2003) Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat*. 21(2):158-168.

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

Blom E, van de Vrugt HJ, de Vries Y, de Winter JP, Arwert F and Joenje H (2004) Multiple TPR motifs characterize the Fanconi anemia FANCG protein. *DNA Repair* 1: 77-84.

Clarke, A, Philpott, N, Gordon-Smith E, Rutherford T (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: 240-247.

Costa M, Zhitkovich A, Gargas M, Paustenbach D, Finley B, Kuykendall J, Billings R, Carlson T, Wetterhahn K, Xu J, Patierno S, Bogdanffy M (1996) Interlaboratory validation of a new assay for DNA-protein crosslinks. *Mutat Res* 369: 13-21.

De Winter J, van der Weel L, de Groot J, Stone S, Waisfisz Q, Arwert F, Scheper R, Kruyt F, Hoatlin M, Joenje H (2000a) The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Hum Mol Genet* 9: 2665-2674.

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

De Winter JP, Rooimans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H (2000b) The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet.* 24(1): 15-16.

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

Donehower RC (1992) An overview of the clinical experience with hydroxyurea. *Semin. Oncol.* 19: 11-19.

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

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

Dutrillaux B, Aurias A, Dautrillaux A, Buriot D, Prieur M (1982) The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anaemia. *Somat Cell Mol Genet.* 11: 228 – 230.

Emerit I, Keck M, Levy A, Feingold J and Michelson M (1982) Activated oxygen species at the origin of chromosome breakage and sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.* 103: 165 -172.

Erixon K and Ahnström G (1979) Single-strand breaks in DNA during repair of UV-induced damage in normal human and Xeroderma pigmentosum cells as determined by alkaline DNA unwinding and hydroxylapatite chromatography effect of hydroxyurea, 5-Fluorodeoxyuridine and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine on the kinetics of repair. *Mutat. Res.* 59: 257 – 271.

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

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

Frías S, Mendoza S, Molina B, Carnevale A (1991) Effect of mitomycin C and bromodeoxyuridine on Fanconi anemia lymphocytes. *Ann Genet* 34: 104-107.

Futaki M, Igarashi T, Watanabe S, Kajigaya S, Tatsuguchi A, Wang J and Liu J (2002) The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage. *Carcinogenesis*. 23: 67-72.

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

Gille JJ, Heleen M, Wortelboer and Joenje H (1987) Antioxidants status of Fanconi anemia fibroblasts. *Human Genetics*. 77: 28 – 31.

Grompe M and D'Andrea A (2001) Fanconi anemia and DNA repair. *Hum. Mol. Gen.* 10: 2253 – 2259.

Hanft VN, Fruchtman SR, Pickens CV, Rosse PW, Howard TA and Ware RE (2000) Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood*. 95: 3589 – 3593.

Hartley-Asp, Andersson HC, Sturelid S and Kihlman BA (1980) G2-repair and the formation of chromosomal aberrations, I. The effect of hydroxyurea and caffeine on maleic hydrazide-induced chromosome damage in *Vicia faba*, *Environ Exp Botan.* 20, 119-129.

Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ, Silvey KV, Bakke AC, Keeble WW, Zhi Y, Reifsteck CA, Grompe M, Brown MG, Magenis RE, Olson SB and Bagby GC (1998) DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood*. 91: 275 – 287.

Howlett N, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox E, D'Andrea A (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. *Science* 297: 606-609.

Joenje H and Patel K (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet*. 6: 446-457.

Joenje H and Gille JJ (1989) Oxygen metabolism and chromosomal breakage in Fanconi anemia. In: *Fanconi anemia clinical, cytogenetic and experimental aspects*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Joenje H, Arwert F, Eriksson A, Koning J, Oostra A (1981) Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Lancet* 1:204.

Kennedy BJ (1992) The evolution of hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. *Semin. Oncol.* 19: 21-26.

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

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

Kupfer G, Naf D, Suliman A, Pulsipher M and D'Andrea A (1997b) The Fanconi anaemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex. *Nat Genet* 17: 487-490.

Legarreta L (2001) Determinación del efecto de la hidroxiurea en linfoblastos de anemia de Fanconi tratados con Catalasa. Tesis de licenciatura. UNAM. México.

Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, De Winter JP, Joenje H (2004) Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for two new genetic subtypes. *Blood*. 103: 2498 – 2503.

Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans MA, Pals G, Arwert F, Mathew CG, Zdzienicka MZ, Hiom K, de Winter JP and Joenje H (2005) The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat. Genet.* online 10.1038/ng1625.

Lindenhahn M and Schubert I (1983) On the origin of hydroxyurea-induced chromatid aberrations in G2 chromosomes with BrdUrd in only one of the sister chromatids. *Mutat. Res.* 108: 301 – 316.

Mavelli I, Ciriolo MR and Rotilio (1982) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxydative hemolysis. A study of Fanconi's anemia erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106: 286 – 290.

Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst A, Zwaan M, Ling C, Rooimans M, Bier P, Hoatlin M, Pals G, Winter J, Wang W and Joenje H (2004a) X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genetics*. 11: 1219-1224.

Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP and Wang W (2005) A human ortholog or archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat. Genet.* online 10.1038/ng1626.

Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W (2003) A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*. 35(2):165-170.

Meetei AR, Yan Z, Wang W (2004b) FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle* 3: 179-181.

Noguchi E, Noguchi C, Du LL and Russell P (2003) Swi1 prevents replication fork collapse and controls checkpoint kinase Cds1. *Mol. Cel. Biol.* 23: 7861 – 7874.

Nordenson I (1977) Effect of Superoxide Dismutase and Catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia. *Hereditas* 86: 147-150.

Pagano G and Youssoufian H (2003) Fanconi anaemia proteins: major roles in cell protection against oxidative damage. *BioEssays*. 25:589 - 595.

Pagano G, Manini P and Bagchi D (2003) Oxidative stress-related mechanisms are associated with xenobiotics exerting excess toxicity to Fanconi anemia cells. *Environ. Heal. Persp.* 111: 1699 – 1703.

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

Qiao F, Moss A and Kupfer G (2001) Fanconi anemia proteins localize to chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage-and cell cycle-regulated manner. *J Biol Chem* 276: 23391-23396.

Rahman N and Ashworth A (2004) A new gene on the X involved in Fanconi anemia. *Nature Genetics*. 11: 1142-1143.

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

Reichard P and Ehrenberg A (1983) Ribonucleotide reductase - A radical enzyme. *Science*. 221: 514 – 519.

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

Ridet A, Guillout C, Duchaud E, Cundari E, Fiore M, Moustacchi E and Rosselli F (1997) Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. *Cancer Res*. 57: 1722 – 1730.

Rosselli F, Briot D, Pichierri P (2003) The Fanconi anemia pathway and the DNA interstrand cross-links repair. *Biochimie* 85: 1175-1184.

Rothfuss A and Grompe M (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: Evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cel. Biol*. 24: 123 – 134.

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

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

Schindler D and Hoehn H (1988) Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Hum. Genet.* 43: 429 – 435.

Schroeder T, Anschutz F, Knopp A (1964) Spontaneous chromosome aberrations in familial pancytopenia. *Hum Genet* 1: 194-196.

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

Smith J, Andrau JC, Kallenbach S, Laquerbe A, Doyen N and Papadopoulou D. (1998) Abnormal rearrangements associated with V(D)J recombination in Fanconi anemia. *J. Mol. Biol.* 281: 815 – 825.

Sognier M and Hittelman W (1986) Mitomycin-induced chromatid breaks in HeLa cells: A consequence of incomplete DNA replication. *Cancer Res* 46: 4032-4040.

Strathdee C, Gavish H, Shannon W y Buchwald M (1992) Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 356: 763-767.

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

Taniguchi T and D'Andrea A (2002) The Fanconi anemia protein, FANCD1, promotes the nuclear accumulation of FANCD2. *Blood.* 7: 2457-2462.

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

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

Wang X and D'Andrea A (2004) The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair.* 3: 1063-1069.

Weisbart RH, Baldwin R, Huh B, Zack DJ and Nishimura R (2000) Novel protein transfection of primary rat cortical neurons using an antibody that penetrates living cells. *J. Immun.* 164: 6020 – 6026.

Wikjer M, Morgan N, Herterich S, van Berkel C, Tipping A, Gross H, Gille J, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, van Weel M, Ortega J, Schuler D, Samochatova E, Karwacki M, Bekassy A, Abecasis M, Ebell W, Kwee M, de Ravel T and Mathew C (1999) Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Human Genetics* 7: 52-59.

Witt E and Ashworth A (2002) D-Day for BRCA2. *Science* 297: 534.

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

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

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