



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EXPRESIÓN DE LAS ENDONUCLEASAS XPF,
MUS81, SLX1, SLX4 Y FAN1 EN CÉLULAS
NORMALES Y CON ANEMIA DE FANCONI**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO MEJÍA BARRERA



DIRECTOR DE TESIS:

**M. EN C. ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ
GÓMEZ**

Cd. Universitaria, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE

MEXICO
ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
P R E S E N T E

FACULTAD DE CIENCIAS
COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
UNIDAD DE ENSEÑANZA

OF. No. FCIE/CALB/U.E./0856/13

ASUNTO: Asignación de jurado

Revisado por alumno
Marco Antonio Mejía Barrera

22 de Noviembre 2013

Por este medio, el Comité Académico de la Licenciatura en Biología informa a usted que el día 25 de octubre de 2013, aprobó que el alumno:

Marco Antonio Mejía Barrera

con número de cuenta 305084714, presentará el trabajo titulado:

Expresión de las endonucleasas XPF, MUS81, SLX1, SLX4 y FAN1 en células normales y con anemia de Fanconi

correspondiente a la opción Por Tesis

Asimismo, este comité informa a usted que el tutor y los sinodales autorizados para la dirección y revisión del trabajo arriba señalado son:

- Presidente: Dra. Alessandra Carnevale Cantoni
- Vocal: M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez
- Secretario: M. en C. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez
- Tutor
- Suplente: Dra. Rosana Pelayo Camacho
- Suplente: Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

En consecuencia, este Comité solicita a usted se entregue al citado alumno la papelería que conforme a la normatividad aplicable, debe llenar, se proceda a la elaboración de los votos aprobatorios y se dé inicio al proceso de revisión de estudios correspondientes.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 29 de octubre de 2013.
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
LFJG/agg.*

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
EN BIOLOGÍA

22/11/13

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría en donde se realizó esta tesis, bajo la dirección del M. en C. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez y la asesoría de la Dra. Sara Frías Vázquez.
- A la Dra. Leda C. Torres Maldonado por el apoyo y asesoría recibida durante la realización de este trabajo.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica de la UNAM Proyecto PAPIIT IA201713 y al Instituto Nacional de Pediatría-SSA, Fondos Federales 043-12 por el financiamiento parcial de este proyecto.
- A la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (CCINSHAE) por darme la Beca PROBEI, durante el desarrollo de mi proyecto de tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de estudiar una licenciatura, por todas las oportunidades que me ha brindado a mí y a todos sus estudiantes.
- A mi director de tesis Alfredo Rodríguez Gómez. Gracias por haber aceptado dirigirme, por la enorme paciencia, cariño y tiempo, por ser tan amable y por escucharme aún cuando estabas tan ocupado, por los favores y por confiar en mí, por ser más que mi asesor, mi amigo.
- A la Dra. Sara Frias por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio y por el enorme apoyo recibido de su parte en este proyecto. Muchas gracias Sara.
- A la Dra. Leda C. Torres Maldonado. Por el enorme apoyo que recibí de su parte en la realización de este trabajo, por los consejos, los chistes y las amenas pláticas. Muchas gracias Ledita por todo.
- A todas las personas del Laboratorio de Citogenética del INP que me brindaron su apoyo y amistad: Julieta, Ulises, Juan Carlos, Rehot, Rebeca, Mario, Silvia, Sandra, Armando, Óscar, Bertha, Carlos, Osiris, Luz.
- A mi padre: Alfonso Mejía Lorenzo. Por que me enseñaste el valor del esfuerzo, la dedicación y por todo el gran amor que me has dado y me sigues dando, por enseñarme a no rendirme jamás sin importar las dificultades venideras, por los licuados de las mañanas, las llamadas, el apoyo incondicional, por ser mi modelo a seguir, en fin, por ser el mejor padre que pude tener. TE AMO JEFE.
- A mi madre: Araceli Barrera Acosta. Por enseñarme que el carácter es la base de todo ser humano digno, que el trabajo duro y la constancia son herramientas irremplazables, por tu enorme esfuerzo para que tu niño mas pequeño viviera y educarlo con toda la disciplina pero también con todo el amor que solo tú sabes dar. TE AMO MAMÁ GALLINA.
- A la Dra. América Castañeda. Gracias por todo tu cariño, tiempo, enseñanzas y consejos, por creer en mí y los millones de favores incondicionales aún sin merecerlos, te quiero Ame. Gracias por ser mi segunda mamá.
- A mi hermano: Julio César Mejía Barrera. Por nunca abandonarme a pesar de mis miles de errores, por ser el primero en creer en mí, por los abrazos, la comida, la música y las pláticas en las horas más inoportunas, por que me conoces totalmente y aún así me amas. Por ser un hermano tan maravilloso y la persona más dulce que me he encontrado en la vida. TE AMO CARNALITO.
- A Elizabeth Narváez, por que siempre tienes cariño, apoyo y una sonrisa para mí sobre todo en los momentos difíciles, te quiero mucho señorita, mil gracias por todo.
- A mis amigos de toda la vida que me han acompañado y siguen aquí, los quiero: Agustín, Gerardo, Fernando, Ana, Alexandro "El buen Alex", Daniel "Papaleta", Sergio,

Pelagio, Juan, Mariño, Dulce, Yessica, Adri, Aby, Mariana y Alejandra Cavita, Yohalli, Issaac, Lucero, Jovana, Mónica, Mariana, Aralia, Diego, Griselda, Jorge, Viri, Belén, Fernanda, Angie Vazquez, Vane, Diana Reynada, Marco Carballo, Marco Padilla, Ricardo, Kenia, Julio, Angie, Mari, Grace, Jalil, Angie Retana, Anuar, Marisol, Chucho, Citlali, Alex, Laurita, Itzel, y a ti mi amado Bolillo.

- A mi familia, Mejía y Barrera: tios, primos, sobrinos, abuelo, por acompañarme siempre y creer en mí.
- A todos los maestros que dedicaron su tiempo y esfuerzo para hacer de mí un mejor individuo.
- A todo aquel que pensó o me dijo que no podría hacer una tesis.

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO.

6-4PPS	6-4 fotoproductos
7SL	Signal Recognition Particle RNA
β 2M	Beta 2 Microglobulina
AC	Aberraciones Cromosómicas
ACTB	Beta Actina
ACTD	Actinomicina D
AF	Anemia de Fanconi
AF-A	Anemia de Fanconi del grupo de complementación A
ANOVA	Análisis de Varianza
APC	Complejo Promotor de la Anafase
AT	Ataxia Telangiectasia
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
ATLD	Síndrome Similar a Ataxia Telangiectasia
BACH1	BTB And CNC Homology 1, Basic Leucine Zipper Transcription Factor 1
BD	1-3 Butadieno
BER	Reparación por Escisión de Bases
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BIRP1	Proteína de Interacción con BRCA1 1
C-Fos	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CHK1	Checkpoint Kinase 1
CP	Crossing Point
CPDs	Dímeros de Pirimidina Ciclobutano
CsDNA	DNA de cadena sencilla
CtIP	Choline Transporter-Like Proteine
DB	1.3-Butadieno
DEB	1,2,3,4-Diepoxibutano
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxirribonucleótido Trifosfato
ECC	Enlace Covalente Cruzado
EEE	Endonucleasas Específicas de Estructura
EME1	Essential Meiotic Endonuclease 1 Homolog 1
ERCC1	Excision repair cross- complementation group 1
ERCC4	Excision repair cross- complementation group 4
FAAP24	Proteína Asociada a Anemia de Fanconi de 24 kDa
FAAP100	Proteína Asociada a Anemia de Fanconi de 100 kDa
FAN1	Nucleasa 1 asociada a FANCD2/FANCI
FANCA	Anemia de Fanconi del grupo de complementación A
FANCB	Anemia de Fanconi del grupo de complementación B
FANCC	Anemia de Fanconi del grupo de complementación C
FANCD1	Anemia de Fanconi del grupo de complementación D1
FANCD2	Anemia de Fanconi del grupo de complementación D2

FANCE	Anemia de Fanconi del grupo de complementación E
FANCF	Anemia de Fanconi del grupo de complementación F
FANCG	Anemia de Fanconi del grupo de complementación G
FANCI	Anemia de Fanconi del grupo de complementación I
FANCJ	Anemia de Fanconi del grupo de complementación J
FANCL	Anemia de Fanconi del grupo de complementación L
FANCM	Anemia de Fanconi del grupo de complementación M
FANCN	Anemia de Fanconi del grupo de complementación N
FANCO	Anemia de Fanconi del grupo de complementación O
FANCP	Anemia de Fanconi del grupo de complementación P
FANCQ	Anemia de Fanconi del grupo de complementación Q
GFP	Proteína Verde Fluorescente
HIF	Factor Inducible de Hipoxia
HU	Hidroxiurea
ICH	Intercambio de Cromátides Hermanas
IL6	Interleucina 6
IP	Yoduro de Propidio
LIG4	Ligasa 4
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MB	Modelo Computacional de Tipo Booleano
MLH1	MutL homolog 1
MLH3	MutL homolog 3
MMC	Mitomicina C
MMS	metil metanosulfonato
MMS4	Malignant Mesothelioma, Susceptibility To 4
MO	Médula Ósea
Mre11	Meiotic Recombnation 11 Homolog A
mRNA	RNA mensajero
MSH2	MutS protein homolog 2
MSH3	MutS protein homolog 3
MUS81	Subunidad de la Endonucleasa Estructura Específica MUS81
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos
NHEJ	Reparación por Unión de Extremos No Homólogos
PALB2	Pareja y Localizador de BRCA2
PARP	Poli-ADP Ribosa Polimerasa
PMS1	Postmeiotic Segregation Increased 1
PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2
R	Expresión Relativa
RAD51	RAD51 Homolog A
RAD52	RAD52 Homolog A
RDH	Ruptura de Doble Hebra
REV1	Polimerasa dirigida a DNA REV1
RI	Radiación Ionizante
RM	Recombinación Meiótica
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
RPA	Proteína de Replicación A

RR	Ribonucleótido Reductasa
RRH	Reparación por Recombinación Homóloga
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real cuantitativa.
SC	Síndrome de Cockayne
SIN TX	Sin Tratamiento
SLX1	Subunidad de la Endonucleasa Estructura Específica SLX1
SLX4	Subunidad de la Endonucleasa Estructura Específica SLX4
SNM1A	DNA cross-link repair 1A
SNM1B	DNA cross-link repair 1B
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UV	Radiación Ultra Violeta
UVC	Luz Ultra Violeta
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPF	Xeroderma Pigmentosum tipo F
XRCC3	X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 3
zMUS81	MUS81 de Pez Cebra

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS.

Figura 1. ICH, figuras de intercambio radial y rupturas cromosómicas.....	19
Figura 2. Modelo de la vía FA/BRCA.....	23
Figura 3. Reparación de una RDH.....	24
Figura 4. Mecanismo de acción de la MMC.....	26
Figura 5. Reacción del DEB con DNA.....	27
Figura 6. Cisplatino intercalado en el DNA y su mecanismo de acción.....	28
Figura 7. Formación de aductos.....	30
Figura 8. Diseño experimental.....	50
Figura 9. Modelo hipotético de cambios de las nucleasas.....	82
Gráfica 1. Frecuencia de aberraciones cromosómicas.....	52
Gráfica 2. Acumulación de células en fase S.....	53
Gráfica 3. Acumulación de células en fase G2.....	54
Gráfica 4. Expresión relativa de mRNA de <i>SLX4</i> en células normales.....	56
Gráfica 5. Expresión relativa de mRNA de <i>SLX4</i> en células AF-A.....	56
Gráfica 6. Expresión relativa de mRNA de <i>XPF</i> en células normales.....	58
Gráfica 7. Expresión relativa de mRNA de <i>XPF</i> en células AF-A.....	58
Gráfica 8. Expresión relativa de mRNA de <i>FAN1</i> en células normales.....	60
Gráfica 9. Expresión relativa de mRNA de <i>FAN1</i> en células AF-A.....	60
Gráfica 10. Expresión relativa de mRNA de <i>SLX1</i> en células normales.....	62
Gráfica 11. Expresión relativa de mRNA de <i>SLX1</i> en células AF-A.....	62
Gráfica 12. Expresión relativa de mRNA de <i>MUS81</i> en células normales.....	64
Gráfica 13. Expresión relativa de mRNA de <i>MUS81</i> en células AF-A.....	64
Gráfica 14. Cambios en los mRNAs de <i>XPF</i> , <i>FAN1</i> y <i>SLX4</i> en células NL49...66	
Gráfica 15. Cambios en los mRNAs de <i>XPF</i> , <i>FAN1</i> y <i>SLX4</i> en células VU81766	
Gráfica 16. Cambios en los mRNAs de <i>MUS81</i> y <i>SLX1</i> en células NL49.....	67
Gráfica 17. Cambios en los mRNAs de <i>MUS81</i> y <i>SLX1</i> en células VU817.....	67
Tabla 1. Genes utilizados en los ensayos de qRT-PCR.....	38
Tabla 2. Endonucleasas involucradas en la reparación de ECC.....	39
Tabla 3. Promedios en la expresión relativa.....	67

ÍNDICE.

RESUMEN.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	15
I.I. Síndromes de Inestabilidad Cromosómica.....	15
I.II. La Anemia de Fanconi (AF).....	16
I.II.I. Características clínicas.....	16
I.II.II. Características celulares.....	18
I.III. La vía FA/BRCA repara los ECC en el DNA.....	20
I.IV. Agentes inductores de ECC.....	24
I.IV.I. Mitomicina C.....	25
I.IV.II. Diepoxibutano (DEB).....	26
I.IV.III. Cisplatino.....	27
I.V. Fuentes naturales de ECC.....	28
I.VI. Las endonucleasas permiten el procesamiento de los ECC....	31
I.VI.I. SLX4/FANCP.....	32
I.VI.II. XPF/ERCC4.....	33
I.VI.III. FAN1.....	35
I.VI.IV. SLX1.....	35
I.VI.V. MUS81.....	37
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
III. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	42
IV. JUSTIFICACIÓN.....	43
V. HIPÓTESIS.....	44
VI. OBJETIVO GENERAL.....	44
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44

VIII. MÉTODO.....	45
VIII.I. Cultivo celular y tratamientos.....	45
V.II. Análisis de aberraciones cromosómicas.....	46
VIII.III. Citometría de flujo.....	47
VIII.IV. Extracción de RNA.....	47
VIII.V. Transcripción reversa a cDNA o Síntesis de Cdna.....	48
VIII.VI.qRT-PCR.....	48
VIII.VII. Análisis estadístico.....	49
IX. RESULTADOS.....	51
IX.I. Análisis de aberraciones cromosómicas.....	51
IX.II. Análisis de la distribución del ciclo celular.....	52
IX.III. Análisis de la expresión del RNA mensajero.....	53
X. DISCUSIÓN.....	68
XI. CONCLUSIONES.....	84
XII. PERSPECTIVAS.....	86
XIII. REFERENCIAS.....	87
XIV. APÉNDICE.....	105

RESUMEN.

La anemia de Fanconi (AF) es un síndrome de inestabilidad genómica con herencia recesiva caracterizado por falla progresiva de la médula ósea (MO), malformaciones congénitas y un riesgo elevado de desarrollar neoplasias. En esta enfermedad se encuentran involucrados al menos 16 genes que forman parte de la vía FA/BRCA, la cual se encarga de detectar y reparar enlaces covalentes cruzados (ECC) establecidos entre las dos hebras de DNA.

La vía FA/BRCA está compuesta por 1) proteínas de detección de ECC, 2) endonucleasas que realizan cortes a ambos lados del ECC para liberar a la doble hebra del DNA generando una ruptura, y 3) proteínas que canalizan dicha ruptura para que sea reparada por recombinación homóloga. Hasta la fecha se considera que estos cortes son realizados por la endonucleasa XPF en cooperación con la proteína de andamiaje de endonucleasas SLX4. Por lo tanto si la vía FA/BRCA no es funcional se esperaría que estas endonucleasas no se activen y que no se realicen los cortes en los sitios de ECC. Sin embargo, cuando las células AF se exponen a agentes inductores de ECC, como la Mitomicina C (MMC), es posible cuantificar una frecuencia de rupturas cromosómicas mucho mayor que la observada en las células normales, evidenciando así que las células AF son capaces de cortar a ambos lados de los ECC pero no son capaces de reunir apropiadamente los segmentos rotos de DNA generados.

Este procesamiento podría estar mediado por endonucleasas alternas a las de la vía FA/BRCA como FAN1, MUS81 o SLX1, o por mecanismos

compensatorios que permitan activar la transcripción de los genes de las endonucleasas canónicas de la vía FA/BRCA.

En este trabajo se exploró la posibilidad de que existieran cambios compensatorios en la expresión de los RNA mensajeros (mRNA) de los genes *FAN1*, *MUS81*, *XPF*, *SLX1* y *SLX4*, lo cual podría aportar evidencia de su participación en una vía alterna de activación y de reparación de ECC. Para ello se realizaron cultivos de una línea linfoblastoide humana normal (NL49) y una línea con genotipo *FANCA*^{-/-} (VU817) con o sin exposición a MMC (10ng/ml) para generar ECC. La respuesta de las células a estos tratamientos se evaluó a las 6, 12, 18 y 24 horas posteriores al inicio del tratamiento mediante análisis de ciclo celular con yoduro de propidio y evaluación de expresión de los mensajeros mencionados por qRT-PCR.

El ensayo de citometría de flujo mostró que en los cultivos la cantidad de células en fase S aumenta con el paso del tiempo alcanzando su pico máximo a las 18 horas de iniciado el tratamiento y que también en este punto inicia la acumulación de células AF-A en la fase G2. Además que en condiciones basales la expresión de *XPF*, *FAN1*, *MUS81* y *SLX4* tuvo su máxima expresión en esta fase del ciclo celular y decae posteriormente cuando las células entran a G2. Interesantemente observamos que el tratamiento con MMC induce una baja en los niveles de mRNA de *FAN1* y *XPF* en ambas líneas celulares, pero no induce cambios en la expresión de los mensajeros de *MUS81* y *SLX1*.

Los resultados muestran que la MMC afecta negativamente la expresión de ciertas endonucleasas y que en otras no induce ningún cambio, por lo tanto las

rupturas observadas en las células AF-A tratadas con MMC no pueden ser explicadas por cambios compensatorios en la expresión de estas endonucleasas. Sin embargo, esto no descarta su participación a otro nivel, como el proteico y por lo tanto se requiere de mayor investigación para saberlo.

I. INTRODUCCIÓN

I.I. Síndromes de inestabilidad cromosómica.

El DNA (Ácido Desoxirribonucleico) se encuentra siempre expuesto a distintos tipos de daño tanto endógeno como exógeno. Entre el daño que pueden recibir las células se considera como uno de los más deletereos a la formación de enlaces covalentes cruzados (ECC) entre las dos hebras de DNA. Los ECC pueden generarse de manera endógena, como resultado de la peroxidación de lípidos, como la acroleína (Kozekov *et al.*, 2003; Stone *et al.*, 2008), por ácido nitroso y aldehídos, o por diferentes agentes exógenos, entre ellos la mitomicina C (MMC), el 1,2,3,4-Diepoxibutano (DEB) y el cisplatino (Kee y D'Andrea, 2010).

El daño al DNA induce diferentes tipos de respuesta celular, incluyendo:

- 1) La remoción del DNA dañado y la restauración del duplex de DNA por distintos mecanismos como la reparación directa, la reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés, *Base Excision Repair*), la reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés, *Nucleotide Excision Repair*), la reparación por recombinación homóloga (RRH) o la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés, *Non-Homologous End Joining*).
- 2) La activación de puntos de monitoreo de daño al DNA, provocando un arresto en el ciclo celular que permite reparar y evitar la transmisión de cromosomas dañados (Sancar *et al.*, 2004).

- 3) Una respuesta transcripcional que provoca cambios en el perfil de transcripción que pueden beneficiar a la célula.
- 4) Apoptosis, la cual elimina a las células que se encuentran fuertemente dañadas o seriamente desreguladas (Sancar *et al.*, 2004).

La pérdida de función de los genes encargados de mantener la integridad del DNA se observa en diversos síndromes humanos conocidos como “síndromes de inestabilidad genómica” los cuales incluyen enfermedades autosómicas recesivas tales como la anemia de Fanconi (AF), la Ataxia Telangiectasia (AT) y el síndrome de rupturas de Nijmegen, entre otras. Además, presentan un riesgo muy elevado de padecer cáncer de mama y ovárico, el cual está asociado a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, cuyos productos proteicos son conocidos por ser cruciales para la estabilidad cromosómica (Surrallés *et al.*, 2004).

I.II. La anemia de Fanconi (AF).

I.II.I. Características clínicas.

La anemia de Fanconi (AF) fue descrita por el pediatra suizo Guido Fanconi en 1927, es una enfermedad recesiva con herencia autosómica o ligada al cromosoma X. La AF es un síndrome de inestabilidad genómica caracterizado por falla progresiva de la médula ósea (MO), anomalías en el desarrollo y un riesgo muy elevado de desarrollar neoplasias (D'Andrea y Grompe 2003; Moldovan y D'Andrea 2009).

La AF se diagnostica generalmente entre los 3 y los 7 años de edad y los pacientes tienen una esperanza de vida promedio de 20 años (Molina y Frias, 2006; Auerbach *et al.*, 1981). La frecuencia de la AF es de 1 a 5 casos por millón de personas y se estima que la frecuencia de heterocigotos es de cerca de 1 caso por cada 300 personas, aunque la verdadera frecuencia podría ser mayor (D'Andrea, 2010). La edad media al diagnóstico es de 6.5 años en varones y 8.0 en mujeres. Los defectos congénitos comunes incluyen: estatura baja, anomalías en la piel, brazos, cabeza, ojos, riñones y orejas, y retraso en el desarrollo. Alrededor del 25 al 40 % de los pacientes con AF son físicamente normales. La falla de la MO se presenta típicamente en la primera década de la vida con un riesgo de muerte de 90% a los 40 años. Alrededor del 20% de los pacientes con AF desarrollan cáncer, siendo la leucemia mieloide aguda (LMA) la más frecuente (D'Andrea, 2010).

La AF es una enfermedad genéticamente heterogénea, en la que están implicados al menos 16 genes: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCI/BRIP1/BACH1*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51* y *FANCP/SLX4* (Crossan y Patel, 2012), además del recientemente descubierto *FANCQ/XPF* (Bogliolo *et al.*, 2013; Kashiwama *et al.*, 2013). La evidencia sugiere fuertemente que los productos de todos estos genes están implicados en una vía común de reparación del daño al DNA, la cual es conocida como la vía FA/BRCA y que se encarga del procesamiento de los ECC (D'Andrea, 2010).

I.II.II. Características celulares.

Las células AF presentan aberraciones cromosómicas (AC) de modo espontáneo, particularmente figuras de intercambio radial y rupturas de doble hebra (RDH), además tienen hipersensibilidad a los agentes que inducen ECC en el DNA (Kee y D'Andrea 2010), como el cisplatino y la MMC (Auerbach, 1993; 2003 y 2009), por lo que al ser expuestas a estos agentes el número de AC se eleva considerablemente, siendo este aumento de por lo menos 10 veces.

Otras características de las células AF son la prolongación de la fase S tardía y de la fase G2 del ciclo celular, sensibilidad a radiación ionizante (RI) (específicamente en G2) (D'Andrea y Grompe, 2003), así como hipersensibilidad a concentraciones elevadas de oxígeno y a las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Pagano y Youssofian, 2003), ya que elevan el número de aberraciones cromosómicas, disminuyen la tasa de proliferación e inducen arresto del ciclo celular en la fase G2 (Joenje y Oostra, 1983; Joenje y Patel, 2001). Además se presenta baja producción de la interleucina 6 (IL6), concentraciones elevadas del Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), el cual es un inductor de apoptosis (Rosselli *et al.*, 1992) e hipersensibilidad a la Hidroxiurea (HU), un agente inhibidor de la enzima Ribonucleótido Reductasa (RR), cuya función es la síntesis de deoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (Frias *et al.*, 1996).

En los cultivos celulares una gran proporción de células AF mueren al ser expuestas a MMC o DEB, debido a sus deficiencias en los procesos de reparación del DNA. Sin embargo, algunas células sobreviven exhibiendo RDH no reparadas, así como reparación parcial de todo el daño inducido inicialmente en el DNA, tales como figuras de intercambio radial y una tasa de intercambios de cromátides hermanas cercano a lo normal (ICH) (Latt *et al.*, 1975) (Figura 1).

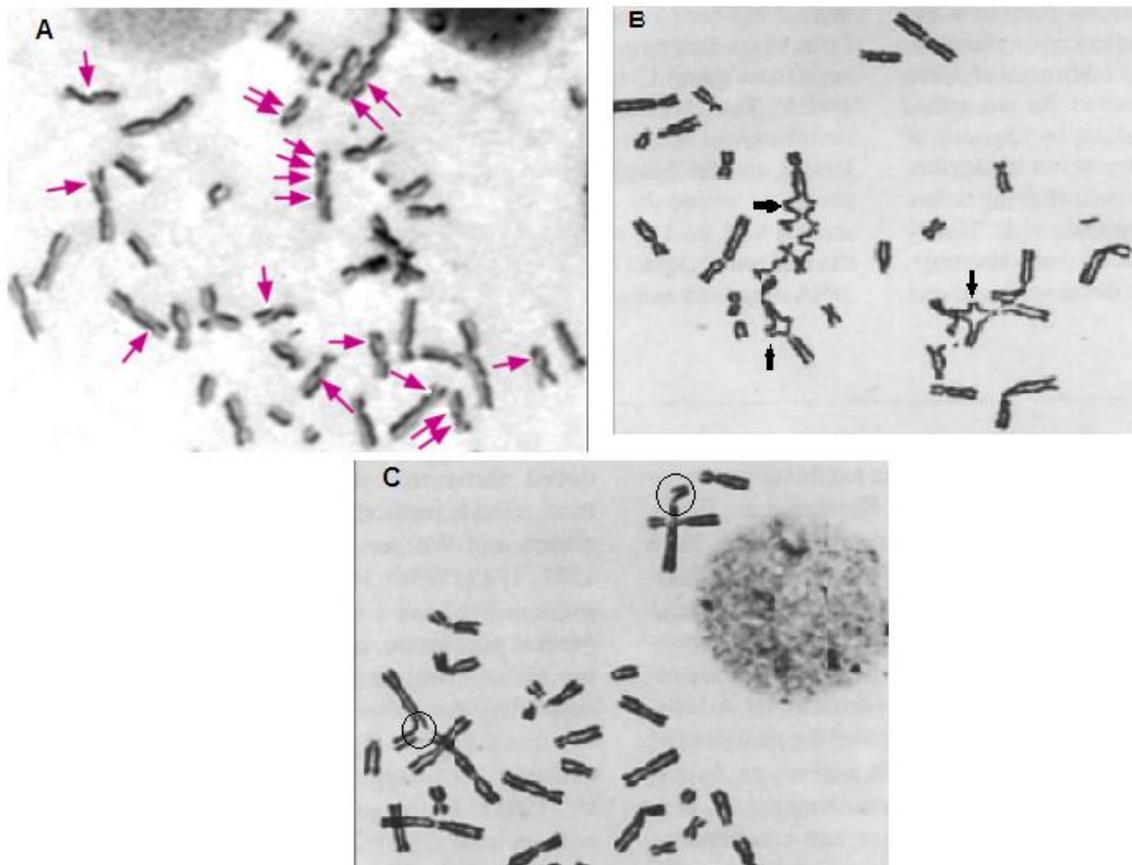


Figura 1. A) Intercambios de cromátides hermanas en líneas celulares de AF tratadas con MMC (10ng/ml) señalados con flechas violetas. Imagen tomada de Deans y West, 2009. B) Figuras de intercambio radial en linfocitos de un paciente con AF expuestos a 0.1µg/ml de DEB, señaladas con flechas negras. C) Rupturas cromosómicas en linfocitos AF, imágenes tomadas de Auerbach, 1993.

I.III. La vía FA/BRCA repara los ECC en el DNA.

La vía FA/BRCA es una vía compleja de reparación de DNA que puede dividirse en dos etapas:

VÍA RÍO ARRIBA: Inicia con una fase de activación donde el ECC es reconocido directamente por el complejo proteico FANCM-FAAP24-MHF1 Y 2 (Kee y D' Andrea, 2010), este complejo recluta por interacción directa al complejo central de AF (*FACore*), el cual posee un dominio de ligasa de ubiquitinas PHD E3 en la subunidad FANCL, subsecuentemente el *FACore* monoubiquitina a sus dos sustratos: FANCD2 y FANCI (Kee y D' Andrea, 2010). El complejo FANCD2-FANCI monoubiquitinado adquiere una forma activa, reclutando a la proteína de andamiaje de endonucleasas conocida como SLX4 y a la endonucleasa FAN1 (Yamamoto *et al*, 2011), una polimerasa de síntesis translesión necesaria para procesar el ECC, probablemente REV1 y a una serie de proteínas de reparación del DNA (incluyendo BRCA1, PALB2 [FANCN], BRCA2 y FANCI [BACHJ/BRIP1]), facilitando la reparación río abajo por medio de la RRH, RAD51C podría tener una interacción funcional con FANCD2 en este paso (Kee y D' Andrea, 2010) Se puede apreciar una versión resumida de estos pasos en la Figura 2.

VÍA RÍO ABAJO: En una segunda fase de la vía, los ECC son procesados por endonucleasas, que cortan en una de las hebras de DNA. Se piensa que las proteínas responsables de esto son primordialmente XPF en conjunto con SLX4, mientras que MUS81 y SLX1 participan de forma secundaria (Bhagwat *et al*, 2009; Kim *et al.*, 2012), se ha encontrado además que la endonucleasa

FAN1 tiene asociación con el dímero FANCD2-FANCI monubiquitinado, y que el reclutamiento de FAN1 en los sitios de daño es crucial para la reparación adecuada de los ECC (Liu *et al.*, 2010). En el punto I.VI se profundiza acerca de las endonucleasas que se emplean en la vía FA/BRCA y se discute cómo podrían estar participando otras endonucleasas en posibles vías alternas de reparación.

Con este procesamiento se genera una RDH y un aducto. La RDH es reparada por medio de una RRH dependiente de la vía FA/BRCA. En la RRH las secuencias de DNA son intercambiadas entre dos hebras de DNA idénticas o similares y la reparación se lleva a cabo de modo fidedigno (Kee y D'Andrea, 2010). En la RRH los extremos de la RDH deben ser reseccionados para exponer el extremo 3' de las hebras salientes de cadena sencilla (csDNA) por la actividad exonucleasa de Mre11, miembro del complejo MRN, siendo necesaria la interacción de este complejo con CtIP para este paso (Sartori *et al.*, 2007). El csDNA expuesto es rápidamente cubierto y protegido de la degradación por medio de la proteína RPA (Kee y D'Andrea, 2010). RPA es posteriormente reemplazado por RAD51 para poder llevar a cabo la RRH, este paso es facilitado por BRCA1, PALB2, RAD52 y BRCA2 (Kee y D'Andrea, 2010). Los filamentos presinápticos csDNA-RAD51 resultantes son capaces de invadir la región homóloga en el DNA dúplex cercano, formando un tríplex de DNA llamado D-loop. Con ayuda de una DNA polimerasas se sintetiza DNA en la zona de copiado (posiblemente por actividades redundantes o combinadas de POL η , POL δ y POLN) y los intermediarios de recombinación son finalmente resueltos para completar la reparación. RAD51C, uno de los cinco parálogos de

RAD51 encontrados en células humanas, parece promover la carga de RAD51 (requerido para el *focus* de formación de RAD51) en un paso temprano de la RRH. RAD51C forma un complejo con XRCC3 para resolver las uniones de Holliday, en un paso tardío de la RRH (Liu *et al.*, 2007).

Cuando las proteínas AF no funcionan de manera adecuada, se recurre a la NHEJ para reparar las RDH; la NHEJ es una vía alternativa en la cual dos rupturas de doble hebra son selladas directamente, sin necesitar templados homólogos (Kee y D'Andrea, 2010). La NHEJ sella directamente dos extremos de RDHs y generalmente no requiere resección de las RDH. La unión del heterodímero Ku70/80 en los extremos de las RDH recluta a la cinasa DNA-PKcs, la cual a su vez recluta a la DNA ligasa IV (LIG4), la cual subsecuentemente une los dos extremos rotos de DNA (Kee y D'Andrea, 2010). La Figura 3 describe de manera simple los mecanismos para la RRH y NHEJ.

El aducto que se generó al mismo tiempo que la RDH es procesado por una polimerasa de síntesis translesión (probablemente REV1) y removido posteriormente por medio de la NER (Kee y D'Andrea, 2010), una vía que se encarga de reparar diversos daños que distorsionan la estructura de doble hélice del DNA, tal como dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y los (6-4) fotoproductos (6-4PPs) (de Laat *et al.*, 1999).

La vía FA/BRCA interactúa además con las proteínas de monitoreo de la integridad del DNA: ATR y CHK1, las cuales se requieren para la activación de

la vía FA/BRCA inducida por daño. ATR y CHK1 fosforilan múltiples proteínas de la vía FA/BRCA y a otras proteínas asociadas. De igual manera, la estabilidad y actividad de ATR y CHK1 puede ser promovida por el heterodímero FANCM-FAAP24 y por FANCI (Kee y D' Andrea, 2010).

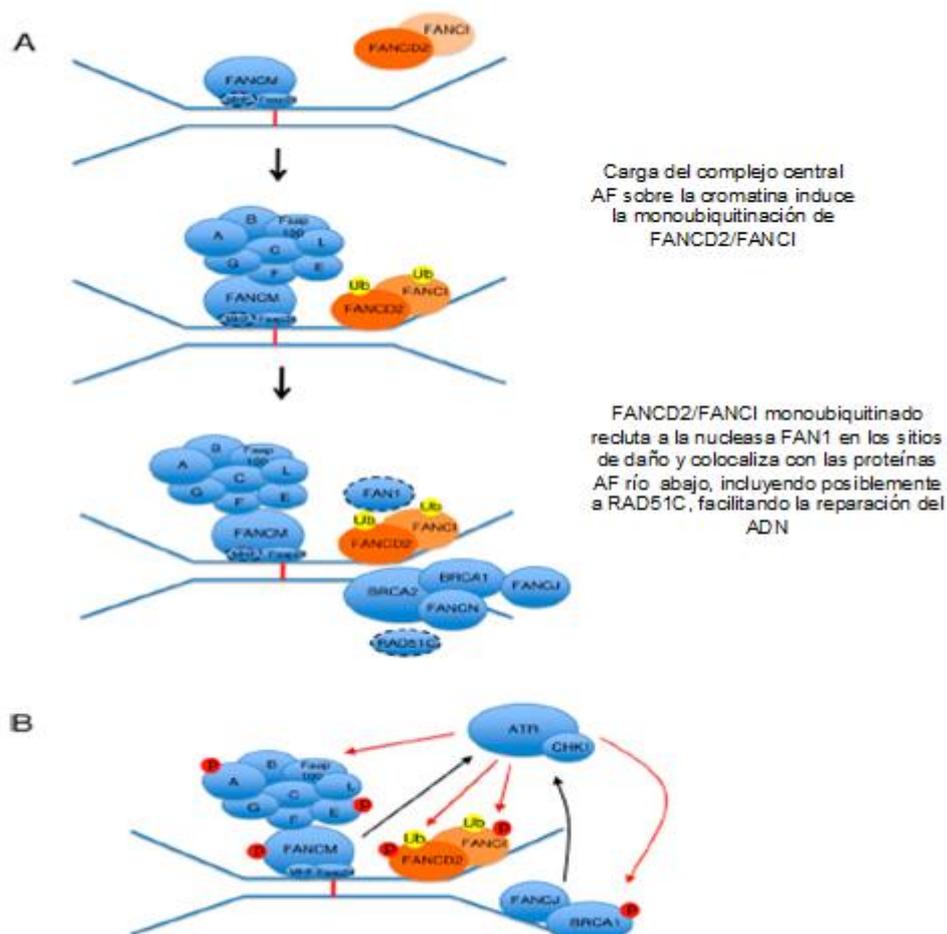


Figura 2. Modelo esquemático para la vía de FA/BRCA. (A) Activación de la vía FA/BRCA. (B) la vía FA/BRCA se cruza con las proteínas de monitoreo ATR-CHK1. ATR y su cinasa efectora, CHK1 se requieren para la activación de la vía FA/BRCA inducida por daño. Imagen tomada de Kee y D'Andrea, 2010.

La evidencia sugiere que en las células AF la vía FA/BRCA no se activa apropiadamente (O'Donnell L. y Durocher D., 2010). Sin embargo, las células

AF son capaces de procesar inicialmente los ECC en el DNA y generan RDHs, las cuales no pueden reparar apropiadamente (Rothfuss y Grompe, 2004).

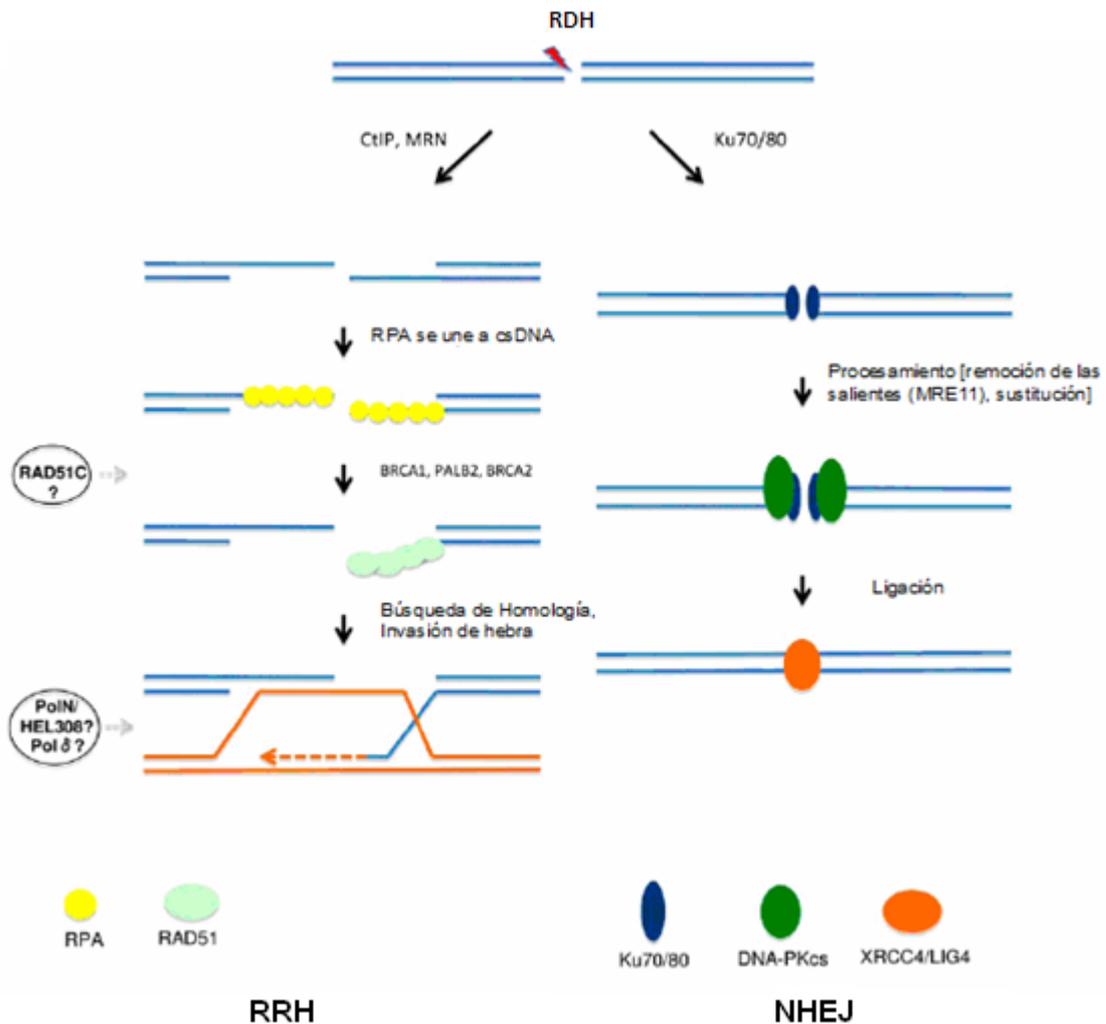


Figura 3. Esquema de la reparación de una ruptura de doble hebra (RDH) de las vías de reparación por recombinación homóloga (RRH) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Imagen tomada de Kee y D'Andrea, 2010.

I.IV. Agentes inductores de ECC.

Los ECC pueden generarse por fuentes endógenas, tales como ácido nitroso y aldehídos, o por diferentes agentes exógenos, como la MMC, el DEB o el

Cisplatino y sus derivados, impidiendo la progresión de la horquilla de replicación (Kee y D'Andrea, 2010).

Después del tratamiento con agentes inductores de ECC, las células AF presentan un incremento en el número de rupturas cromatídicas, cromosómicas, figuras de intercambio radial y otras anormalidades observadas en cromosomas en metafase (Grompe y D'Andrea, 2001). Estos agentes generan ECC, debido a que son alquilantes bifuncionales.

I.IV.I. Mitomicina C (MMC).

La mitomicina C es un antibiótico, obtenido originalmente de *Streptomyces caespitosus* (Gilman *et al.*, 1980), que forma entrecruzamientos que no distorsionan demasiado la estructura del DNA (Tomasz, 1995). Este compuesto contiene anillos planos que pasan por una serie de reacciones de reducción intracelular y se une a los residuos de guanosina del DNA en hebras opuestas (Deans y West, 2011), tal como puede apreciarse en la figura 4. Se estima que del total del daño causado al DNA por la MMC, aproximadamente el 5-10% se debe a ECC, uniéndose a las guanosinas (Deans y West, 2011).

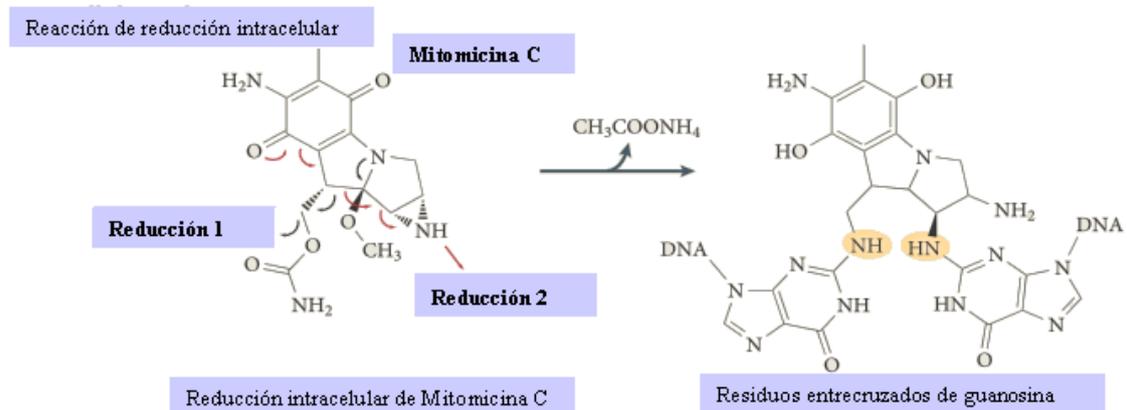


Figura 4. Mecanismo de acción de la MMC. La MMC pasa por dos reacciones de reducción intracelular, se une a las guanósinas de las dos hebras de DNA y da como resultado un ECC. Imagen tomada de Deans y West, 2011.

I.IV.II. Diepoxibutano (DEB).

El DEB es un derivado del 1,3-butadieno (DB), un químico industrial clasificado como probable carcinógeno humano. El DEB es un agente genotóxico bifuncional potente (Tretyakova *et al.*, 1997) y las células AF pueden morir al ser expuestas a él, no así si la exposición es crónica, en donde la viabilidad no se ve afectada (Auerbach y Wolman, 1979). La prueba de rupturas cromosómicas por DEB, es utilizada como criterio diagnóstico para la AF para la detección de pacientes con AF (D'Andrea y Grompe, 2003), esto es debido a que otras pruebas poseen altas tasas de resultados falsos positivos y falsos negativos (Auerbach, 2003). El DEB forma ECC en el DNA entre los residuos de desoxiguanosina distales en la secuencia dúplex 5'-GNC; dichos ECC interrumpen la replicación y la transcripción, conduciendo a eventos citotóxicos y mutagénicos (Steen *et al.*, 1997). Las lesiones al DNA por DEB incluyen entrecruzamientos DNA-DNA en residuos de desoxiadenosina y desoxiguanosina (Park y Tretyakova, 2004; Park *et al.*, 2004). (Figura 5).

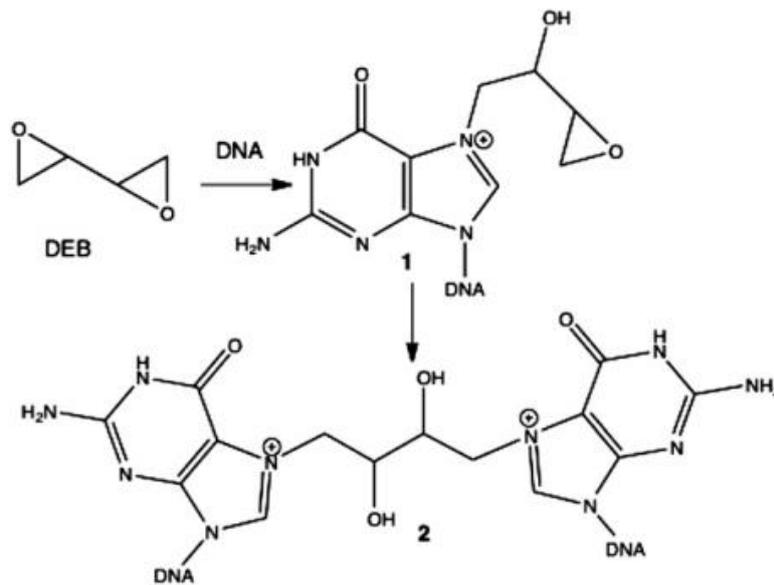


Figura 5. Reacción del DEB con DNA, para dar como resultado, un monoadducto (1) y un ECC en residuos de desoxyguanosina (2). Imagen tomada de Millard *et al.*, 2012.

I.IV.II. Cisplatino.

El cisplatino es un compuesto inductor de ECC y uno de los agentes antitumorales más potentes (Siddik, 2003) para el tratamiento de tumores sólidos como cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello (Prestayko *et al.*, 1979). El daño que produce al DNA se compone en un 90% de enlaces cruzados intrahebra (predominantemente entre residuos de purinas adyacentes sobre la misma hebra) y aproximadamente el 5% son ECC (Eastman, 1986). Los compuestos bifuncionales de platino poseen grupos químicamente activos que son ganados dentro de la célula por el desplazamiento secuencial de dos iones de cloro por molécula de agua. Esta forma activa puede reaccionar con las bases en cada hebra de DNA, de

manera más común en la posición N⁷ de las guanosinas o adenosinas (Figura 6) (Eastman, 1983).

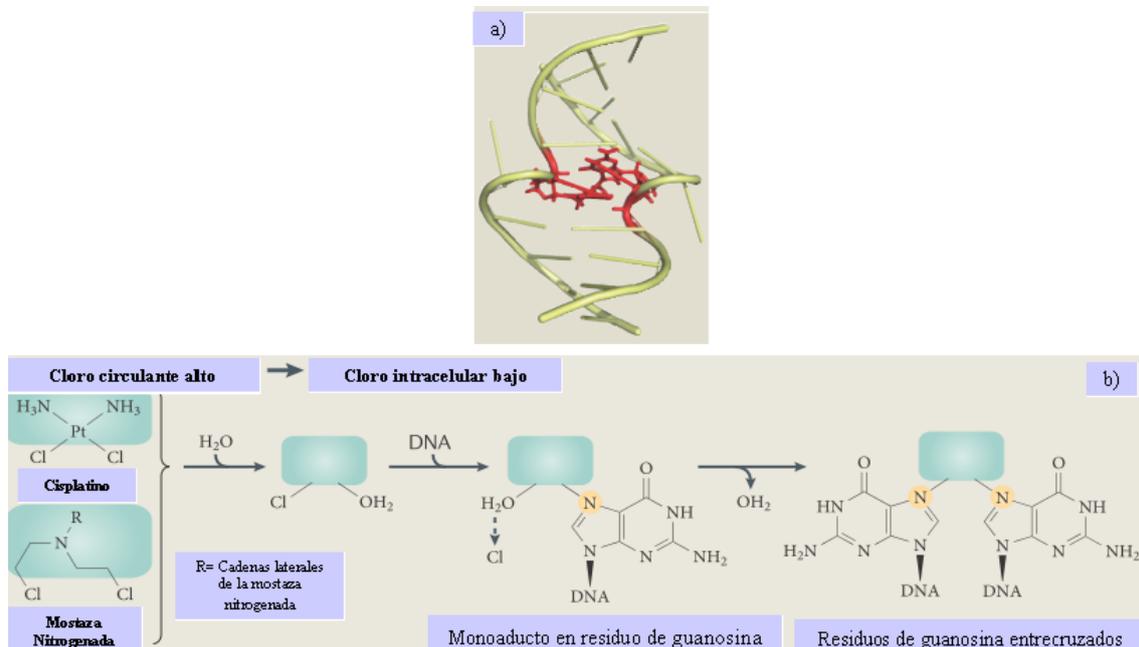


Figura 6. a). Cisplatino intercalado en el DNA. b). Mecanismo de acción del cisplatino y la mostaza nitrogenada para la formación de un ECC. Del lado izquierdo se observan las estructuras del cisplatino y la mostaza nitrogenada, ambos con dos iones cloro en sus grupos salientes, a continuación, uno de ellos es desplazado por una molécula de agua (H_2O), reaccionando con un residuo de guanosina de una hebra de DNA, formando así un monoadducto. Este proceso vuelve a repetirse, reaccionando con un residuo de guanosina en otra hebra de DNA, formándose un ECC. Imágenes tomadas de Deans y West, 2011.

I.V. Fuentes naturales de ECC.

Una de las fuentes naturales de ECC mejor caracterizadas son los productos de la peroxidación de lípidos, incluyendo la acroleína, el crotonaldehído R (Figura 7) y los aldehídos β -insaturados (Kozekov *et al.*, 2003; Stone *et al.*, 2008). Las concentraciones de estos agentes pueden incrementarse en una dieta alta en grasas o en personas alcohólicas (Brooks y Theruvathu, 2005;

Folmer *et al.*, 2003). Otras fuentes de ECC incluyen, psoralenos naturales (tales como los encontrados en la bergamota, el perejil y el apio), e incluso estrógenos (Ljunggren, 1990; Manderfeld *et al.*, 1997; Ashwood-Smith *et al.*, 1980; Dutta *et al.*, 2007; Bennetts *et al.*, 2008).

Por otra parte, se piensa que la exposición prolongada a 1,3-butadieno (BD) es una fuente importante de daño al DNA, como se ha observado en trabajadores de la industria de polímeros sintéticos, quienes presentan una tasa alta de leucemias (IARC, 2007; Sathiakumar *et al.*, 1998), otras rutas de exposición a BD comunes son el humo del cigarro y el de los escapes de los automóviles (IARC, 2007).

El daño al DNA puede darse endógenamente por otras fuentes tales como el ácido nítrico y los aldehidos, los cuales generan ECC (Kee y D'Andrea, 2010). Un ejemplo de esto es lo reportado por Cheng *et al.* (2003), en donde en una reacción de acetaldehido y formaldehido con residuos de desoxiguanosina y DNA se encontraron cantidades sustanciales de ECC de formaldehido, principalmente di-(N6-desoxyadenosil) metano, con cantidades menores de (N6-desoxiadenosil-N2-desoxiguanosil) metano, di-(N2-desoxiguanosil) metano, y N6-hidroximetil-dAdo.

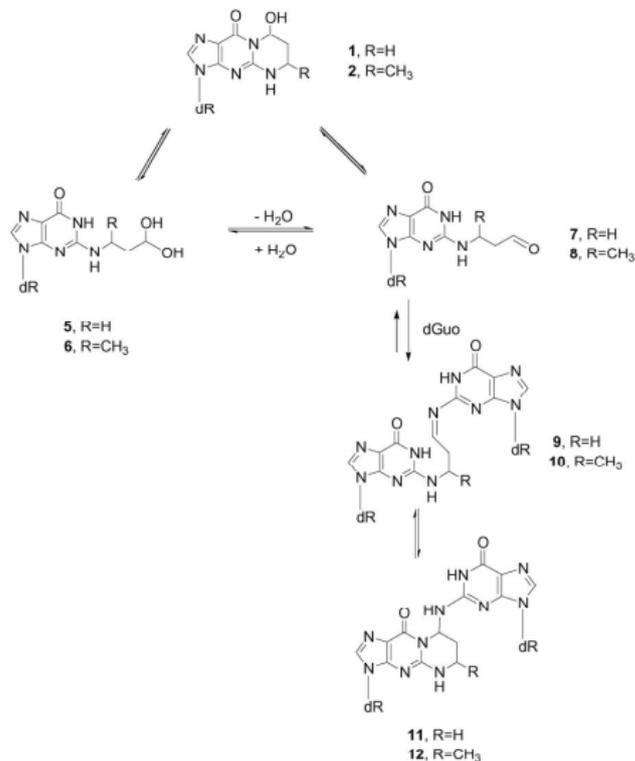
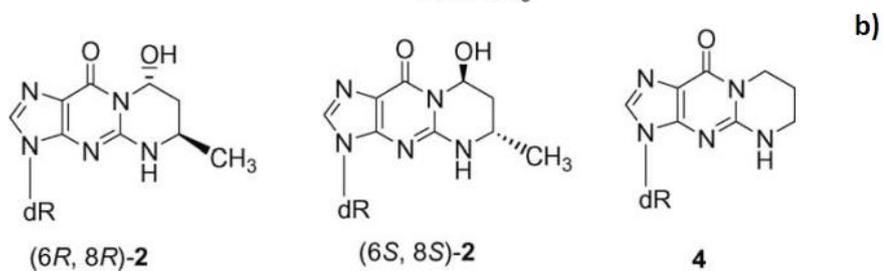
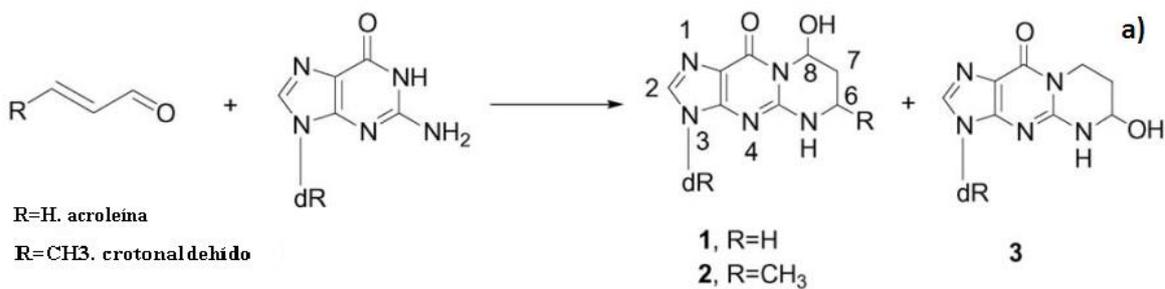


Figura 7. a). Formación de aductos PdG en reacciones de acroleína o cronotaldehído con desoxiguanosina o DNA. dR representa a la 2'-desoxirribosa. b). Estructuras de las configuraciones (6R,8R) y (6S,8S) tal como un modelo no sustituido del aducto PdG 4. c). Interconversión entre monoaductos de anillos cerrados (1 y 2), monoaductos exocíclicos de anillos abiertos (5-8) y ECC (9-12). Imágenes tomadas de Stein *et al*, 2006.

I.VI. Las endonucleasas permiten el procesamiento de los ECC.

Las endonucleasas son enzimas hidrolasas que generan rupturas de enlaces fosfodiéster localizados en el interior de una cadena de polinucleótidos, por lo que no requieren un extremo libre, es decir, pueden realizar cortes en ambas hebras al interior de la cadena de DNA (Devlin, 2004). La reparación de la mayoría de las formas de daño en el genoma requiere de un corte en el DNA, proceso catalizado por endonucleasas específicas de estructura (EEE), estas enzimas son reclutadas solamente cuando son requeridas para la reparación del DNA.

Uno de los pasos más importantes en la vía FA/BRCA consiste en la generación de una RDH como intermediario de reparación durante el procesamiento de los ECC. Esto solo lo puede llevar a cabo una endonucleasa de DNA que corte en un sitio cercano al ECC, lo que permitirá remover el ECC y activar alguna de las vías de reparación mencionadas anteriormente.

Se sabe que el complejo AF es necesario para activar proteínas como la endonucleasa FAN1 y la proteína SLX4, la cual funciona como un cinturón de herramientas para diferentes endonucleasas como SLX1, MUS81 y XPF, por lo que podría esperarse que en la AF estas endonucleasas no se recluten y los ECC no se procesen hacia RDH; sin embargo en las células AF las RDH sí se

observan después de la exposición a agentes inductores de ECC, indicando que existió actividad endonucleolítica por parte de endonucleasas alternas de reparación o vías alternas de activación de las endonucleasas canónicas de la vía FA/BRCA, tal como cambios en la expresión de sus genes.

A continuación se describen distintas endonucleasas que pueden participar en la reparación del DNA en respuesta a un ECC.

I.VI.I. SLX4/FANCP.

SLX4 es un regulador importante de las EEE, es una proteína que se encuentra altamente conservada (Svendsen y Harper, 2010; Coulon *et al.*, 2004; Fricke y Brill, 2003). Estudios sugieren que SLX4 ejerce su función en la estabilidad genómica por medio de la interacción y la regulación de tres diferentes EEE, a través de diferentes regiones no solapantes, XPF-ERCC1, MUS81-EME1 y SLX1 (Fekairi *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009). SLX4 contiene varios módulos de interacción proteína-proteína: dos dominios de dedos de zinc C2HC (UBZ4) C-terminales; una región de interacción ME19^{XPF} que se une al complejo nucleasa XPF-ERCC1; un motivo SAP necesario para la unión al dímero MUS81-EME en la región central; y un dominio conservado C-terminal que se encuentra implicado en la interacción con la endonucleasa SLX1 (Fekairi *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009).

SLX4 interactúa también con diversas proteínas como MSH2-MSH3, un complejo de reconocimiento de la reparación de bases mal apareadas, ERCC4-

ERCC1 (estos dos en la región N-terminal de SLX4 (Andersen *et al.*, 2009; Fekairi *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009)) y algunos componentes del complejo Shelterina de los telómeros (Svendsen *et al.*, 2009). Se ha propuesto que el heterodímero SLX1-SLX4 es una resolvasa de las uniones de Holliday (Fekairi *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009), lo que sugiere que SLX4 puede tener un papel adicional en la recombinación meiótica (RM).

Estudios previos (Svendsen y Harper, 2010; Zhang *et al.*, 2009; Dendouga *et al.*, 2005) demostraron que las tres interacciones de SLX4 con EEE participan en la reparación de ECC. SLX4 es fosforilada por la cinasa ATR (Crossan *et al.*, 2011). SLX4 ha sido renombrado FANCP, debido al descubrimiento de mutaciones bialélicas en seis pacientes con AF (Kim *et al.*, 2009; Stoepker *et al.*, 2011).

I.VI.II XPF/ERCC4.

XPF-ERCC1 es una endonucleasa de DNA que corta una hebra de DNA dañado en el lado 5' de la lesión durante la NER (Sijbers *et al.*, 1996; Tsodikov *et al.*, 2005), además interviene en la RRH (Niedernhofer *et al.*, 2001) y en la reparación de ECC (Busch *et al.*, 1997; Kuraoka *et al.*, 2000; Niedernhofer *et al.*, 2004). XPF funciona obligadamente como heterodímero con ERCC1, aunque XPF es la que contiene el sitio funcional de nucleasa (Enzlin y Scharer, 2002; Heyer *et al.*, 2003), que consta de tres dominios (Aravind *et al.*, 1999; Sgouros *et al.*, 1999) (tabla 1). Un dominio tipo helicasa N-terminal de XPF (residuos 4-457) es homólogo a la superfamilia II de helicasas, pero carece de

varios residuos clave requeridos para la actividad de desenrollamiento de DNA. Este dominio puede contribuir a la actividad de unión, aunque su función no ha sido examinada a detalle. El dominio central nucleasa de XPF (residuos 656-813) alberga residuos conservados de unión a metales de un motivo [V/I] ERKX₃D así como residuos básicos que presumiblemente interactúan con sustratos de DNA (Enzlin y Scharer, 2002). El dominio de dimerización helice-horquilla-helice C-terminal en tándem (HhH₂) de XPF (residuos 837-905) dimeriza específicamente con ERCC1 para formar la nucleasa funcional y adicionalmente puede contribuir a la unión al DNA (de Laat *et al.*, 1998; Doherty *et al.*, 1996). La subunidad ERCC1 consta únicamente de dos dominios, un dominio central conservado (residuos 96-214) que es estructuralmente similar al dominio nucleasa de XPF, pero desprovisto de residuos característicos de un dominio nucleasa (Gaillard y Wood, 2001). El dominio HhH₂ C-terminal de ERCC1 (residuos 220-297) dimeriza con el equivalente de XPF y puede unirse al DNA.

De manera reciente se dio a conocer a *XPF* como un gen de AF (Bogliolo *et al.*, 2013; Kashiyama *et al.*, 2013), siendo así, el decimo sexto gen confirmado en pacientes, mutado en los pacientes que pertenecen al grupo de complementación *FANCC*, por lo que el gen ha sido renombrado *XPF/FANCC*.

I.VI.III. FAN1.

FAN1 es una nucleasa que posee actividad de endonucleasa en estructuras tipo extremo saliente 5' (flap 5), y actividades de exonucleasa 5'-3' en estructuras tipo extremo saliente 3' (flap 3) (Smogorzewska *et al.*, 2010). FAN1 es reclutada a los sitios de daño al DNA por el complejo FANCI/FANCD2 monoubiquitinado. FAN1 posee un pliegue tipo nucleasa llamado DUF994 en su región C-terminal, motivos potenciales de unión al DNA (SAP) e interacción proteína-proteína, un dominio TPR en su sección media, y un dominio de dedos de zinc en la región N-terminal (dominio UBZ) (Kinch *et al.*, 2005).

Smogorzewska *et al.* (2010) encontraron que FAN1 se encuentra asociado con diversas proteínas de la reparación por error de apareamiento, tales como MLH1, MLH3, PMS1 y PMS2.

FAN1 se caracteriza por colocalizar en los sitios de daño al DNA, junto con FANCD2, para lo cual es crítico el funcionamiento adecuado de su dominio UBZ, aunque no es el único que participa (Smogorzewska *et al.*, 2010).

I.VI.IV. SLX1.

SLX1 es un miembro de la familia de endonucleasas UvrC. La familia UvrC funciona junto con UvrAB en la NER y emplean un dominio GIY (llamado también dominio URI) N-terminal para hacer una incisión de 3 a 4 nucleótidos

hacia el lado 3' del sitio de daño (Svendsen y Harper, 2010). El ortólogo de SLX1 en humano posee afinidad por estructuras de tipo extremo saliente 5', además de poseer una actividad de resolvasa en uniones de Holliday (Fekairi *et al.*, 2009). El dominio GIY contiene varios residuos conservados, incluyendo un glutamato, el cual resulta crítico para la unión de un catión divalente (magnesio o manganeso) al sitio activo; tres residuos de tirosina o histidina (Y19, Y29 y Y43 en UvrC), que forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua coordinadas al ión metálico, y un residuo de arginina completamente conservado (R39 en UvrC), que puede estabilizar la carga negativa sobre el grupo fosfato en el enlace escindible (Truglio *et al.*, 2005). A diferencia de otros miembros de la familia UvrC, los ortólogos de SLX1 contienen también un dominio C-terminal rico en cisteínas semejante a los dominios PHD de unión a zinc (Fricke y Brill, 2003; Coulon *et al.*, 2004).

El complejo SLX1-SLX4 en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* muestra una actividad de nucleasa de DNA estructura específica *in vitro*, estos complejos no son capaces de cortar DNA lineal, de cadena sencilla, de cadena doble, así como tampoco ramificaciones simples 3' o 5'; en contraste, existe una fuerte preferencia por estructuras de DNA ramificado, tales como horquillas en forma de Y, extremos salientes 3' o 5' y horquillas de replicación, pero presenta niveles mucho más bajos de actividad hacia uniones de Holliday estáticas (Coulon *et al.*, 2004; Fricke y Brill, 2003).

I.VI.V. MUS81.

MUS81 es una endonucleasa que participa en el proceso de conversión de los ECC a RDH (Hanada *et al.*, 2006), forma un heterodímero con EME1 o con MMS4 y puede anclarse eficientemente a estructuras tales como extremo saliente 3', D-loops, horquillas de replicación y uniones de Holliday (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Kaliraman *et al.*, 2001; Bastin-Shanower *et al.*, 2003; Ciccina *et al.*, 2003; Gaillard *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2007). Se piensa que MUS81-EME1 es la endonucleasa responsable de la incisión en el lado 3' del ECC (Hanada *et al.*, 2007; Hanada *et al.*, 2006). Se ha mostrado que el complejo MUS81-EME1 se une más eficientemente a uniones de Holliday que a las horquillas de replicación o estructuras tipo extremo saliente 3 (Chang *et al.*, 2008).

Chang *et al.* (2008) determinaron la estructura de un complejo similar a MUS81-EME1 humano, con la diferencia de que la proteína MUS81 era un homólogo obtenido de pez zebra (zMUS81). Tanto zMUS81 como EME1 poseen un dominio α/β nucleasa en la región N-terminal y dos repetidos del motivo HhH en la región C-terminal (dominio HhH2). En zMUS81 ambos dominios están conectados por una hélice (Tabla1) en un dominio nucleasa y un loop con cuatro residuos, formando así una estructura compacta, mientras que en EME1, estos dominios están conectados por un enlace extendido con una hélice y dos loops, formando una estructura más extendida. Se ha mostrado que las proteína MUS81 y EME1 de *S.pombe* interactúan vía sus regiones C-terminal (Boddy *et al.*, 2001). La región C-terminal de MUS81 a su

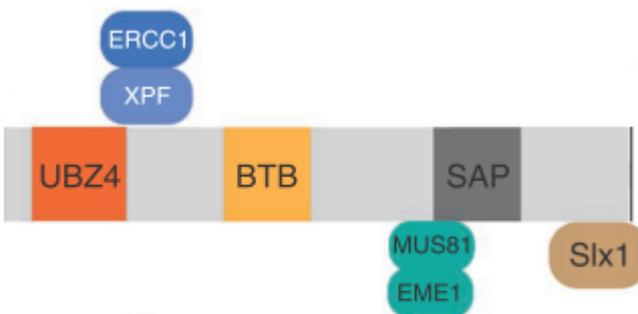
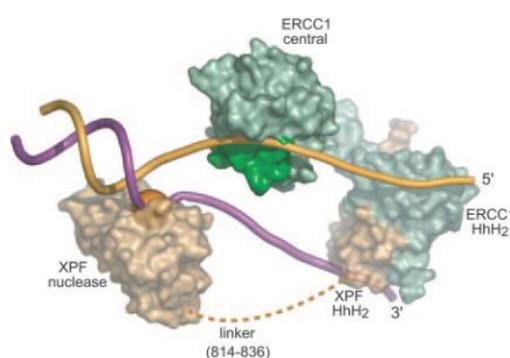
vez, está relacionada con las regiones C-terminal de las proteínas RAD1 de *S. cerevisiae* y XPF humana (Ciccia *et al.*, 2003).

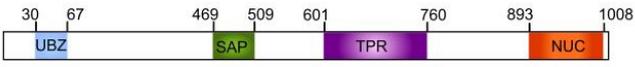
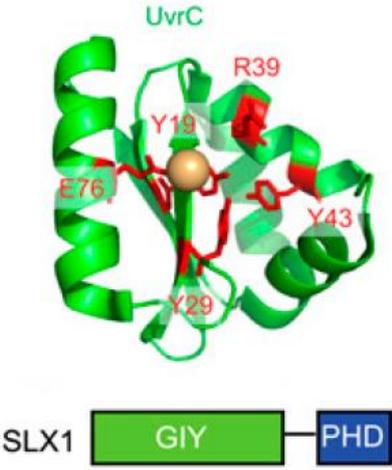
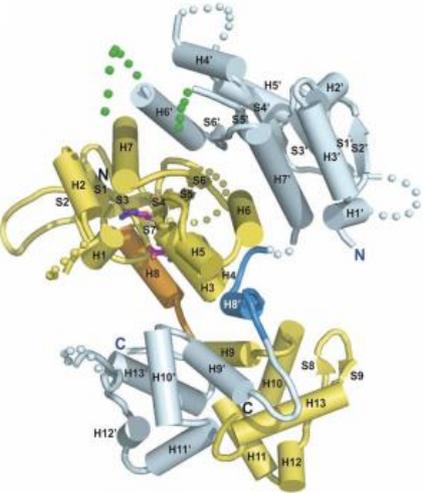
En la siguiente tabla se muestran datos relevantes sobre los genes utilizados en la realización de este trabajo.

Tabla 1. Genes utilizados en los ensayos de qRT-PCR.

Símbolo	Nombre oficial	Locus
<i>SLX4</i>	SLX4 Structure-Specific Endonuclease Subunit	16p13.3
<i>XPF</i> , <i>ERCC4</i>	Excision Repair Cross-Complementation Group 4	16p13.12
<i>FAN1</i>	FANCD2/FANCI-Associated Nuclease 1	15q13.2
<i>MUS81</i>	MUS81 Structure-Specific Endonuclease Subunit	11q13.1
<i>SLX1</i>	SLX1 Structure-Specific Endonuclease Subunit	16p11.2
<i>RN7SL1</i>	RNA, 7SL, Cytoplasmic 1	14q21.3
<i>ACTB</i>	Actin, Beta	7p22.1
<i>B2M</i>	beta-2-microglobulin	15q21.1

Tabla 2. Tabla comparativa entre cinco endonucleasas (SLX1, SLX4, FAN1, XPF y MUS81) que están o pudiesen estar involucradas en la vía FA/BRCA.

Endonucleasa	Posición de corte en el ECC	Proteína con la que forma complejo	Procesos en los que participa	ESTRUCTURA
SLX4	-----	MUS81 XPF SLX1 MSH2-MSH3 ERCC4- ERCC1 C20ORF94 TRF2 hSNM1B/Apollo	RRH RM Vía FA/BRCA Mantenimiento de los telómeros	 <p>Imagen modificada de Crossan <i>et al.</i>, 2011.</p>
XPF	5'	ERCC1 SLX4	NER RRH Vía FA/BRCA	 <p>Imagen tomada de Tsodikov <i>et al.</i>, 2005.</p>
FAN1	5'	-----	Vía FA/BRCA Reparación	

			por error de apareamiento	 <p>Imagen tomada de Smogorzewska <i>et al.</i>, 2010.</p>
SLX1	5'	SLX4	RRH REN RM	 <p>Imagen modificada de Svendsen y Harper, 2010.</p>
MUS81	3'	EME1 SLX4	RRH Vía FA/BRCA	 <p>Imagen tomada de Chang <i>et al.</i>, 2008.</p>

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para que un ECC sea reparado se requiere que la vía FA/BRCA lo detecte y genere una RDH como intermediario de reparación. Se sabe que las células AF no son capaces de producir RDH por medio de la vía FA/BRCA, sin embargo al tratarlas con agentes alquilantes bifuncionales se generan RDHs, lo que evidencía que los ECC fueron procesados para ser reparados, aunque al final la reparación no se haya llevado a cabo apropiadamente. Esto indica que existen endonucleasas alternas de reparación o que las endonucleasas canónicas podrían ser activadas por mecanismos compensatorios alternos a la vía FA/BRCA, entre los que podríamos incluir cambios en la expresión de sus genes.

III. ANTECEDENTES DIRECTOS

Recientemente nuestro grupo de trabajo reconstruyó un modelo computacional de tipo booleano (MB) sobre la regulación de la vía FA/BRCA (Rodríguez *et al.*, 2012). En dicho trabajo se menciona que las células con deficiencias en la vía FA/BRCA son capaces de progresar a través de ciclo celular, como una posible explicación a esto se contemplaron dos posibilidades: 1) la existencia de vías alternas de reparación y 2) que existan defectos en los puntos monitoreo de la integridad del DNA, permitiendo así la supervivencia de la célula. Con este modelo se realizaron simulaciones del proceso de reparación de diferentes tipos de daño al DNA: ECC, RDH y aductos en el DNA, así como la activación de proteínas de los puntos de monitoreo que se observan en daño recurrente al DNA en condiciones tipo silvestre y con diferentes mutaciones en la vía FA/BRCA.

En este modelo, entre otras cosas, se propone que la endonucleasa XPF podría activarse por un mecanismo alternativo a la vía FA/BRCA, presentando una actividad 5' endonucleasa (Kuraoka *et al.*, 2000), al igual que FAN1 (MacKay *et al.*, 2010) y que los cambios en sus niveles de expresión podrían favorecer su participación en el procesamiento de los ECC.

La corroboración de las predicciones obtenidas con este MB se ha vuelto uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo, dentro de lo que se incluye verificar si efectivamente las EEE, como XPF, muestran cambios en sus niveles de expresión en las células AF expuestas a agentes inductores de ECC. Este último punto fue abordado en el presente trabajo.

IV. JUSTIFICACIÓN

La AF es una enfermedad rara que puede considerarse como un modelo genético para el estudio molecular de la reparación de los ECC en el DNA y el estudio de la hematopoyesis normal y patológica como la pancitopenia, el síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide (D'Andrea y Grompe, 2003). Hasta el momento no existen trabajos que reporten expresión diferencial de endonucleasas que participen en el procesamiento inicial de los ECC en las células AF, por lo que, conocer si existe o no una expresión diferencial de estas endonucleasas ayudará a comprender mejor la enfermedad, en concreto los mecanismos iniciales de respuesta al daño al DNA por ECC en las células.

V. HIPÓTESIS

La activación de la expresión génica de endonucleasas alternas a la vía FA/BRCA podría colaborar en el procesamiento de los ECC en las células con AF.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen cambios en la expresión génica de los mRNAs de *XPF*, *SLX1*, *SLX4*, *FAN1* o *MUS81* que correlacionen con la generación de RDHs en las células AF del grupo de complementación A (AF-A).

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Determinar si existe una correlación entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por MMC y las distintas fases del ciclo celular para conocer en cuál de ellas se lleva a cabo la reparación de dichas lesiones, así como si existe una diferencia en esto entre células normales y deficientes para la vía FA/BRCA.

Observar si los cambios en la expresión de los mRNA de *XPF*, *SLX1*, *SLX4*, *FAN1* y *MUS81* junto con el análisis del ciclo celular y la frecuencia de aberraciones cromosómicas sugieren una vía alterna a la vía FA/BRCA para la reparación de ECC en células deficientes en ella.

VIII. MÉTODO.

En la Figura 8 se muestra un esquema En el cual se muestra de manera resumida el diseño experimental del presente trabajo.

Líneas celulares.

Se utilizaron dos líneas celulares linfoblastoides de linaje B inmortalizadas con el virus de Epstein Barr:

- 1) La línea celular VU817 derivada de un paciente con AF-A (eficiente en la proteína FANCA).
- 2) La línea celular NL49 derivada de un donador sano (Eficiente en la vía FA/BRCA).

VIII.I. Cultivo celular y tratamientos.

Las líneas celulares linfoblastoides fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina (CAS 56-85-9), 1% de piruvato de sodio (CAS 113-24-6), 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de gentamicina (CAS 1405-41-0) (todos de Gibco, Carlsbad, CA, USA). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37° C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Para los cultivos experimentales las células se utilizaron cuando la viabilidad fue al menos de 95%. Se sembraron 300,000 células/ml y se trataron con 10 ng/ml de MMC (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA, CAS 50-07-7) y se mantuvieron durante 24 horas.

Para los análisis de ciclo celular y expresión génica se realizaron cosechas de 3 millones de células cada 6 horas y se contó con un control negativo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

VIII.II. Análisis de aberraciones cromosómicas.

Se utilizaron 1.5 millones de células por cultivo. El análisis de aberraciones cromosómicas se llevó a cabo 24 horas después del tratamiento. Para el análisis de aberraciones cromosómicas se adicionó colchicina (CAS 64-86-8) en una concentración de 0.1 µg/ml una hora antes de la cosecha, se incubó a las células con solución hipotónica (KCl, CAS 7447-70-7) 0.75M durante media hora y se llevó a cabo la cosecha con fijador Carnoy (metanol (CAS 67-56-1): ácido acético (CAS 64-19-7), 3:1). Posteriormente se realizaron laminillas y se tiñeron con tinción de Wright (CAS 68988-82-1) y Giemsa (CAS 51811-82-6) para el análisis en microscopia de campo claro. Se cuantificaron la frecuencia de aberraciones cromosómicas de tipo rupturas cromatídicas, rupturas cromosómicas y las figuras de intercambio radial.

VIII.III. Citometría de flujo.

Para conocer la distribución en el ciclo celular de las células en cultivo se tomaron muestras de ambas líneas celulares a las 6, 12, 18 y 24 horas después de la adición de la MMC (CAS 50-07-7). Las muestras se lavaron con 1 ml de PBS (CAS 10049-21-5), se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm y se fijaron con etanol (CAS 64-17-5) al 70% frío. Posteriormente se dio un

lavado con PBS (CAS 10049-21-5) y se agregó a cada muestra 1 ml de solución teñidora de Yoduro de propidio (IP) (1µl de tritón 100X (CAS 9002-93-1), 10 µl de solución de IP (CAS 25535-16-4), 1µl de RNAsa (CAS 9001-99-4) y 988 µl de PBS (CAS 10049-21-5)). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Becton-Dickinson FACSCan y se adquirieron un total de 20,000 eventos para el análisis. Los datos fueron analizados usando el software CellQuest.

VIII.IV. Extracción de RNA.

Las células fueron lavadas dos veces con PBS (CAS 10049-21-5)-DEPC (CAS 1609-47-8) (dietilpirocarbonato) y centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm. El RNA total se obtuvo utilizando el método combinado de TRIzol (invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguido del kit RNAeasy mini procedure (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA total se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNase (Qiagen, Valencia, CA, USA, CAS 7732-18-5) y posteriormente se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

El RNA total purificado se almacenó a -80°C. Antes de realizar la transcripción inversa se trató 1 µg de RNA total con 0.1 U de RNase-free DNase I (invitrogen, Carlsbad, CA, USA, CAS 9003-98-9) en Tris-HCl (CAS 1185-53-1) 20mM, pH 8.3, KCl (CAS 7447-40-7) 50mM y MgCl₂ (CAS 7786-30-3)1mM por 15 minutos a temperatura ambiente, deteniendo la reacción con EDTA (60-00-

4) a una concentración final de 1mM, para desnaturalizar la enzima se incubó a 60°C por 10 minutos.

VIII.V. Transcripción reversa a cDNA o Síntesis de cDNA.

El RNA total fue retrotranscrito a cDNA, usando el Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany), usando para cada ensayo 50-pmol/μl de primer Oligo-dT, 600 pmol/μl de Random hexamer primer, 20 U de Protector RNase Inhibitor y 10 U de Transcriptor Reverse Transcriptase. El cDNA obtenido fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND 1000. La qRT-PCR se realizó en muestras de cDNA utilizando 2μg de cDNA por reacción.

VIII.VI. qRT-PCR (del inglés quantitative Real Time-PCR).

La qRT-PCR se realizó con el sistema Universal Probes (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) y el kit Light Cycler Taq Man Master (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) en un equipo Light Cycler 2.0 Carousel Roche utilizando las siguientes condiciones: Desnaturalización: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, PCR: 1 ciclo a 95°C por 10 segundos, 1 ciclo a 60°C por 30 segundos y 1 ciclo a 72°C por 5 segundos, para un total de 45 ciclos; finalmente una fase de enfriamiento que constó de un ciclo a 40°C por 30 segundos.

Los niveles de expresión para cada una de las endonucleasas fue calculado con la fórmula de expresión relativa (R) propuesta por Pfaffl (2006) y Fleige *et*

al. (2006). Los genes de referencia utilizados fueron: *7SL*, un RNA no codificante el cual forma parte de la partícula de reconocimiento de señal, una ribonucleoproteína que participa en la destinación intracelular de proteínas, *B2M* (β_2 microglobulin), una proteína que forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1, un complejo presente en casi todas las células nucleadas encargado de la presentación de antígenos a los linfocitos T, así como *β -actina*, una de las dos actinas citoesqueléticas no musculares, y está involucrada en la estructura, integridad y motilidad celular. Estos fueron utilizados para calcular la expresión relativa, utilizando la siguiente fórmula.

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_p} = 2^{-[Gen\ problema(C_{p\ tratado} - C_{p\ no\ tratado})] - [Gen\ referencia(C_{p\ tratado} - C_{p\ no\ tratado})]}$$

Los primers para cada gen fueron diseñados en línea con el software ProbeFinder (www.universalprobelibrary.com) y se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT, UNAM.

VIII.VII. Análisis Estadístico.

Se utilizó el software Prism 6 for MAC OS (<http://www.graphpad.com>) para el análisis estadístico. Se calculó la media y el error estándar para cada experimento. El análisis de las pruebas de ANOVA y la prueba de Tukey se llevaron a cabo para hacer comparaciones entre grupos y los valores de p fueron considerados significativos si $p < 0.05$.

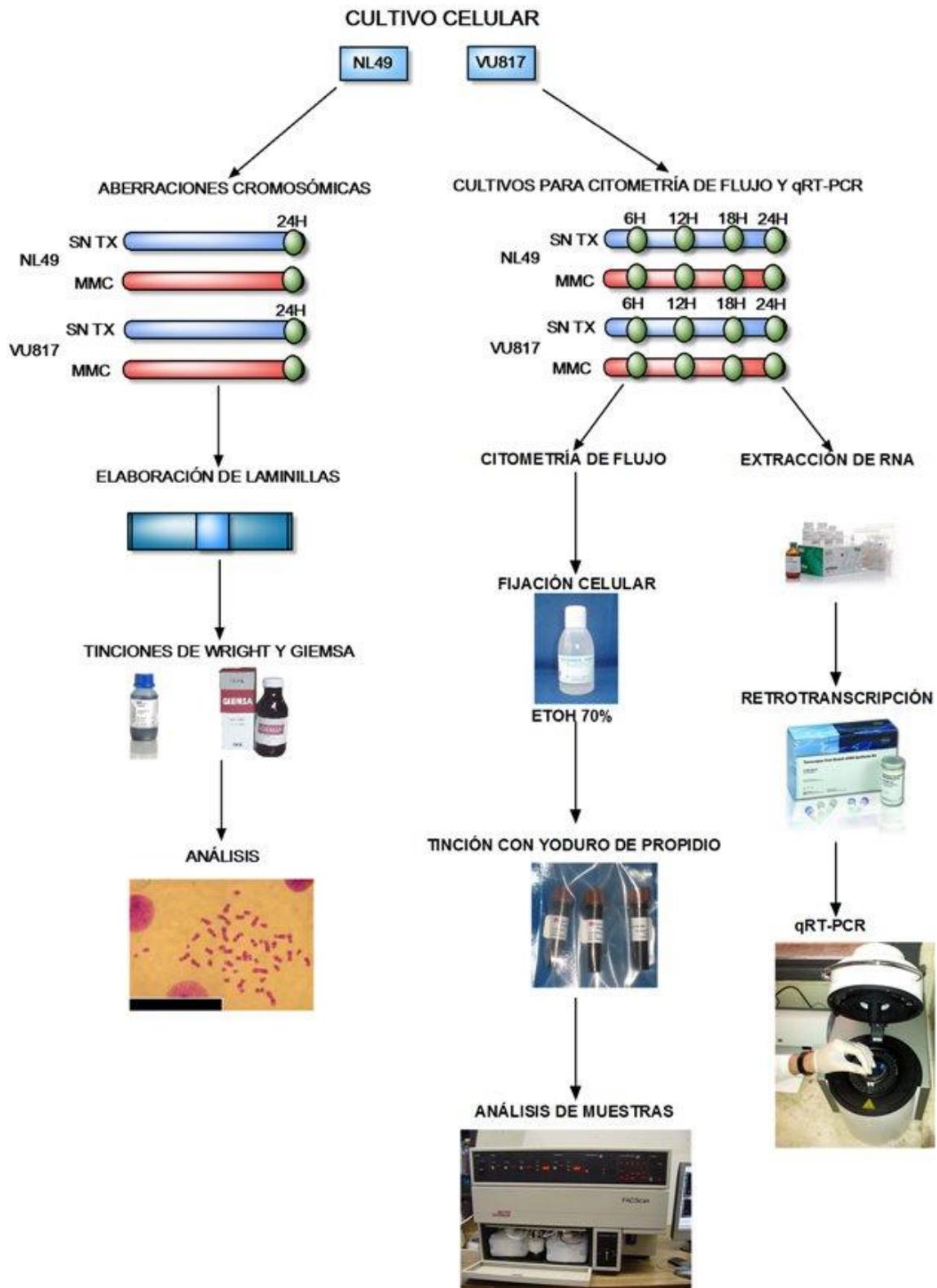
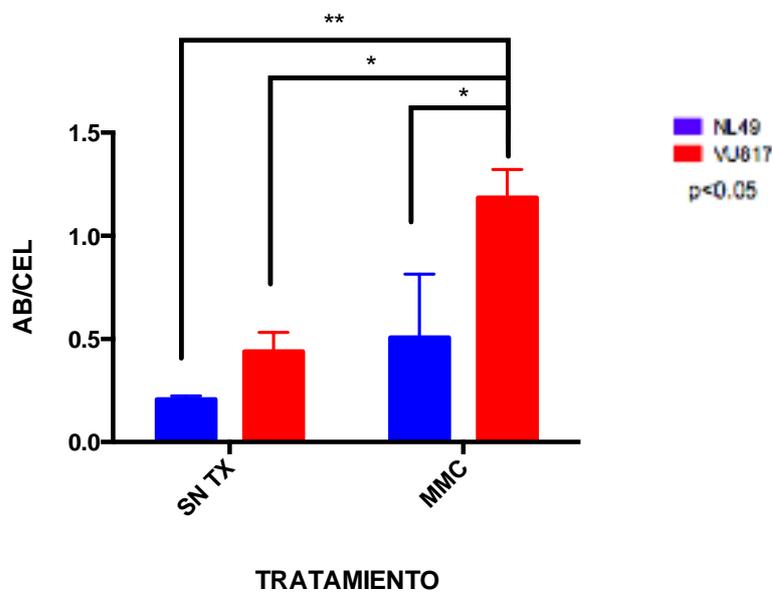


Figura 8. Diseño experimental. En la parte izquierda se muestra de manera resumida el análisis de aberraciones cromosómicas, en el centro el ensayo del ciclo celular por citometría de flujo y en el centro la qRT-PCR.

IX. RESULTADOS.

IX.I. Análisis de aberraciones cromosómicas.

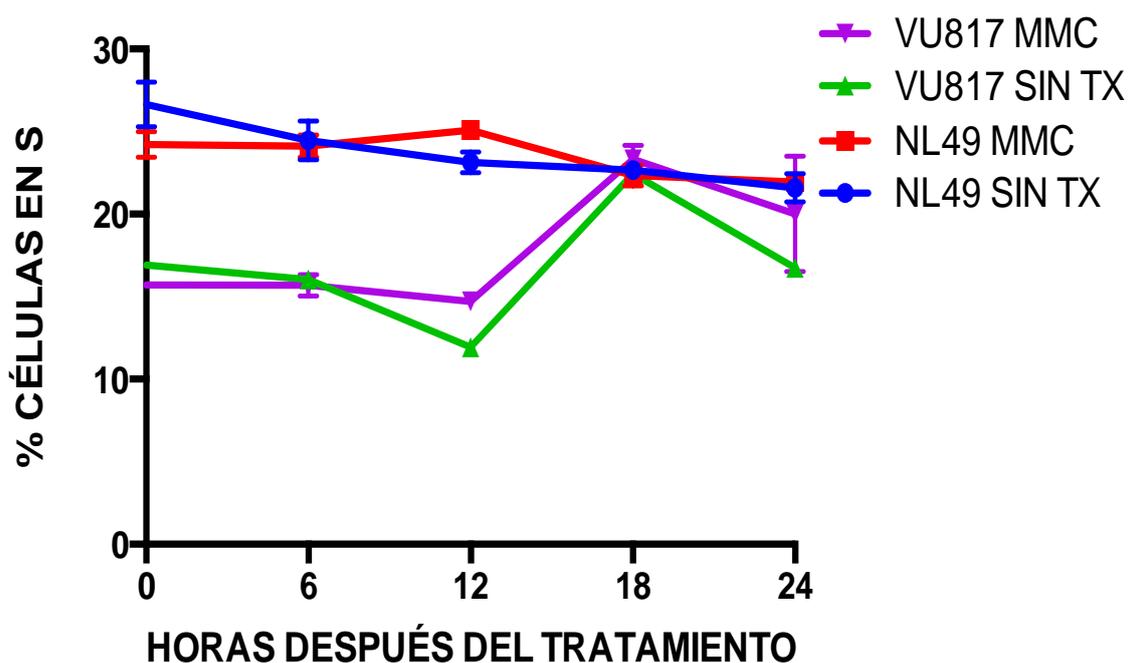
Al analizar la frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula en los diferentes cultivos se observó que las células VU817 expuestas a MMC presentaron una mayor cantidad de aberraciones cromosómicas que el resto de los cultivos, al realizar las comparaciones, dicha diferencia fue estadísticamente significativa en todos los casos (Gráfica 1), mostrando una diferencia mayor al comparar con las células NL49 sin tratamiento (SN TX). Estos resultados indican que las células AF-A, a pesar de ser deficientes en la vía FA/BRCA, son capaces de llevar a cabo el procesamiento inicial de los ECC generados por la MMC, sugiriendo una vía alterna para generar los cortes en el material genético.



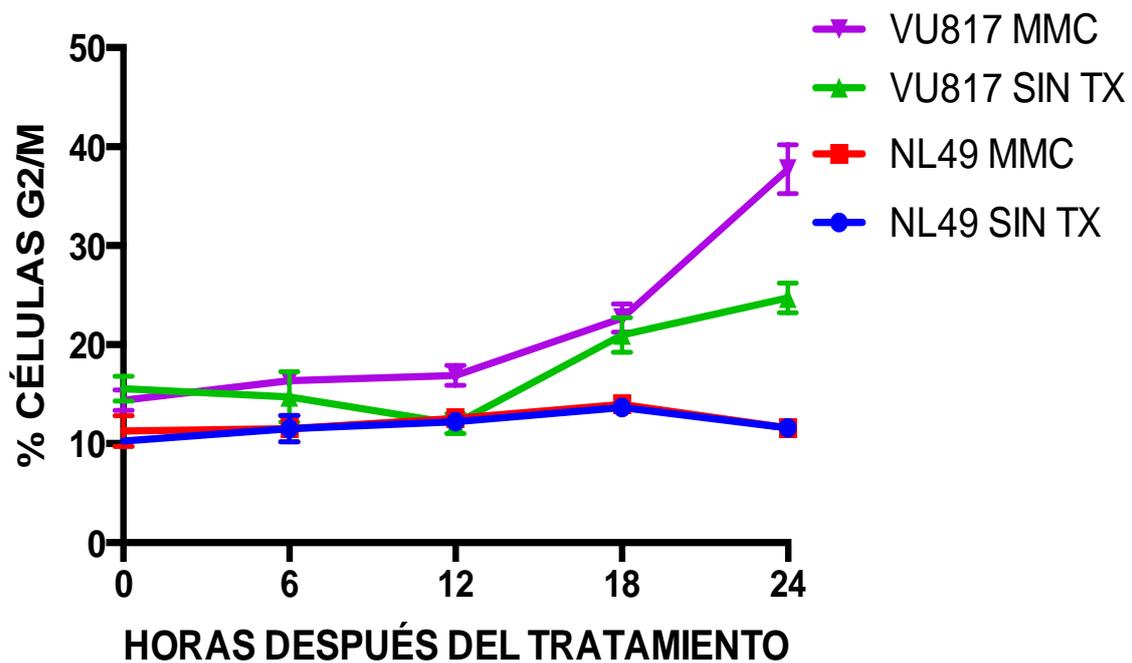
Gráfica 1. Frecuencia de aberraciones cromosómicas.

IX.II. Análisis de distribución en el ciclo celular.

El análisis de distribución en el ciclo celular realizado por medio de citometría de flujo mostró que las 18 horas fue el punto de mayor acumulación de células AF en la fase S del ciclo celular en ambas condiciones experimentales (Gráfica 2). También se observó la acumulación característica de las células AF en la fase G2/M a partir de las 18 horas tanto en el cultivo tratado con MMC como en el que no fue tratado, aunque el incremento fue más evidente en las células tratadas con MMC. El aumento se sigue observando hasta las 24 horas de tratamiento que fue el tiempo de duración del estudio (Gráfica 3).



Gráfica 2. Acumulación de células en fase S.



Gráfica 3. Acumulación de células en fase G2.

IX.III. Análisis de la expresión de RNA mensajero.

En las tablas suplementarias (Apéndice) se muestran los datos del análisis de expresión relativa de los diferentes genes estudiados. La expresión relativa se obtuvo con respecto a tres genes de referencia (7SL, β -Actina y β 2M) expresados de modo constitutivo en las líneas celulares NL49 y VU817.

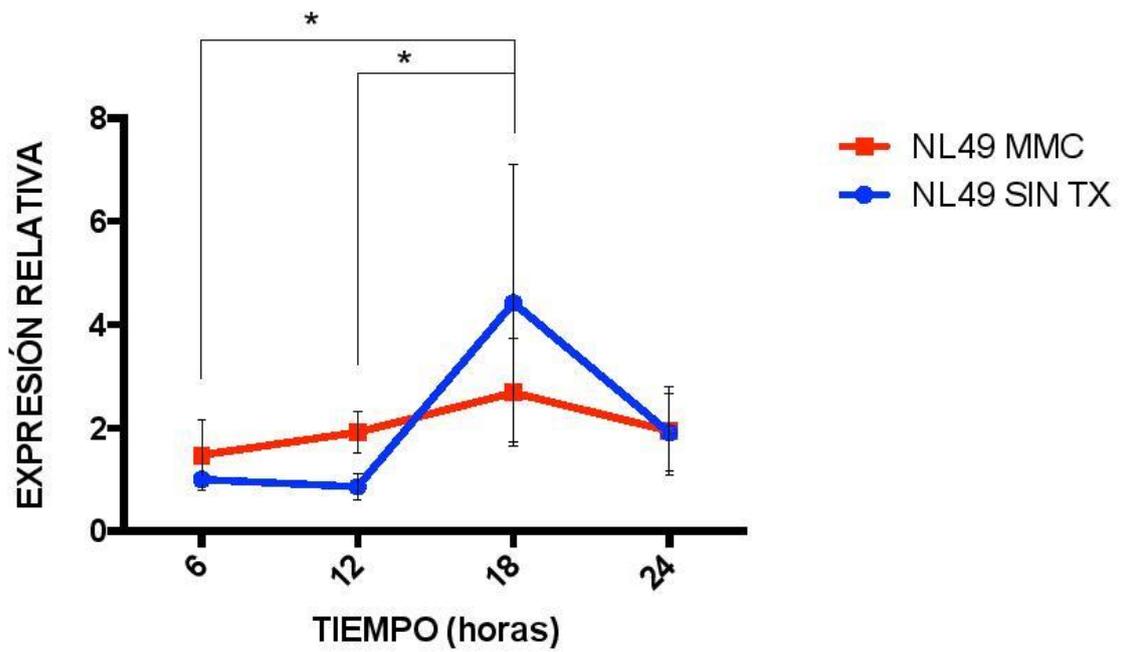
Para obtener la expresión relativa de cada gen de interés se aplicó la fórmula propuesta por Pfaffl (2006) y Fleige *et al.*, (2006) a los CP (del inglés *crossing point*) obtenidos en los ensayos de qRT-PCR. En esta fórmula se analizan los CP de un gen de referencia en condiciones control y experimentales contra el CP del gen de interés en condiciones control y experimentales. Posteriormente se obtiene el promedio del análisis realizado contra los tres genes de referencia en las diferentes condiciones experimentales y los diferentes tiempos en los

cuales se tomó la muestra para extracción del ácido ribonucleico (RNA) (6, 12, 18 y 24 horas posteriores al tratamiento con MMC).

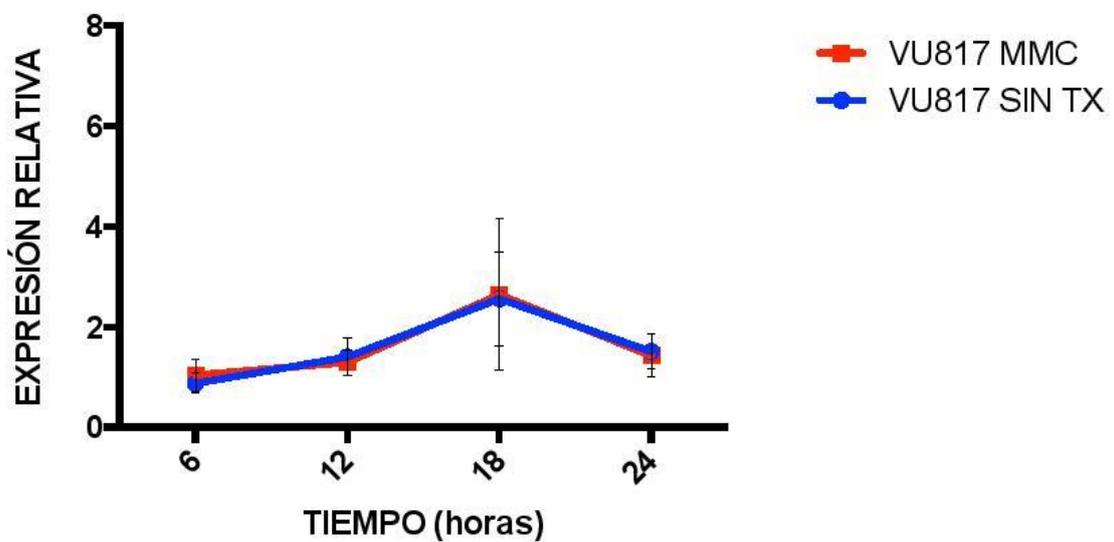
Para saber si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos en los que se analizó la expresión génica y si existían diferencias entre las dos líneas celulares se realizó un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de un factor combinado con una prueba de comparaciones múltiples (prueba de Tukey) con ayuda del software Prism 6 for MAC OS. Los datos fueron acomodados en columnas y renglones, siendo cada columna una condición experimental (control negativo o tratamiento con MMC) y cada renglón un tiempo (6, 12, 18 y 24 horas).

En las gráficas 4-17 se muestran los cambios en la expresión relativa del mRNA en los diferentes tiempos y condiciones experimentales para cada endonucleasa estudiada. En el eje X se muestra el tiempo en el que se se llevó a cabo cada ensayo (horas), mientras que en el eje Y se muestra la expresión relativa de los mismos.

SLX4: Se observó que en ambas líneas celulares la expresión relativa de *SLX4* aumenta a las 18 horas de tratamiento, aunque este aumento resultó estadísticamente significativo únicamente en las células NL49 (Gráficas 4 y 5). En ambos casos la MMC no indujo ningún cambio. No se encontró ninguna diferencia entre ambas líneas celulares.

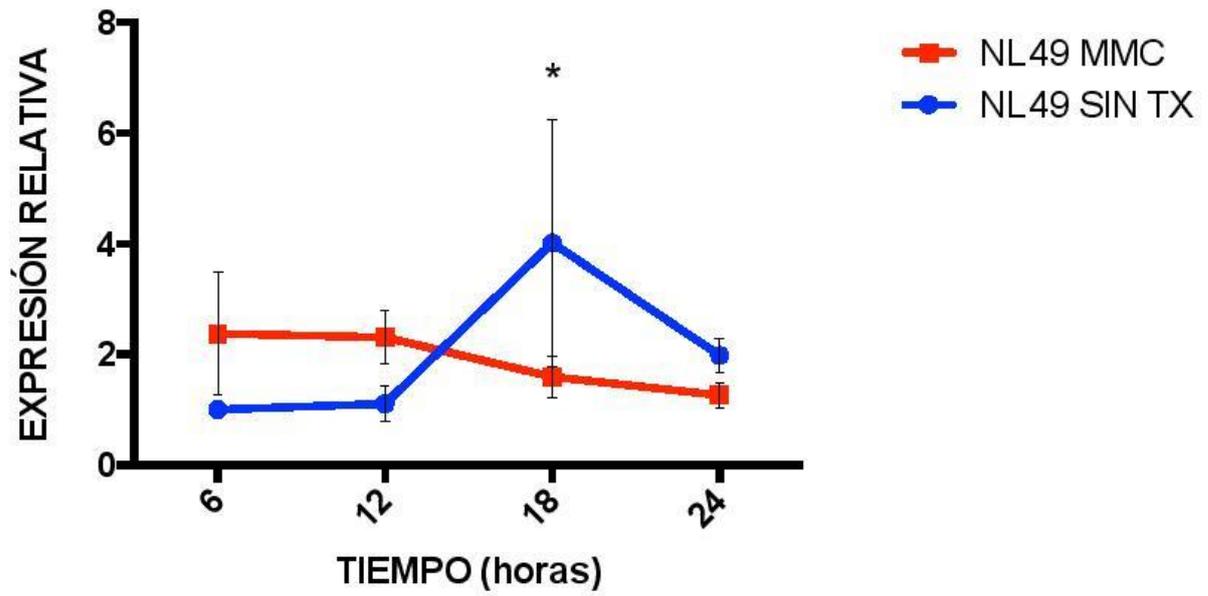


Gráfica 4. Expresión relativa de mRNA de *SLX4* en células normales.

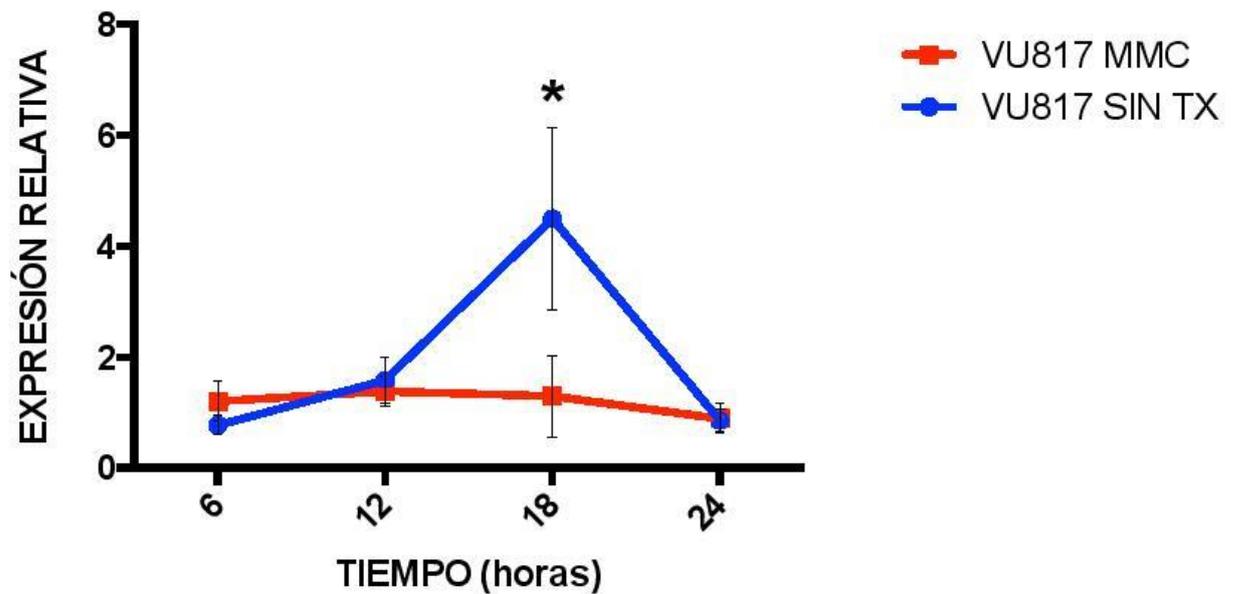


Gráfica 5. Expresión relativa de mRNA de *SLX4* en células AF-A.

XPF: Cuando se analizaron los datos de *XPF* se encontró un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de su mRNA a las 18 horas en ambas líneas celulares y se observó una disminución en los niveles de expresión del mRNA al ser tratados con MMC en ambas líneas celulares (Gráficas 6 y 7).

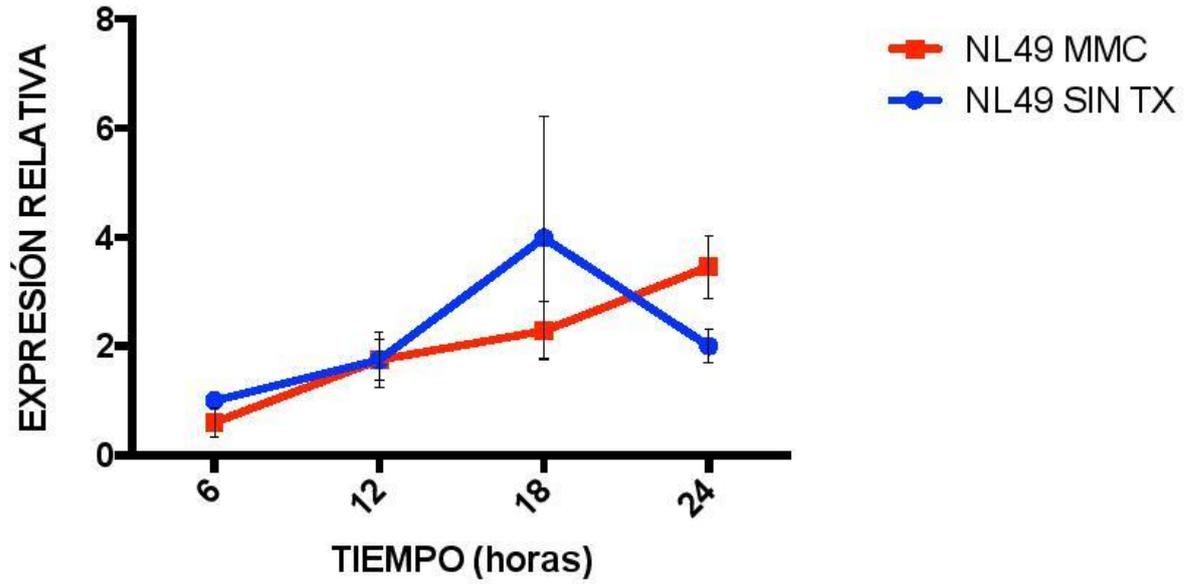


Gráfica 6. Expresión relativa de mRNA de *XPF* en células normales.

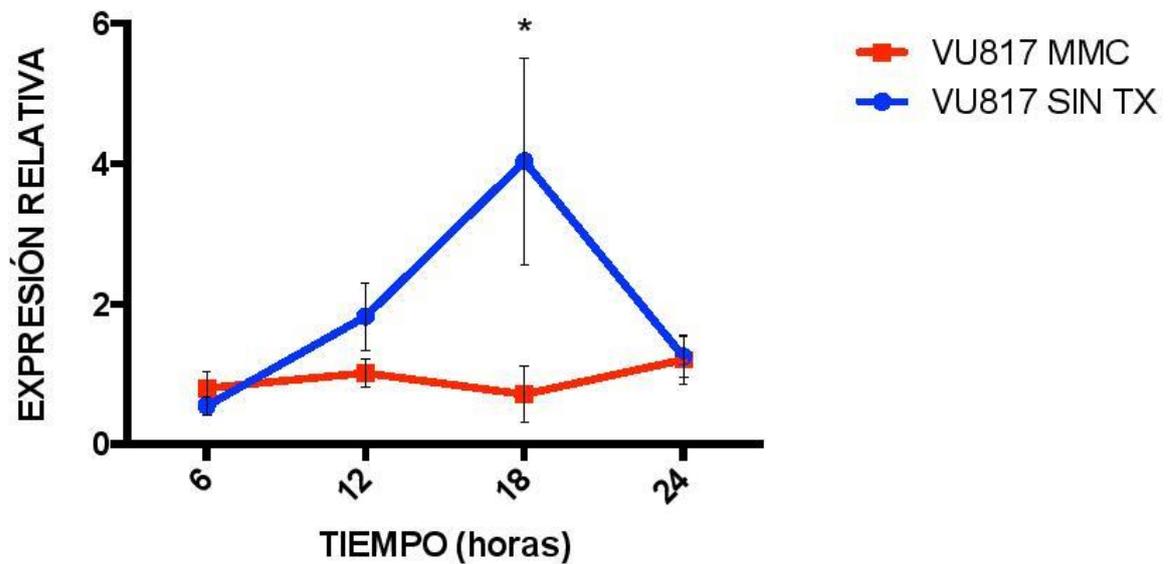


Gráfica 7. Expresión relativa de mRNA de *XPF* en células AF-A.

FAN1: El análisis de expresión relativa del mRNA de *FAN1* no mostró una diferencia estadísticamente significativa en las células normales en ninguna de las condiciones analizadas (Gráfica 8). En el caso de la línea celular AF-A VU817 se encontró que la MMC induce una reducción estadísticamente significativa en la expresión del mensajero de *FAN1* 18 horas después de iniciado el tratamiento (Gráfica 9). Cuando se realizó la comparación entre ambas líneas celulares se observó que el mRNA de *FAN1* incrementa sus niveles a las 18 horas después del inicio del cultivo y que en las células AF-A VU817 el tratamiento de MMC reduce su expresión de forma estadísticamente significativa cuando es comparada contra la línea normal y la línea AF-A.

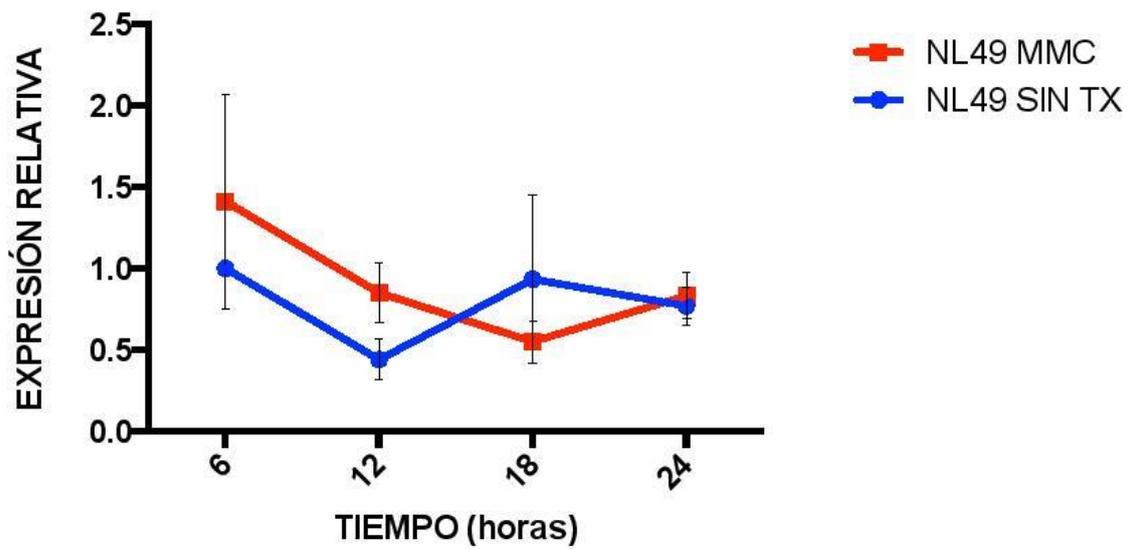


Gráfica 8. Expresión relativa de mRNA de *FAN1* en células normales.

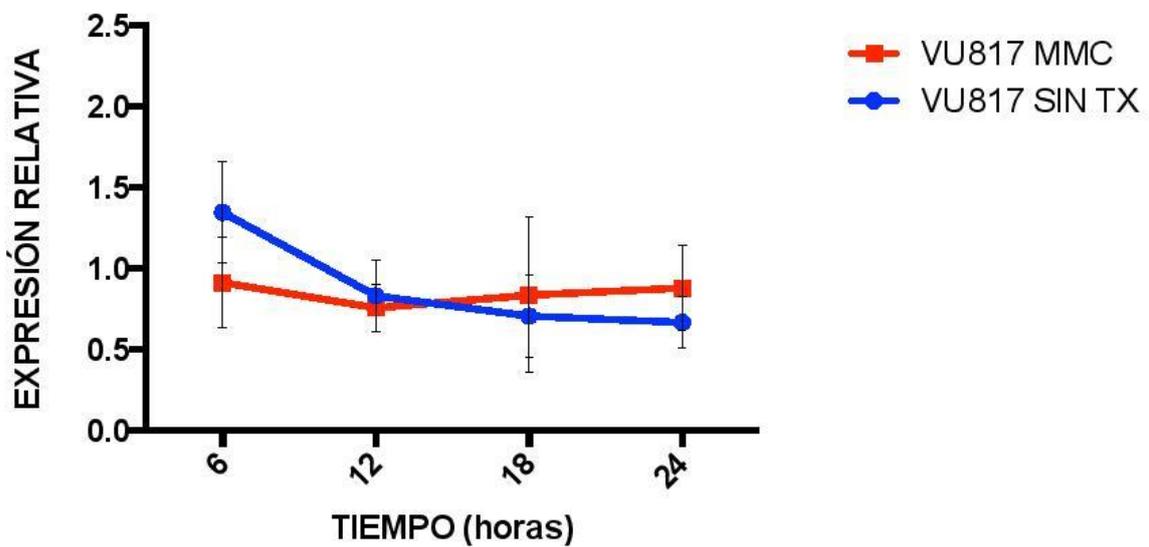


Gráfica 9. Expresión relativa de mRNA de *FAN1* en células AF-A.

SLX1: En el análisis de las diferentes comparaciones para la endonucleasa *SLX1* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la línea celular NL49 (Gráfica 10), a su vez tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la línea celular VU817 (Gráfica 11). Del mismo modo al realizar la comparación entre ambas líneas celulares, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

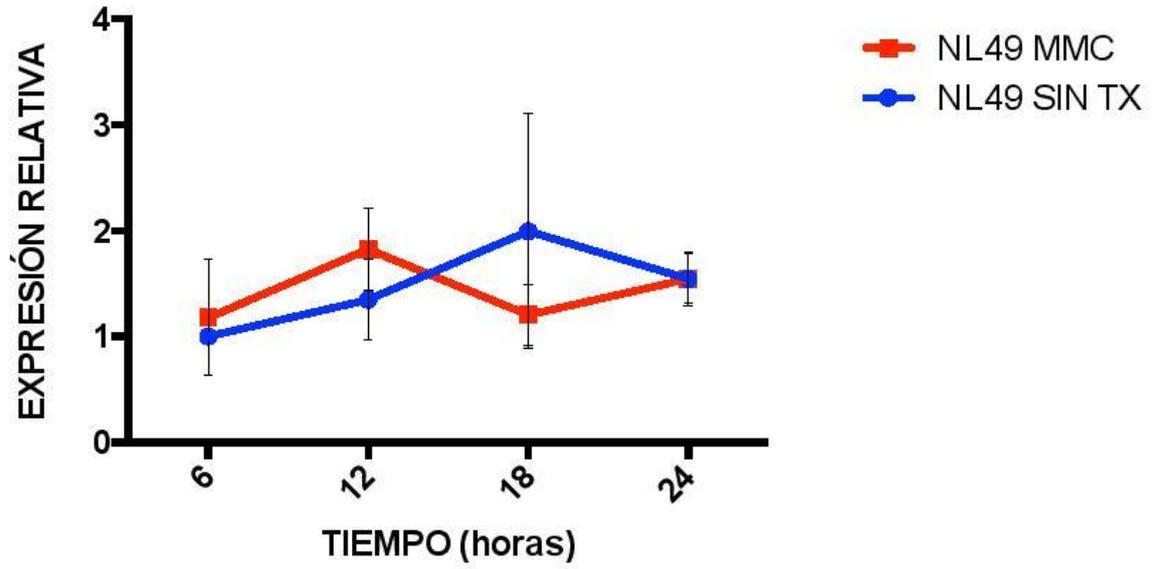


Gráfica 10. Expresión relativa de mRNA de *SLX1* en células normales.

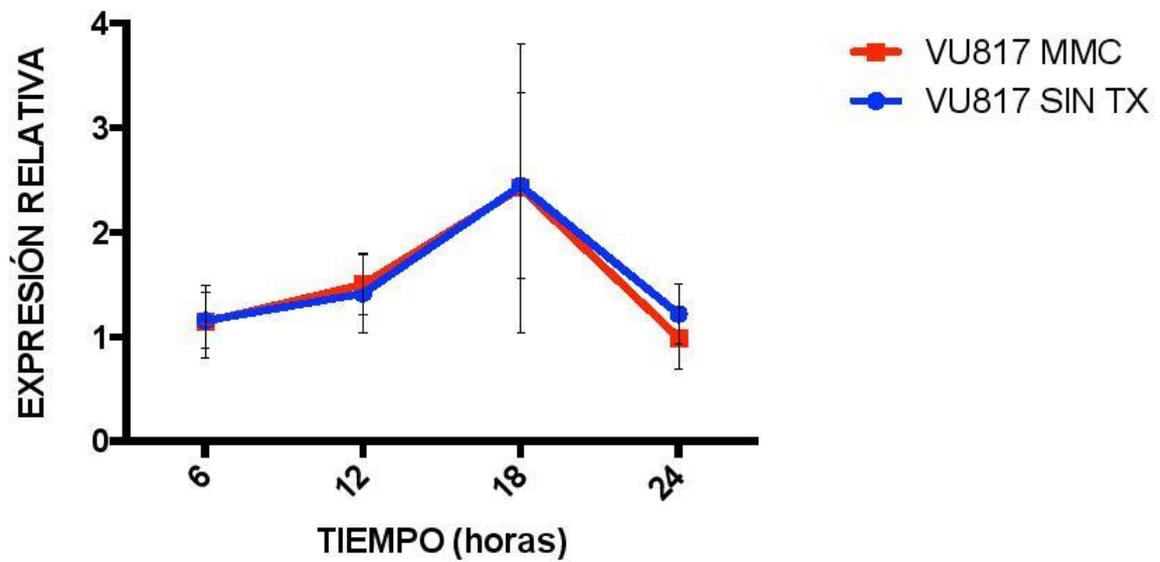


Gráfica 11. Expresión relativa de mRNA de *SLX1* en células AF-A.

MUS81: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los diferentes tiempos de exposición a MMC en la línea celular NL49 (Gráfica 12), en la línea celular VU817 (Gráfica 13), ni al comparar ambas líneas entre sí. Sin embargo, se observó una tendencia a aumentar la expresión de *MUS81* conforme el tiempo de cultivo avanzaba, siendo las 18 horas el punto de mayor expresión, el cual además coincide con el tiempo de mayor acumulación de células en fase S y el inicio de la acumulación de células AF-A en la fase G2/M, lo cual se observó sin importar la presencia de MMC.



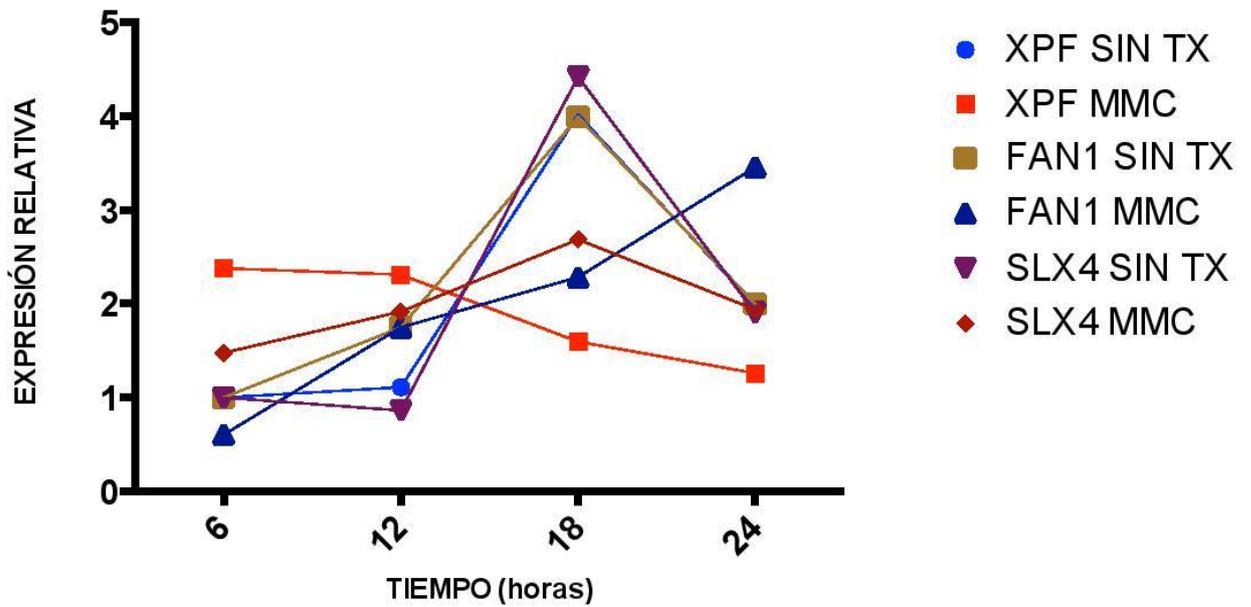
Grafica 12. Expresión relativa de mRNA de *MUS81* en células normales.



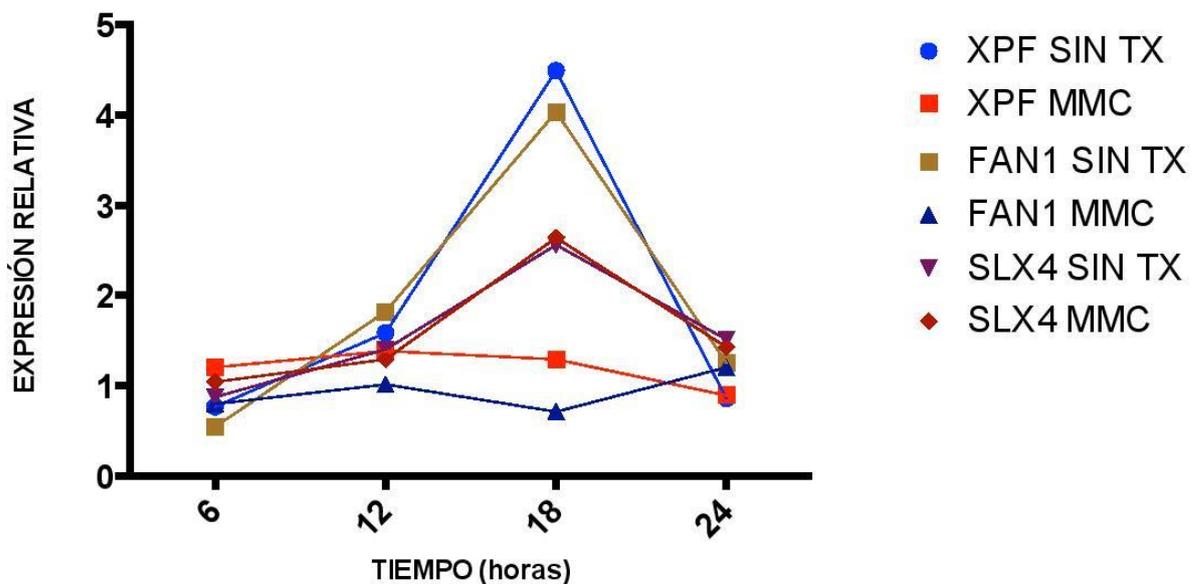
Gráfica 13. Expresión relativa de mRNA de *MUS81* en células AF-A

Finalmente comparamos la expresión relativa de las diferentes endonucleasas en grupos para observar si existía una correlación entre los cambios de expresión de unas con respecto a otras. Al analizar los cambios en los niveles de expresión en los mRNAs en la línea celular NL49 de *XPF*, *FAN1* y *SLX4* se encontró una disminución debida al tratamiento con MMC en el caso de *XPF* (Gráfica 14). Para las células VU817 dicha disminución se observó para *FAN1* y *XPF* (Gráfica 15). En *SLX4* no se observó disminución en los niveles de expresión del mRNA debida al tratamiento con MMC en ninguna de las líneas celulares.

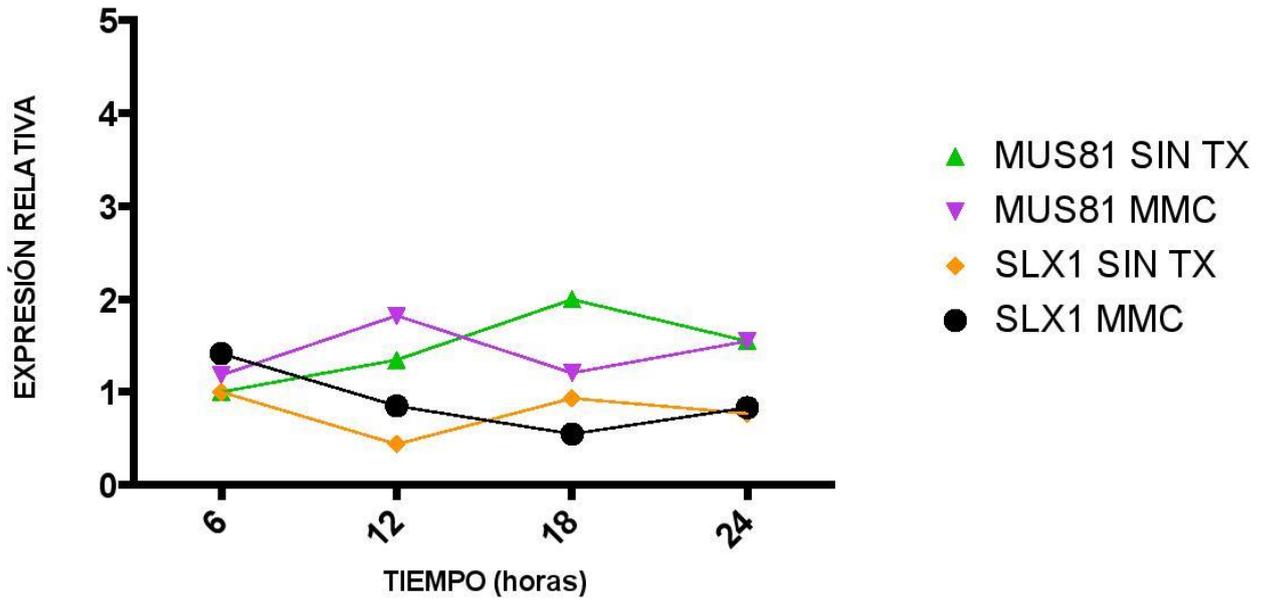
No se observaron cambios significativos en los niveles de mRNAs de *SLX1* y *MUS81* relacionados con la presencia de MMC tanto en las células NL49 (Gráfica 16) como en las VU817 (Gráficas 17).



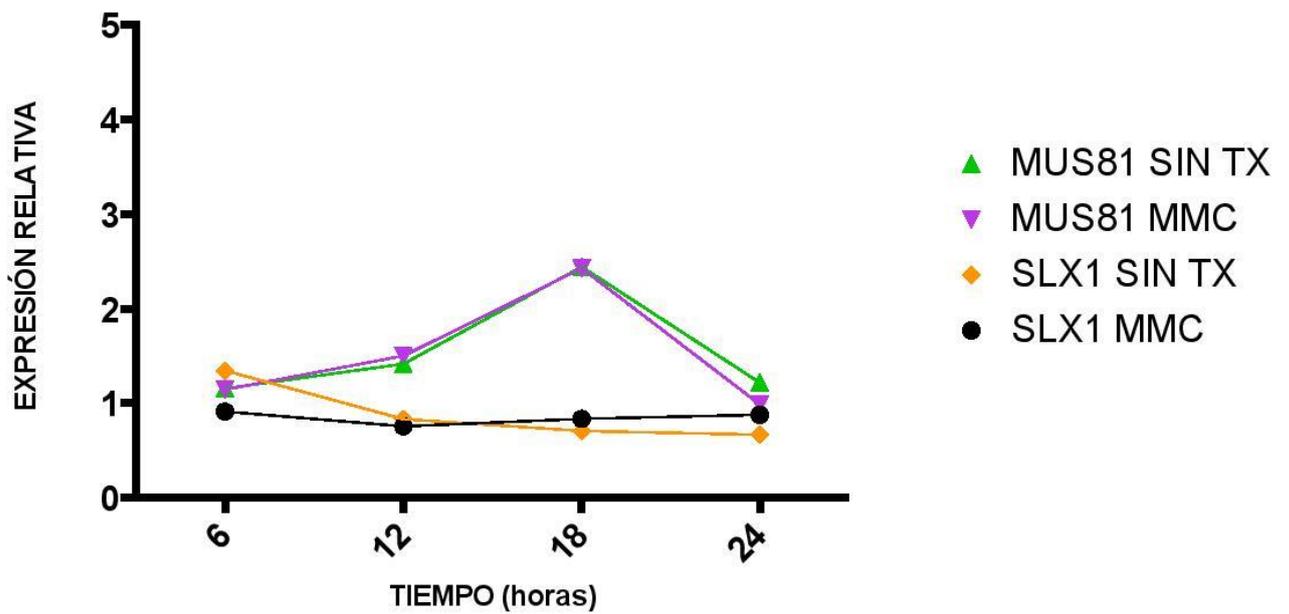
Gráfica 14. Cambios en la expresión relativa de los mRNAs de *XPF*, *FAN1* y *SLX4* en células NL49.



Gráfica 15. Cambios en la expresión relativa de los mRNAs de *XPF*, *FAN1* y *SLX4* en células VU817.



Gráfica 16. Cambios en la expresión relativa de los mRNAs de *MUS81* y *SLX1* en células NL49.



Gráfica 17. Cambios en la expresión relativa de los mRNAs de *MUS81* y *SLX1* en células VU817.

En la siguiente tabla se muestran los promedios de los tres genes de referencia al aplicar la fórmula de expresión relativa con las diferentes líneas celulares y en las diferentes condiciones experimentales.

Tabla 2. Promedios de la expresión relativa de *XPF*, *MUS81*, *SLX1*, *SLX4* y *FAN1*.

	NL49					VU817				
	XPF	MUS81	SLX1	SLX4	FAN1	XPF	MUS81	SLX1	SLX4	FAN1
SnTX 6H	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.77	1.16	1.35	0.88	0.55
MMC 6H	2.38	1.18	1.41	1.48	0.60	1.21	1.14	0.91	1.04	0.80
SnTX 12H	1.11	1.34	0.44	0.86	1.75	1.59	1.42	0.83	1.40	1.82
MMC 12H	2.31	1.82	0.85	1.92	1.75	1.39	1.50	0.76	1.29	1.01
SnTX 18H	4.02	2.00	0.93	4.42	3.99	4.49	2.45	0.70	2.56	4.04
MMC 18H	1.60	1.21	0.55	2.69	2.28	1.29	2.43	0.84	2.64	0.71
SnTX 24H	1.98	1.55	0.77	1.91	2.00	0.86	1.22	0.67	1.51	1.25
MMC 24H	1.26	1.55	0.83	1.94	3.45	0.89	0.99	0.88	1.43	1.21

X. DISCUSIÓN.

El DNA se encuentra expuesto a diversos tipos de daño provenientes de diferentes fuentes, tanto endógenas como exógenas; la estabilidad genómica resulta, por lo tanto, un asunto de importancia prioritaria, ya que mantenerla es crucial para la homeostasis celular, así como para asegurar la continuidad genética durante la proliferación celular y la reproducción en los eucariontes (López, 2003). Si se toma en consideración el efecto potencial de las lesiones en el DNA y la frecuencia elevada con la que ocurren es necesaria la existencia de mecanismos que permitan reparar el material genético dañado.

Los errores en diferentes procesos, tales como el control de la segregación cromosómica, la replicación y/o reparación del DNA, conducen a una cantidad alta de mutaciones espontáneas, derivando así, en diversos problemas, tales como enfermedades hereditarias y algunos tipos de cáncer (Loeb, 2001). Si una mutación se produce en las células germinales, esta pasa a la siguiente generación, mientras que si se produce en células somáticas podría interferir con los procesos de replicación y transcripción, causando inestabilidad genómica y conduciendo a la transformación maligna de una célula o inclusive, podría tener repercusión sobre el proceso de envejecimiento (Zhou y Elledge, 2000).

La importancia de los procesos de reparación del DNA puede reconocerse al ver las consecuencias que tienen en los seres humanos las deficiencias en la reparación del genoma. Un ejemplo de ellos son los pacientes con diferentes enfermedades clasificadas como síndromes de inestabilidad genómica, tales

como el *Xeroderma pigmentosum* (XP), el síndrome de Cockayne, el síndrome de rupturas de Nijmegen (NBS) o la AF (Stewart *et al.*, 1999; Carney *et al.*, 1998; Ciccía *et al.*, 2008).

Entre los mecanismos de reparación del DNA destaca la vía FA/BRCA, la cual posee funciones de mantenimiento y protección de las células troncales hematopoyéticas, supresión de tumores, protección de la horquilla de replicación durante la fase S del ciclo celular y la reparación de los ECC generados por agentes alquilantes bifuncionales como la MMC (Kottemann y Smogorzewska, 2013), siendo esta última función la que ha sido la más investigada.

Uno de los pasos cruciales de la vía FA/BRCA es el corte en una de las hebras de DNA llevado a cabo por endonucleasas específicas para remover los ECC. Según sugiere la evidencia más reciente, este corte se lleva a cabo por la endonucleasa XPF apoyado por SLX4, y teniendo a MUS81, SLX1 y FAN1 como opciones secundarias (Bhagwat *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012) y genera una RDH que funciona como un intermediario de reparación. La RDH será posteriormente reparada por recombinación homóloga, lo cual asegura que no se dejen ECC y RDH sin reparar.

Aunque se ha postulado que la activación de las endonucleasas de la vía FA/BRCA es dependiente de la presencia del *FA core complex*, las células AF-A, deficientes en este complejo, generan una gran cantidad de rupturas al ser expuestas a MMC. Como puede ser apreciado en el ensayo de aberraciones

cromosómicas, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células AF es mayor que en las células normales, tanto de modo espontáneo como cuando son expuestas a la MMC, indicando que el procesamiento inicial de los ECC no se encuentra afectado en las células AF, sino que más bien el proceso mayormente afectado es la reparación de RDHs, dejando múltiples RHDs sin reparación.

Por lo tanto, el mecanismo que permite la generación de las RDH en las células AF debe ser independiente de la presencia del *FA core complex* o de la vía FA/BRCA. Esto sugiere que la célula posee mecanismos alternos que le permitirían procesar los ECC que se encuentran en su material genético, entre los cuales se pueden incluir: 1) cambios en la expresión génica de las endonucleasas para aumentar eventualmente la producción de proteína y procesar los ECC, o 2) activación de endonucleasas alternas por proteínas que no pertenecen a la vía FA/BRCA pero que podrían responder a la presencia de los ECC.

En este trabajo se decidió abordar la primera posibilidad y se recurrió al análisis de los posibles cambios de expresión de las endonucleasas canónicas y no canónicas que podrían estar asociadas a la vía FA/BRCA. Esto se realizó a lo largo de 24 horas de exposición a MMC en una línea celular eficiente en la vía FA/BRCA y en una línea celular AF-A.

Por otra parte, es bien sabido que las células con AF detienen la progresión del ciclo celular cuando han recibido daño, como el generado por la MMC. Algunos

investigadores han propuesto que este arresto prolongado se debe a que las células con AF activan los *checkpoints* que bloquean la progresión del ciclo celular y ciertos mecanismos de reparación del DNA alternos a la vía FA/BRCA, los cuales pueden ser o no ser eficientes. Entre estos mecanismos podríamos esperar cambios en la activación y/o expresión génica de endonucleasas alternas que permitirán el procesamiento de los ECC rezagados en su reparación desde la fase S del ciclo celular.

Debido a esto evaluamos por citometría de flujo la progresión en el ciclo celular de ambas líneas celulares en presencia o ausencia de MMC. Lo que nos permitiría saber si existe una correlación entre la transición por fase S o el bloqueo en la fase G2 del ciclo celular y el cambio en la expresión de alguna endonucleasa específica.

Como ya se ha mencionado, la vía FA/BRCA repara los ECC presentes en el DNA durante la fase S del ciclo celular. Los resultados de los experimentos son consistentes con esta idea, de manera que en el momento en el que detectamos la mayor cantidad de células en la fase S (Gráfica 2) también encontramos que *XPF*, *MUS81*, *FAN1* y *SLX4* presentaban sus mayores niveles de expresión de mRNAs (Gráficas 4-9, 12 y 13), tanto en las células NL49 como VU817. Esto es comprensible debido a que la vía FA/BRCA se activa durante la fase S para reparar los ECC en el DNA y requeriría de una cantidad suficiente de las proteínas involucradas en la vía, entre ellas las endonucleasas, por lo que una cantidad elevada de sus mRNAs ayudaría a asegurar, al menos en parte una reparación adecuada de los ECC, sugiriendo

que los cambios en la expresión relativa de estos mRNAs se encuentran estrechamente relacionados con la transición a lo largo del ciclo celular.

El ensayo de aberraciones cromosómicas muestra que las células AF-A, aunque son deficientes en la reparación de los ECC, son capaces de generar RDHs en el DNA. Esto puede apreciarse fácilmente por las aberraciones cromosómicas que se generan en las células AF-A al ser expuestas a MMC, por lo tanto la presencia del *FA core complex*, del cual forma parte la proteína FANCA, parece no ser indispensable para el procesamiento inicial de los ECC, apoyando así la existencia de una vía alterna para ello.

La expresión relativa de *SLX4* mostró cambios a lo largo del tiempo, aumentando su expresión primordialmente durante la fase S y no se vió afectada por el tratamiento con MMC (Gráficas 4 y 5). Esto cobra sentido dada su enorme importancia como reclutadora de las endonucleasas mas adecuadas para reparar el DNA dañado por ECC, de manera que cuando la célula transita hacia la fase S, se encuentre preparada para reparar las lesiones que requieran a alguna de las endonucleasas reclutadas por *SLX4*. Un estudio realizado por Flott y Rouse (2005) apoya esta idea, en este estudio se encontró que en *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a diferentes genotoxinas como MMS, un agente alquilante monofuncional, camptotecina, HU y óxido 4-nitroquinolino no mostraron necesitar ni a *SLX1* ni a *SLX4* para la activación de los *checkpoints* del ciclo celular, sin embargo, *SLX4* mostró ser requerido para la reparación de daño en el DNA producido por eventos de alquilación, tanto en cultivos celulares asincrónicos, como en aquellos arrestados en la fase G2.

Incluso se ha observado en células DT40 de pollo que el no contar con SLX4 funcional implica un decremento en su capacidad proliferativa (Yamamoto *et al.*, 2011).

Se sabe que XPF reconoce y corta preferencialmente estructuras de tipo extremo saliente 3' en el lado 5' del ECC (Hutton *et al.*, 2010). XPF es la principal endonucleasa que participa en la reparación de los ECC por medio de la vía FA/BRCA, por lo que resulta intrigante que su expresión se vea reducida cuando las células son expuestas a la MMC, sobre todo en el momento crítico que se requiere (durante la fase S). Sin embargo, a pesar de la disminución en los niveles de *XPF*, las células AF siguen generando RDHs, haciendo evidente así eventos de corte en el DNA para reparar el daño. XPF es llevado a los sitios de daño por medio de la proteína SLX4, quien a su vez se localiza ahí por medio del complejo FANCI/FANCD2 monoubiquitinado.

En el caso de las células AF-A, la deficiencia de la proteína FANCA impide la formación del *FA core complex* y así la monoubiquitinación de FANCI/FANCD2, imposibilitando la reparación de los ECC por la vía FA/BRCA. Es posible que por esta razón la célula disminuya la expresión de *XPF* (Gráficas 6 y 7) activando desde la transcripción otra u otras vías de reparación, por lo tanto, es posible que en alguna de estas vías participen otras endonucleasas que se han asociado con la resistencia a ECC como MUS81, SLX1 o FAN1.

Aunque se sabe poco sobre la regulación transcripcional de *XPF*, en un estudio realizado por Christmann *et al.* (2006) se demostró que los fibroblastos

embrionarios de ratón carentes de *c-Fos* presentan defectos en la reparación del daño al DNA inducido por luz ultravioleta (UVC). C-Fos es una proteína que forma parte del factor transcripcional conocido como complejo heterodimérico activador de proteínas 1 (AP-1) (Chiu *et al.*, 1988; Rauscher *et al.*, 1988), el cual se encarga de modular la expresión de genes implicados en la protección contra estrés genotóxico. Este grupo de trabajo encontró que este defecto en la reparación puede deberse a que después del tratamiento con UVC los niveles de mRNA de las endonucleasas de la vía de reparación NER *xpf* y *xpg* decaen, pues la resíntesis de estas proteínas se encuentra afectada. Sus hallazgos se corroboraron al tratar cultivos celulares silvestres con Actinomicina D (ActD) durante 3 y 6 horas y observándose una reducción drástica en los niveles del mRNA de *xpf* y *xpg*. Asimismo Tomicic *et al* (2011) han demostrado que c-Fos estimula la re-síntesis de XPF en respuesta a daño al DNA inducido por UVC en fibroblastos humanos. Este estudio es el único hasta el momento relacionado con la regulación a nivel transcripcional de XPF, por lo que existe muy poca información acerca de los mecanismos de regulación transcripcional de esta endonucleasa.

FAN1 también disminuyó su expresión en las células FA-A al ser tratadas con MMC (Gráfica 9). FAN1 posee tanto actividad exonucleasa como endonucleasa, la primera de ellas es en sentido 5' a 3' en estructuras de tipo extremo saliente 3', la actividad exonucleasa no se encuentra relacionada con la resección necesaria en la RRH; mientras que la actividad de endonucleasa actúa preferencialmente en estructuras de tipo extremo saliente 5' y presenta poca afinidad por estructuras similares a horquillas de replicación; la actividad

de endonucleasa ha mostrado ser más fuerte que la de exonucleasa (MacKay *et al.*, 2010).

FAN1 interactúa específicamente con la proteína FANCD2 en los sitios con ECC, además se ha encontrado que para la formación de los *foci* de FAN1 en los sitios donde existen ECC, son esenciales tanto FANCD2 como FANCI monoubiquitinados, siendo FAN1 reclutado a los sitios de daño en el DNA por este complejo (Smogorzewska *et al.*, 2010), relacionándose así con la vía FA/BRCA. Mackay *et al* (2010) realizaron un estudio en el cual utilizaron células PD20 (una línea celular de fibroblastos humanos derivada de un paciente de AF, la cual es deficiente en la proteína FANCD2) a las cuales les transfectaron con FANCD2 tipo silvestre o mutado para evaluar la formación de *foci* de FAN1 marcado con la proteína verde fluorescente (GFP) cuando se les trataba con MMC. Ellos observaron que únicamente en las células en las que fue trasfectado FANCD2 tipo silvestre se inducían los *foci* de FAN1 en el DNA al ser tratadas con MMC, demostrando que FANCD2 es necesario para la localización de FAN1 en el sitio de daño.

A pesar de mostrar niveles de expresión bajos de los mRNAs de *XPF* y *FAN1* las células AF-A tienen una frecuencia de aberraciones cromosómicas más alta que las células normales al ser expuestas a MMC, en el presente trabajo fue de aproximadamente el doble (Gráfica 1). Es posible que en células deficientes en la vía FA/BRCA el ECC se detecte inicialmente, y sin embargo al persistir y no ser reparado se opte por una o más vías alternas de reparación, implicando reducir la expresión de alguno de los genes participantes en la vía, incluidas las

endonucleasas XPF y FAN1.

La expresión relativa del RNAm de *MUS81* se modificó únicamente a lo largo del tiempo y el tratamiento con MMC no tuvo efecto sobre ella (Gráficas 12 y 13), presentando su mayor punto de expresión durante la fase S, lo cual podría apoyar la idea de su participación en el procesamiento de los ECC. *MUS81* ya ha sido implicada en la resistencia a ECC (Ciccia *et al.*, 2008), esta endonucleasa es capaz de cortar estructuras similares a horquillas de replicación y extremo salientes 3'. Ciccia *et al.* (2003) realizaron experimentos *in vitro* con *MUS81* de humano, demostrando esto. Hanada *et al.* (2006) demostraron en células troncales embrionarias de ratón en fase S que *MUS81* participa en el procesamiento de ECC para convertirlos en RDH, de manera que al tratar a células carentes de *MUS81* con agentes inductores de ECC la formación de RDH se vio afectada. Además este grupo concluyó que *MUS81* podría estar participando en una vía de reparación de ECC dependiente de la replicación junto con RAD54. En este mismo trabajo ellos proponen que la reparación de ECC es dependiente de *MUS81*, sin embargo también indican que es probable la existencia de otras vías de reparación de ECC independientes de esta endonucleasa.

Cabe destacar que Niedernhofer *et al.* (2004) encontraron en fibroblastos embrionarios de ratón que las RDH formadas a partir de ECC se forman por un mecanismo independiente de XPF. *MUS81* puede ser reclutado al sitio de daño por medio de SLX4 durante la reparación de ECC mediada por la vía FA/BRCA y realizar el corte en el DNA, sin embargo esta interacción podría no ser

absolutamente necesaria para que SLX4 pudiera desempeñar este papel exitosamente. Se ha reportado que tal como MUS81 se encuentra involucrado en la resistencia a la MMC, esto ocurre de manera similar con otros agentes alquilantes durante la fase S. Chang *et al.* (2002) realizaron un escaneo completo del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con diversas deleciones haploides para diferentes genes relacionados con la sensibilidad a metilmetanosulfonato (MMS), sus resultados arrojaron 103 genes cuya deleción provoca sensibilidad a MMS entre los que se encontró a MUS81.

SLX1 no mostró cambios en sus niveles de expresión a través de los diferentes tiempos ni se vió afectada por la adición de MMC (Gráficas 10 y 11). *SLX1* es una endonucleasa que posee afinidad por estructuras de tipo extremo saliente 5', sin embargo Fricke y Brill (2003) encontraron que en *Saccharomyces cerevisiae* *SLX1* presenta cierta afinidad por estructuras extremo saliente 3' *in vitro*, aunque es menor a la de las estructuras extremo saliente 5'. Fekairi *et al.* (2009) encontraron que en células HeLa (línea celular humana derivada de células de cáncer cervical) *SLX4*, quien forma un complejo con *SLX1*, es requerido para la reparación de ECC, mientras que *SLX1* no lo es. Se sabe además que *SLX1* por si sola posee una actividad débil de endonucleasa, pero que al unirse a *SLX4* ésta se potencia alrededor de 500 veces (Fricke y Brill, 2003). *SLX1* parece mantener una cantidad constante en sus niveles de mRNA a través del ciclo celular, esto pudiera ser debido a que la célula la requiere para diferentes procesos relacionados con la integridad del material genético.

Svendsen *et al.* (2009) evaluaron por medio de RNA de interferencia en células

HeLa y U20S (línea celular ósea derivada de un paciente de osteosarcoma) el efecto que tiene la disminución de SLX4, MUS81 y SLX1 en la resistencia a diferentes agentes que producen daño en el DNA. En el caso de SLX1 se observó una ligera sensibilidad a MMC, Camptotecina y MMS. Ellos discuten la posibilidad de que niveles residuales de la proteína son suficientes para proveer resistencia significativa al daño causado por estos agentes. SLX1 parece no participar en el corte en hebras de DNA afectadas por ECC, sino mas bien en la resolución de las uniones de Holliday generadas en la RRH (Muñoz *et al.*, 2009).

Como se mencionó antes, SLX4 es una proteína de suma importancia debido a su capacidad para unirse a diferentes proteínas de reparación del DNA entre ellas SLX1, MUS81 y XPF. La importancia de la unión de estas endonucleasas a SLX4 para diferentes procesos de reparación es algo poco estudiado. Kim *et al.* (2012) utilizaron cultivos de fibroblastos humanos deficientes para SLX4, posteriormente los complementaron con SLX4 mutantes para los diferentes dominios de unión a cada una de las endonucleasas asociadas y probaron su sensibilidad a MMC, a un inhibidor de la Poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) y a camptotecina, un compuesto conocido por formar un complejo con la topoisomerasa I e inhibir su actividad, provocando estancamiento de la horquilla de replicación. Ellos encontraron que la interacción entre XPF y SLX4 es esencial para la resistencia a MMC. La interacción de SLX4 con MUS81 resultó crítica para la resistencia a camptotecina y al inhibidor de la PARP, además encontraron una sensibilidad moderada a MMC, sugiriendo que MUS81 tiene un papel menor en la reparación de ECC y encontraron que dicho

papel es totalmente dependiente de la interacción con SLX4. Finalmente encontraron que la interacción de SLX1 con SLX4 tiene cierta importancia en la resistencia a los tres agentes, sin embargo esta no es clara, pudiendo ser que esté relacionada con su actividad de resolvasa de uniones de Holliday. Adicionalmente encontraron que las células que carecían de la interacción de SLX4 con MUS81 y SLX1 presentaron una mayor sensibilidad a la MMC que las carentes de solo alguna de estas interacciones. Ellos concluyen que ninguna de las endonucleasas puede cumplir con su función en la reparación del daño producido por estos agentes en ausencia de SLX4.

Las exonucleasas SNM1A y SNM1B (Apollo) son proteínas con actividad de exonucleasa 5' que han sido asociadas con la reparación de ECC (Senerová *et al.*, 2012; Demuth *et al.*, 2008; Demuth *et al.*, 2004). De estas exonucleasas, SNM1A es quien ha demostrado tener una relación con alguna de las endonucleasas participantes en la vía FA/BRCA, en concreto con XPF, pues es capaz de digerir ECC que posean un fosfato 5' generado por el corte del DNA realizado por XPF-ERRC1 (Wang *et al.*, 2011), de hecho, la actividad de exonucleasa 5' dependiente de un fosfato 5' ha sido la única observada para SNM1A. Bajo dicho modelo, XPF podría ser la única endonucleasa requerida para la reparación de ECC por la vía FA/BRCA, sin embargo en células incapaces de reclutar a XPF en el sitio de daño deberían existir mecanismos alternos que permitan reclutar otra nucleasa que pueda cortar en el lado 5' del ECC permitiendo a SNM1A reseccionar el DNA, un candidato para ello podría ser SLX1, aunque se requieren más estudios para confirmarlo.

Se han reportado diferentes compuestos que tienen la capacidad de disminuir los niveles de mRNA o de afectar procesos en los que se encuentra involucrado el DNA, como es el caso de la actinomicina D (ACtD), un antibiótico comúnmente usado en el tratamiento de diversas neoplasias. Al igual que la MMC, la ACtD es sintetizada por diferentes especies de actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces* (Sousa *et al.*, 2002). La actividad biológica de la ACtD se puede relacionar por su unión al DNA, que de este modo interfiere con la replicación y transcripción (Hurwitz *et al.*, 1962; Aivasashvilli y Beabealashvilli, 1983).

Al igual que la ACtD, la MMC ha demostrado tener la capacidad de disminuir los niveles de mRNA de algunas proteínas, tenemos como ejemplo de esto un reporte en el que se utilizaron células HEK293 (derivadas de riñón embrionario humano) para evaluar el efecto inhibitorio de diversos fármacos sobre la actividad transcripcional del factor inducible por hipoxia (HIF), entre ellos la MMC, el cual interviene en la adaptación de células y tejidos a concentraciones bajas de oxígeno, en este reporte se mostró que la MMC redujo en 30% los niveles de mRNA de *HIF-1 α* (Lou *et al.*, 2010). De manera similar como la MMC influye a nivel transcripcional con el HIF, es posible que esto ocurra con los mRNAs de algunas proteínas involucradas en la reparación del DNA en células con defectos en las vías de reparación como es el caso de las células AF. En este trabajo tenemos el caso de *XPF* y *FAN1*, cuyos niveles de mRNA se vieron disminuidos al someterlas al tratamiento con MMC en las células AF-A.

En la Figura 9 se muestra un modelo hipotético sobre los cambios en la

cantidad de las proteínas de reparación aquí estudiadas (aunque en el presente estudio se estudiaron estos genes de reparación a nivel de mRNA, en el modelo se aborda la posibilidad, que los cambios encontrados ocurren de la misma manera a nivel de proteínas) en la célula ante daño causado por un agente inductor de ECC en células proficientes como deficientes en la vía FA/BRCA durante la fase S del ciclo celular. En las células que poseen una vía FA/BRCA funcional cuando el DNA se encuentra atrapado en un ECC se incrementa la producción de SLX4. Extrañamente disminuye la cantidad de XPF, lo cual podría ser compensado con un ligero aumento de FAN1, mientras que MUS81 y SLX1 no muestran cambios. Por otro lado, en las células deficientes en la vía FA/BRCA los cambios son distintos. Mientras que SLX4, XPF y SLX1 siguen el mismo comportamiento, se observa que FAN1 disminuye sus niveles y MUS81 los aumenta. Esto podría deberse a que en estas células XPF ni FAN1 son capaces de realizar cortes en el DNA, siendo otra endonucleasa la que realiza el corte en el lado 5', mientras que MUS81 actuaría de manera alterna a la vía FA/BRCA para realizar el corte en el lado 3'.

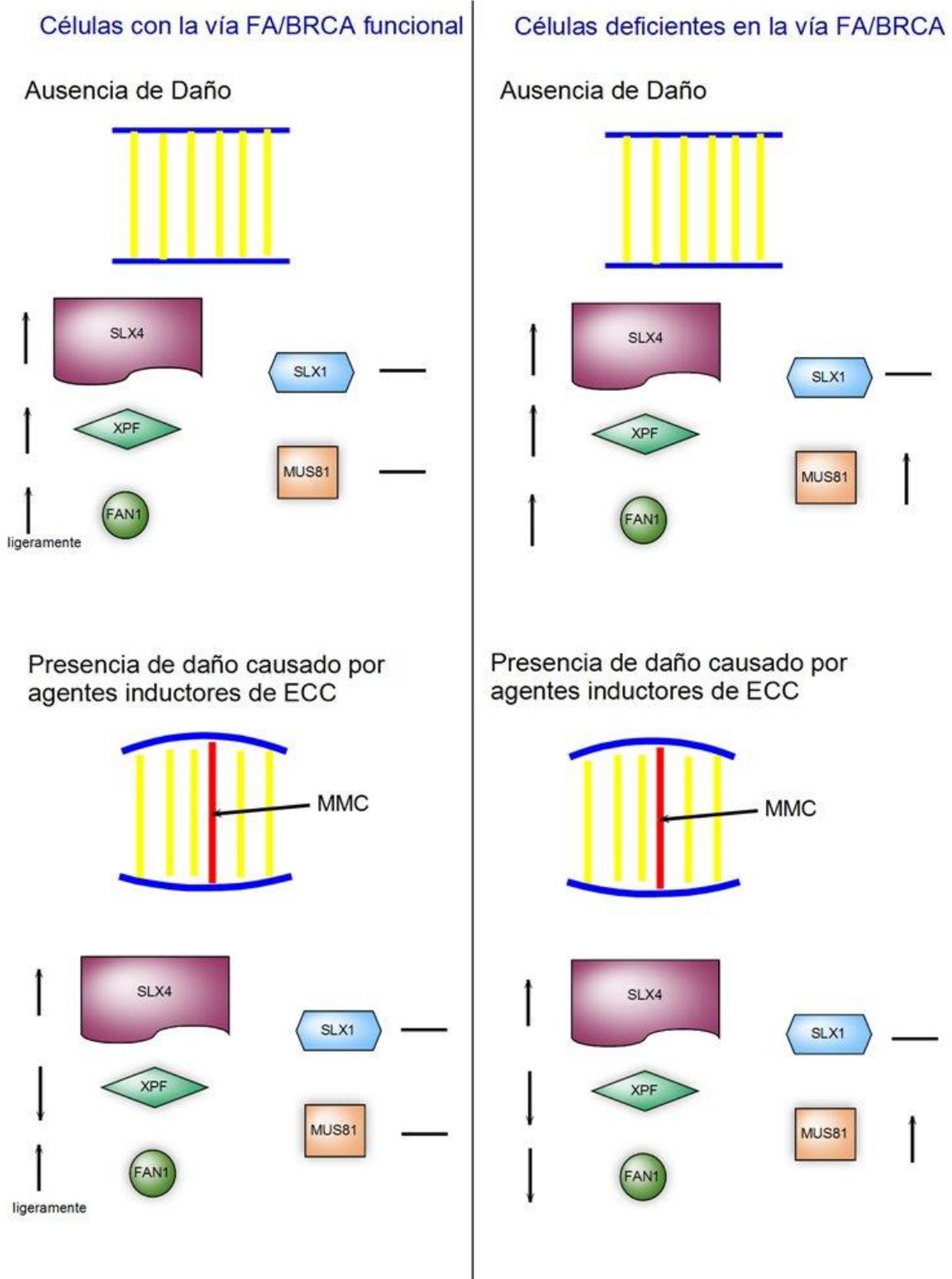


Figura 9. Modelo hipotético del comportamiento de SLX4 y las endonucleasas, XPF, SLX1, FAN1 y MUS81 durante la fase S en células eficientes y deficientes en la vía FA/BRCA. En este modelo se asume que los cambios en los niveles

de mRNA ocurren de manera similar con la cantidad de proteína

La disminución en el mRNA de *XPF* así como de *FAN1* nos sugiere que en células defectuosas en la vía FA/BRCA se disminuye la cantidad de estas proteínas aumentando la de otras endonucleasas que podrían reparar los ECC por un mecanismo alternativo, sin embargo, los cambios en la expresión del mRNA no siempre van de la mano con los ocurridos a nivel de proteína, por lo que es necesario realizar estudios que permitan conocer los cambios en la cantidad de proteína de *FAN1* y *XPF* en células AF-A al ser expuestas a agentes inductores de ECC para conocer si a este nivel dicha disminución persiste. Un método adecuado para ello sería un ensayo de Western Blot.

Los resultados en los que *MUS81* y *SLX1* no cambian su expresión podrían sugerir que sus proteínas realizan los cortes en el DNA de una manera independiente a la vía FA/BRCA. Sin embargo para corroborarlo hacen falta experimentos en los que se bloquee la expresión de estos genes. Una técnica plausible sería el uso de RNAs de interferencia contra los mensajeros de estos genes en células AF-A y tratarlas con MMC, de manera que si se observa una disminución en la cantidad de aberraciones cromosómicas, incluidas RDH se apoyaría su participación en el mecanismo alternativo de reparación de ECC, pues no habría endonucleasas que procesen los ECC.

XI. CONCLUSIONES.

- En las células AF-A *XPF* y *FAN1* muestran una disminución en sus niveles de mRNA después de ser tratadas durante 18 horas con MMC. Este punto correspondió al tiempo con mayor cantidad de células en fase S y de inicio del arresto en la fase G2 del ciclo celular. Esto sugiere que la MMC es capaz de regular negativamente la expresión de ambas endonucleasas, sin embargo ambas participan en el corte de la hebra de DNA en el lado 5' del ECC, principalmente XPF en asociación con SLX4, por lo que esto sugiere que otra endonucleasa es quien realiza el corte en el DNA cuando la vía FA/BRCA no es capaz de activar a las endonucleasas canónicas.
- El aumento de la cantidad de las diferentes endonucleasas investigadas podría ocurrir al nivel de activación de las proteínas para el procesamiento inicial de los ECC generados por agentes alquilantes bifuncionales, pues a nivel transcripcional no se mostró ningún aumento en la cantidad de mRNA en ninguna de las endonucleasas investigadas en el presente trabajo. Otra posibilidad es que otras endonucleasas diferentes a las estudiadas estén participando en el procesamiento de los ECC en ausencia de la vía FA/BRCA.
- No existen trabajos anteriores al presente referentes a la investigación de endonucleasas alternas a la vía FA/BRCA, por lo que puede servir como punto de partida, sin embargo, se requiere de mayor investigación en el tema para comprender lo que posibilita la formación de RDH

cuando la vía FA/BRCA es ineficiente para activar las endonucleasas que canónicamente se encargan de ello.

XII. PERSPECTIVAS.

- Se deberá realizar un estudio que permita conocer la cantidad de proteína de los mRNAs aquí estudiados en las células proficientes y deficientes para la vía FA/BRCA así como en la presencia y ausencia de agentes inductores de ECC para comparar si los cambios observados a ese nivel son similares a los cambios en la cantidad de sus mRNAs.
- *SLX1* y *MUS81* no muestran disminución en la cantidad de mRNA al tratar a las células AF con MMC, esto sugiere que pudiesen estar participando en un mecanismo de reparación de ECC alternativo a la vía FA/BRCA , para corroborarlo se deberá realizar un estudio en el que se bloquee su expresión y analizar la cantidad de aberraciones cromosómicas.

XIII. REFERENCIAS.

1. Aivasashvilli V.A., Beabealashvilli R.S. (1983). **Sequence-specific inhibition of RNA elongation by actinomycin D.** *FEBS Lett.* 160: 124-128.
2. Andersen S.L., Bergstralh D.T., Kohl K.P., LaRocque J.R., Moore C.B., Sekelsky J. (2009). **Drosophila MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination.** *Mol Cell* 35: 128–135.
3. Aravind L., Walker D.R., Koonin E.V. (1999). **Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems.** *Nucleic Acids Res.* 27: 1223-1242.
4. Ashwood-Smith M.J., Poulton G.A., Barker M., Mildenberger M. (1980). **5-Methoxypsoralen, an ingredient in several suntan preparations, has lethal, mutagenic and clastogenic properties.** *Nature.* 285: 407-409.
5. Auerbach A.D. (1993). **Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test.** *Experimental Hematology.* 21(6): 731–733.
6. Auerbach A.D. (2003). **Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis.** *Curr Protoc Hum Genet.* Chapter 8: Unit 8 7.
7. Auerbach A.D. (2009). **Fanconi anemia and its diagnosis.** *Mutat Res.* 668(1-2): 4–10.
8. Auerbach AD, Adler B, Chaganti RSK. (1981). **Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method.** *Pediatrics.* 67: 128.

9. Auerbach A.D., Wolman S.R. (1979). **Carcinogen-induced Chromosome Breakage in Chromosome Instability Syndromes.** *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1: 21-28.
10. Bastin-Shanower S.A., Fricke W.M., Mullen J.R., Brill S.J. (2003). **The mechanism of MUS81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from homologous endonuclease Rad1-Rad10.** *Mol. Cell. Biol.* 23: 3487-3496.
11. Bennetts L.E., De Iuliis G.N., Nixon B., Kime M., Zelski K., McVicar C.M., Lewis S.E., Aitken R. (2008). **Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities.** *Mutat. Res.* 641: 1-11.
12. Bhagwat N. Olsen A.L, Wang A.T, Hanada K., Stuckert P, Kanaar R., D'Andrea A., Niedernhofer L.J, McHugh P.J. (2009). **XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair.** *Mol. Cell. Biol.* 29: 6427-6437.
13. Boddy M.N., Gaillard P.H., McDonald W.H., Shanahan P., Yates J.R 3rd., Russell P. (2001). **MUS81-Eme1 are essential components of holliday junction resolvase.** *Cell.* 107: 537-548.
14. Bogliolo., Schuster B., Stoepker C., Derkunt B., Su Y., Raams A., Trujillo J.P, Minguillón J, Ramírez M.J., Pujol R., Casado J.A., Baños R., Rio P., Knies K., Zúñiga S., Benítez J., Bueren J.A, Jaspers N. G. J., Schärer O.D., de Winter J.P., Schindler D., Surrallés J. (2013). **Mutations in ERCC4, Encoding the DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia .** *The American Journal of Human Genetics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.002>.

15. Brooks P.J., Theruvathu J.A. (2005). **DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis.** *Alcohol.* 35:187-193.
16. Busch D.B., van Vuuren H., de Wit J., Collins A., Zdzienicka M.Z., Mitchel D.L., Brookman K.W., Stefanini M., Riboni R., Thompson L.H., Albert R.B., van Gool A.J., Hoeijmakers J. (1997). **Phenotypic heterogeneity in nucleotide excision repair mutants of rodent complementation groups 1 and 4.** *Mutat. Res.* 383: 91-106.
17. Carney J.P., Maser R.S., Olivares H., Davis E.M., Le Beau M., Yates III J.R., Hays L., Morgan W.F., Petrini J.H. (1998). **The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response.** *Cell.* 93: 477–486.
18. Chang M., Bellaoui M., Boone C., Brown G.W. (2002). **A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 99: 16934–16939.
19. Chang J.H., Kim J.J., Choi J.M., Lee J.H., Cho Y. (2008). **Crystal structure of the MUS81-Eme1 complex.** *Genes Dev.* 22: 1093-1106.
20. Chen X.B., Melchionna R., Denis C.M., Gaillard P.H., Blasina A., Van de Weyer I., Boddy M.N., Russell P., Vialard J., McGowan C.H. (2001). **Human MUS81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions *in vitro*.** *Mol Cell.* 8: 1117-1127.
21. Cheng G., Shi Y., Sturla S.J., J alas J.R., McIntee E.J., Villalta P.W., Wang M., Hecht S.S. (2003). **Reactions of Formaldehyde Plus Acetaldehyde with Deoxyguanosine and DNA: Formation of Cyclic**

- Deoxyguanosine Adducts and Formaldehyde Cross-Links.** *Chem. Res. Toxicol.* 16: 145-152.
22. Chiu R., Boyle W.J., Meek J., Smeal T., Hunter T., Karin M. (1988). **The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes.** *Cell.* 54: 541–552.
23. Ciccia A., Constantinou A., West S.C. (2003). **Identification and characterization of the human MUS81-eme1 endonuclease.** *J. Biol. Chem.* 278: 25172-25178.
24. Ciccia A., McDonald N., West S.C. (2008). **Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins.** *Annu. Rev. Biochem.* 77: 259–287.
25. Coulon S., Gaillard P.H., Chahwan C., McDonald W.H., Yates 3rd J.R., Russell P. (2004). **Slx1-Slx4 are subunits of a structure-specific endonuclease that maintains ribosomal DNA in fission yeast.** *Mol. Boil. Cell.* 15: 71-80.
26. Christmann M.T., Tomicic J., Origer D., Aasland B., Kaina. (2006). **c-Fos is required for excision repair of UV-light induced DNA lesions by triggering the re-synthesis of XPF.** *Nucleic Acids Res.* 34(22): 6530-6539. doi:10.1093/nar/gkl895.
27. Crossan G.P., Patel K.J. (2012). **The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA.** *The Journal of Pathology.* 226(2): 326–337.
28. Crossan G.P., van der Weyden L., Rosado IV., Langevin F., Gaillard P-H L., McIntyre R.E., Sanger Mouse Genetics Project., Gallagher F., Kettunen M.I., Lewis D.Y., Brindle K., Arends M.J., Adams D.J., Patel

- K.J. (2011). **Disruption of Mouse Slx4a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia.** *Nat Gen.* 43(2): 147-152.
- 29.D'Andrea A.D. (2010). **Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer.** *N Engl J Med.* 362: 1909–19.
- 30.D'Andrea A.D., Grompe M. (2003). **The Fanconi anaemia/BRCA pathway.** *Nat Rev Cancer.* 3: 23–34.
- 31.de Laat W. L., Jaspers N. G., Hoeijmakers J. H. (1999). **Molecular mechanism of nucleotide excision repair.** *Genes Dev.* 13: 768-785
- 32.de Laat W.L., Sijbers A.M., Odijk H., Jaspers N.G., Hoeijmakers JH. (1998). **Mapping of interaction domains between human repair proteins ERCC1 and XPF.** *Nucleic Acids Res.* 26: 4146-4152.
- 33.Deans A.J., West S.C. (2009). **FANCM Connects the Genome Instability Disorders Bloom's Syndrome and Fanconi anemia.** *Molecular Cell.* 36: 943-953.
- 34.Deans A.J., West S.C. (2011). **DNA interstrand crosslink repair and cancer.** *Nature.* 11: 467-480.
- 35.Demuth I., Bradshaw P.S., Lindner A., Anders M., Heinrich S., Kallenbach J., Schmelz K., Digweed M., Meyn M.S., Concannon P. (2008). **Endogenous hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM in response to ionizing radiation.** *DNA Repair.* 7: 1192–1201.
- 36.Demuth I., Digweed M., Concannon P. (2004). **Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand**

- crosslink-inducing agents and ionizing radiation.** *Oncogene*. 23: 8611–8618.
37. Dendouga N., Gao H., Moechars D., Janicot M., Vialard J., McGowan C.H. (2005). **Disruption of murine MUS81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis.** *Mol. Cell. Biol.* 25: 7569–7579.
38. Devlin T.M. (2004). **Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas.** 4ª edición. Reverté, Barcelona. Pp.35-36.
39. Doherty A.J., Serpell L.C., Ponting C.P. (1996). **The Helix-Hairpin-Helix DNA-Binding Motif: A Structural Basis for Non-Sequence-Specific Recognition of DNA.** *Nucleic Acids Res.* 24: 2488-2497.
40. Dutta S., Chowdhury G., Gates K.S. (2007). **Interstrand cross-links generated by abasic sites in duplex DNA.** *J. Am. Chem Soc.* 129: 1852-1853.
41. Eastman A. (1983). **Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II).** *Biochemistry.* 22: 3927-3933.
42. Eastman A. (1986). **Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA.** *Biochemistry.* 25: 1912-1915.
43. Enzlin J.H., Scharer O.D. (2002). **The active site of the DNA repair endonuclease XPF-ERCC1 forms a highly conserved nuclease motif.** *EMBO J.* 21: 2045-2053.
44. Fekairi S., Scaglione S., Chahwan C., Taylor E.R., Tissier A., Coulon S., Dong M.Q., Ruse C., Yates J.R. 3rd, Russell P., Fuchs R.P., McGowan

- C.H., Gaillard P-H. L. (2009). **Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases.** *Cell.* 138: 78–89.
45. Fleige S., Walf V., Huch S., Prgomet C., Sehm J., Pfaffl MW. (2006). **Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR.** *Biotechnol. Lett.* 28: 1601-1613.
46. Flott S., Rouse J. (2005). **Slx4 becomes phosphorylated after DNA damage in a Mec1/Tel1-dependent manner and is required for repair of DNA alkylation damage.** *Biochem. J.* 391: 325– 333.
47. Folmer V., Soares J.C., Gabriel D., Rocha J.B. (2003). **A high fat diet inhibits δ -aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*).** *J. Nutr.* 133: 2165-2170.
48. Frias S., Gómez L., Molina B., Rojas E., Ostrosky P., Carnevale A. (1996). **Effect of Hydroxyurea and normal plasma on DNA in lymphocytes in Fanconi anemia patients.** *Mut Res.* 35: 112-121.
49. Fricke W.M., Brill S.J. (2003). **Slx1-Slx4 is a second structure-specific endonucleasa functionally redundant with Sgs1-Top3.** *Genes Dev.* 17: 1768-1778.
50. Gaillard P.H., Wood R.D. (2001). **Activity of individual ERCC1 and XPF subunits in DNA nucleotide excision repair.** *Nucleic Acids Res.* 29: 872-879.
51. Gaillard P.H., Noguchi E., Shanahan P., Russell P. (2003). **The endogenous MUS81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism.** *Mol Cell.* 12: 747-759.

52. Gaskell L.J., Osman F., Gilbert R.J., Whitby M.C. (2007). **MUS81 cleavage of Holiday junctions: a failsafe for processing meiotic recombination intermediates?** *EMBO J.* 26: 1891-1901.
53. Gilman AG, Goodman LS. Gilman A. (1980). **The pharmacological basis of therapeutic. Mitomycin.** Editorial Macmillan. New York. Pp.1296-1297.
54. Grompe M., D'Andrea A. (2001). **Fanconi anemia and DNA repair.** *Hum. Mol Genet.* 10: 2253-2259.
55. Hanada K., Budzowska M., Davies S.L., van de Drunen E., Onizawa H., Beverloo H.B., Maas A., Essers J., Hickson I.D., Kanaar R. (2007). **The structure-specific endonuclease MUS81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 1096-1104.
56. Hanada K., Budzowska M., Modesti M., Maas A., Wyman C., Esser J., Kanaar R. (2006). **The structure-specific endonuclease MUS81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks.** *EMBO J.* 25: 4921-4932.
57. Heyer W.D., Ehmsen K.T., Solinger J. (2003). **Holliday junctions in the eukaryotik nucleus: resolution in sight?** *Trends Biochem. Sci.* 28: 548-557.
58. Hurwitz J., Furth J.J., Malamy M., Alexander M. (1962). **The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. III: The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin D and proflavin.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 48: 1222-1230.

59. Hutton R.D., Craggs T.D., White M.F., Penedo J.C. (2010). **PCNA and XPF cooperate to distort DNA substrates.** *Nucleic Acids Res.* 38: 1664-1675.
60. IARC. (2007). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, In: 1,3-Butadiene, Ethylene Oxide and Vinyl Halides (Vinyl Fluoride, Vinyl Chloride and Vinyl Bromide).** Vol. 97. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France, pp. 45-148.
61. Joenje H., Oostra A.B. (1983). **Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi Anaemia.** *Human Genet.* 65(2): 99-101.
62. Joenje H., Patel K.J. (2001). **The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia.** *Nat Reviews.* 2: 446-457.
63. Kaliraman V., Mullen J.R., Fricke W.M., Bastin-Shanower S.A., Brill S.J. (2001). **Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-MUS81 endonuclease.** *Genes Dev.* 15: 2730-2740.
64. Kashiyama K., Nakazawa Y., Pilz D.T., Guo C., Shimada M., Sasaki K., Fawcett H., Wing J.F., Lewin S.O., Carr L. Li T-S., Yoshiura K-I., Utani A., Hirano A., Yamashita S., Greenblatt D., Nardo T., Stefanini M., McGibbon D., Sarkany R., Fassihi H., Takahashi Y., Nagayama Y., Mitsutake N., Lehmann A.R., Ogi T. (2013). **Malfunction of Nuclease ERCC1-XPF Results in Diverse Clinical Manifestations and Causes Cockayne Syndrome, Xeroderma Pigmentosum, and Fanconi Anemia.** *The American Journal of Human Genetics.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.007>.

65. Kee Y., D'Andrea A.D. (2010). **Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability.** *Genes Dev.* 24: 1680–1694.
66. Kim J.M., Parmar K., Huang M., Weinstock D.M., Ruit C.A., Kutok J.L., D'Andrea A.D. (2009). **Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and Fanconi anemia phenotype.** *Dev Cell.* 16: 314-320.
67. Kim Y., Spitz G. S., Veturi U., Lach F.P., Auerbach A.D., Smogorzewska A. (2012). **Regulation of multiple DNA repair pathways by the Fanconi anemia protein SLX4.** *Blood.* 121 (1): 54-63.
68. Kinch L.N., Ginalski K., Rychlewski L., Grishin N.V. (2005). **Identification of novel restriction endonuclease-like fold families among hypothetical proteins.** *Nucleic acids Research.* 33: 3598-3608.
69. Kottemann M.C., Smogorzewska A. (2013). **Fanconi anemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks.** *Nature.* 493: 356-363.
70. Kozekov I.D., Nechev L.V., Moseley M.S., Harris C.M., Rizzo C.J., Stone M.P., Harris T.M. (2003). **DNA interchain cross-links formed by acrolein and crotonaldehyde.** *J. Am. Chem. Soc.* 125: 50-61.
71. Kuraoka I., Kobertz W.R., Arisa R.R., Biggerstaff M., Essigmann J.M., Wood R.D. (2000). **Repair of an Interstrand DNA Cross-link Initiated by ERCC1-XPF Repair/Recombination nuclease.** *J. Biol. Chem.* 275: 26632-26636.
72. Latt S.A., Stetten G., Juerjens L.A., Buchanan G.R., Gerald P.S. (1975). **Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72: 4066-4070.

73. Liu Y., Tarsounas M., O'Regan P., West S.C. (2007). **Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair.** *J Biol Chem.* 282: 1973-1979.
74. Liu T., Ghosal G., Yuan J., Chen J., Huang J. (2010). **FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair.** *Science.* 329: 693–696.
75. Ljunggren B. (1990). **Severe phototoxic burn following celery ingestion.** *Arch. Dermatol.* 126: 1334-1336.
76. Loeb L.A. (2001). **A mutator phenotype in cancer.** *Cancer Res.* 61: 3230–3239.
77. López C. A. *Estudio de la inestabilidad geómica espontánea e inducida en mutantes deficientes del DNA de Drosophila Melanogaster.* Bellaterra (Cerdayola del Valles): s.n, 2003. Memoria presentada en la Universitat Autònoma de Barcelona para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas.
78. Lou J.J.W., Chua Y.L., Chew E.H., Gao J., Bushell M., et al. (2010). **Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor-1a (HIF-1a) Protein Synthesis by DNA Damage Inducing Agents.** *PLoS ONE.* 5(5): e10522. doi:10.1371/journal.pone.0010522.
79. MacKay C., Déclais A.C., Lundin C., Agostinho A., Deans A.J., MacArtney T.J, Hofmann K., Gartner A., West S.C., Helleday T., Lilley D.M.J., Rouse J. (2010). **Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA Repair Nuclease Recruited to DNA Damage by Monoubiquitinated FANCD2.** *Cell.* 142: 65-76.

80. Manderfeld M.M., Schafer H.W., Davidson P.M., Zottola E.A. (1997). **Isolation and identification of antimicrobial furocoumarins from parsley.** *J. Food. Prot.* 60: 72-77.
81. Millard J.T., McGowan E.E., Bradley S.Q. (2012). **Diepoxybutane interstrand cross-links induce DN bending.** *Biochimie.* 94: 574-577.
82. Moldovan G.L., D'Andrea A.D. (2009). **How the Fanconi anemia pathway guards the genome.** *Annu Rev Genet.* 43: 223–249.
83. Molina B., Frias S. (2006). Anemia de Fanconi: Fenotipo Clínico, Celular y Molecular En. Pimentel E., Ortiz AR., Breña M. (eds). **Tópicos de Genética.** CEDIMSA, Toluca, México, pp. 319-344.
84. Muñoz I.M., Hain K., Declais A.C., Gardiner M., Toh G.W., Sanchez-Pulido L., Heuckmann J.M., Toth R., Macartney T., Eppink B., Kanaar R., Ponting C.P., Lilley D.M.J., Rouse J. (2009). **Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair.** *Mol. Cell.* 35: 116-127.
85. Niedernhofer L.J., Essers J., Weeda G., Beverloo B., de Wit J., Muijtjens M., Odijk H., Hoeijmakers J.H., Kanaar R. (2001). **The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required for targeted gene replacement in embryonic stem cells.** *EMBOJ.* 20:6540-6549.
86. Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M., van Drunen E., Maas A., Theil A.F., de Wit J., Jaspers N.G., Beverloo H.B., Hoeijmakers J.H., Kanaar R. (2004). **The Structure-Specific Endonuclease Ercc1-Xpf Is Required To Resolve DNA Interstrand Cross-Link-Induced Double – Strand Breaks.** *Mol. Cell. Biol.* 24: 5776-5787.

87. O'Donnell L., Durocher D. (2010). **DNA repair has a new FAN1 Club.** *Molecular Cell*. 39: 167-169.
88. Osman F., Dixon J., Doe C.L., Whitby M.C. (2003). **Generating Crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for MUS81-eme1 in meiosis.** *Mol Cell*. 12: 761-774.
89. G. Pagano, H. Youssoufian. (2003). **Fanconi anaemia proteins: major roles in cell protection against oxidative damage.** *Bioessays*. 25: 589–595.
90. Park S., Tretyakova N. (2004). **Structural characterization of the major DNA-DNA cross-link of 1,2,3,4-diepoxybutane.** *Chem. Res. Toxicol*. 17: 129-136.
91. Park S., Hodge J., Anderson C., Tretyakova N.Y. (2004). **Guanine-adenine cross-linking by 1,2,3,4-diepoxybutane: potential basis for biological activity.** *Chem. Res. Toxicol*. 17: 1638-1651.
92. Pfaffl M.W. (2006). **Relative quantification** En: M. Tevfik Dorak (ed). **Real-time PCR.** Taylor & Francis Group, Newcastle, UK, pp. 63-82.
93. Prestayko AW., D'Aoust JC., Issell BF., Crooke ST. (1979). **Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II).** *Cancer Treat. Rev*. 6: 17–39.
94. Rauscher F.J. 3rd., Sambucetti L.C., Curran T., Distel R.J., Spiegelman B.M. (1988). **Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1.** *Cell*. 52: 471–480.
95. Rodríguez A., Sosa D., Torres L., Molina B., Frías S., Mendoza L. (2012). **A Boolean network model of the FA/BRCA pathway.** *Bioinformatics*. 28(6): 858-866.

96. Rosselli F., Sanceae J., Wietzerbin J., Moustacchi E. (1992). **Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia.** *Hum Genet.* 89: 42-48.
97. Rothfuss A., Grompe M. (2004). **Repair Kinetics of Genomic Interstrand DNA Cross-Links: Evidence for Double-Strand Break-Dependent Activation of the Fanconi Anemia/BRCA Pathway.** *Molecular and Cellular Biology.* 24(1): 123-134.
98. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn S. (2004). **Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints.** *Annu. Rev. Biochem.* 73: 39–85.
99. Sartori A.A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S.P. (2007). **Human CtIP promotes DNA end resection.** *Nature.* 450: 509-514.
100. Sathiakumar N., Delzell E., Hovinga M., Macaluso M., Julian J.A., Larson R., Cole P., Muir D.C. (1998). **Mortality from cancer and other causes of death among synthetic rubber workers.** *Occup. Environ. Med.* 55: 230-235.
101. Sengerová B., Allerston C.K., Abu M., Lee S.Y., Hartley J., Kiakos K., Schofield C.J., Hartley J.A., Gileadi O., McHugh P.J. (2012). **Characterization of the human SNM1A and SNM1B/Apollo DNA repair exonucleases.** *J Biol Chem.* 287: 26254–26267.
102. Sgouros J., Gaillard P.H., Wood R.D. (1999). **A relationship between a DNA-repair/recombination nuclease family and archaeal helicases.** *Trends Biobhem Sci.* 24: 95-97.

103. Siddik ZH. (2003). **Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.** *Oncogene*. 22: 7265–7279.
104. Sijbers A.M., de Laat W.L., Ariza R.R., Biggerstaff M., Wei Y.F., Moggs J.G., Karter K.C., Shell B.K., Evans E., de Jong M.C., Rademakers S., de Rooij J., Jaspers N.G., Hoeijmakers J.H., Wood R.D. (1996). **Xenoderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA endonuclease.** *Cell*. 86: 811-822.
105. Smogorzewska A., Desetty R., Saito T.T., Schlabach M., Lach F.P., Sowa M.E., Clark B.P., Kunkel T.A., Harper J.W., Colaiácovo M.P., Elledge S.J. (2010). **A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair.** *Molecular Cell*. 39: 36-47.
106. Sousa M.F.V.Q., Lopes C.E., Pereira J.N. (2002). **Development of a bioprocess for the production of actinomycin-D.** *Braz J Chem Eng*. 19: 277–285.
107. Steen A.M., Meyer K.G., Recio L. (1997). **Analysis of *hprt* mutations occurring in human TKG lymphoblastoid cells following exposure to 1,2,3,4-diepoxybutane.** *Mutagénesis*. 12: 61-67.
108. Stein S., Lao Y., Yang I.Y., Hecht S.S., Moriya M. (2006). **Genotoxicity of acetaldehyde- and cronotaldehyde- induced 1,N²-propanodeoxyguanosine DNA adducts in human cells.** *Mutation Research*. 608: 1-7.
109. Stewart G.S. Maser R.S., Stankovic T., Bressan D.A., Kaplan M.I., Jaspers N.G., Raams A., Byrd P.J., Petrini J.H., Taylor A.M. (1999). **The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in**

- individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder.** *Cell.* 99: 577–587.
110. Stoepker C., Hain K., Schuster B., Hilhorst-Hofstee Y., Roimans MA., Steltenpool J., Oostra AB., Eirich K., Korthof ET., Nieuwint AW., Jaspers NG., Bettecken T., Joenje H., Schindler D., Rouse J., de Wunter JP. (2011). **SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleasas, is mutated in a new Fanconi anemia subtype.** *Nat Genet.* 43: 138-141.
111. Stone M.P., Cho Y-J., Huang H., Kim H-Y., Kosekov I.D., Kozekova A., Wang H., Minko I.G., Lloyd R.S., Haris T.M., Rizzo C.J. (2008). **Interstrand DNA cross-links induced by α , β -unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources.** *Acc. Chem. Res.* 41: 793-804.
112. Surrallés J., Jackson S.P., Jasin M., Kastan M.B., West S.C., Joenje H. (2004). **Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes.** *Genes Dev.* 18: 1359–1370.
113. Svendsen J.M., Harper J.W. (2010). **GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution.** *Genes Dev.* 24: 521-536.
114. Svendsen J.M., Smogorzewska A., Sowa M.E., O'Connell B.C., Gygi S.P., Elledge S.J., Harper J.W. (2009). **Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair.** *Cell.* 138: 63–77.
115. Tomasz M. (1995). **Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective).** *Chem. Biol.* 2: 575-579.

116. Tomicic M.J., Reischmann P., Rasenberger B., Meise R., Kaina B., Christmann M. (2011). **Delayed c-Fos activation in human cells triggers XPF induction and an adaptative response to UVC-induced DNA damage and cytotoxicity.** *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 1785–1798. DOI 10.1007/s00018-010-0546-9
117. Tretyakova N.U., Sangaiah R., Yen T.Y., Swenberg J.A. (1997). **Synthesis, Characterization, and *in Vitro* Quantitation of N-7-Guanine Adducts of Diepoxybutane.** *Chem. Res. Toxicol.* 10: 779-785.
118. Truglio J.J., Rhau B., Croteau D.L., Wang L., Skorvaga M., Karakas E., DellaVecchia M.J., Wang H., Van Houten B., Kisker C. (2005). **Structural insights into the first incision reaction during nucleotide excision repair.** *EMBO J.* 24: 885–894.
119. Tsodikov O.V., Enzlin J.H., Schärer O.D., Ellenberger T. (2005). **Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1.** *PNAS.* 102(32): 11236-11241.
120. Wang A.T., Sengerova B., Cattell E., Inagawa T., Hartley J.M., Kiakos K., Burgss-Brown N.A., Swift L.P., Enzlin J.H., Schofield C.J., Schofield C.J., Gileadi O., Hartley J.A., McHugh P.J. (2011). **Human SNM1A and XPF-ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair.** *Genes Dev.* 25(17): 1859-1870.
121. Yamamoto K., Kobayashi S., Tsuda M., Kurumizaka H., Takata M., Kono K., Jiricny J., Takeda S., Hirota K. (2011). **Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 6492-6496.

122. Zhang X.Y., Langenick J., Traynor D., Babu M.M., Kay R.R., Patel K.J. (2009). **Xpf and not the Fanconi anaemia proteins or Rev3 accounts for the extreme resistance to cisplatin in *Dictyostelium discoideum*.** *PLoS Genet.* 5:e1000645.
123. Zhou B. B., Elledge S.J. (2000). **The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.** *Nature.* 408: 433-439.

XIV. APÉNDICE.

Tabla S1. Fórmula de expresión relativa para los diferentes genes de referencia para XPF.

NL49	XPF/B- Act	XPF/7SL	XPF/B2M	\bar{X}	σ	E.S.		VU817	XPF/B- Act	XPF/7SL	XPF/B2M	\bar{X}	σ	E.S.
SnTx 6H	1.00	1.00	1.00	1.00	0	0		SnTx 6H	0.61	0.58	1.12	0.77	0.31	0.18
MMC 6H	1.03	1.53	4.58	2.38	1.92	1.11		MMC 6H	0.53	1.30	1.79	1.21	0.64	0.37
SnTx 12H	0.76	1.74	0.83	1.11	0.54	0.32		SnTx 12H	0.86	2.32	1.58	1.59	0.73	0.42
MMC 12H	1.55	2.16	3.23	2.31	0.85	0.49		MMC 12H	0.86	1.76	1.54	1.39	0.47	0.27
SnTx 18H	1.07	8.39	2.59	4.02	3.86	2.23		SnTx 18H	2.93	7.76	2.79	4.49	2.83	1.63
MMC 18H	0.85	2.03	1.91	1.60	0.65	0.37		MMC 18H	0.67	0.45	2.76	1.29	1.27	0.74
SnTx 24H	1.40	2.40	2.15	1.98	0.52	0.30		SnTx 24H	0.56	0.77	1.25	0.86	0.35	0.20
MMC 24H	0.89	1.26	1.63	1.26	0.37	0.21		MMC 24H	0.54	0.72	1.42	0.89	0.46	0.27

Tabla S2. Fórmula de expresión relativa para los diferentes genes de referencia para MUS81.

MUS81/B- NL49							MUS81/B- VU817						
Act	MUS81/7SLM	MUS81/B2M	\bar{X}	σ	E.S.		Act	MUS81/7SLM	MUS81/B2M	\bar{X}	σ	E.S.	
SnTx 6H	1.00	1.00	1.00	1.00	0	0	SnTx 6H	0.91	0.87	1.69	1.16	0.46	0.26
MMC 6H	0.51	0.76	2.27	1.18	0.95	0.55	MMC 6H	0.50	1.23	1.70	1.14	0.60	0.35
SnTx 12H	0.92	2.11	1.01	1.34	0.66	0.38	SnTx 12H	0.77	2.07	1.41	1.42	0.65	0.38
MMC 12H	1.22	1.70	2.55	1.82	0.67	0.39	MMC 12H	0.93	1.91	1.67	1.50	0.51	0.29
SnTx 18H	0.53	4.17	1.29	2.00	1.92	1.11	SnTx 18H	1.59	4.22	1.52	2.45	1.54	0.89
MMC 18H	0.64	1.54	1.44	1.21	0.49	0.28	MMC 18H	1.25	0.85	5.18	2.43	2.39	1.38
SnTx 24H	1.09	1.87	1.68	1.55	0.40	0.23	SnTx 24H	0.79	1.09	1.77	1.22	0.50	0.29
MMC 24H	1.10	1.54	2.00	1.55	0.45	0.26	MMC 24H	0.60	0.80	1.57	0.99	0.51	0.29

Tabla S3. Fórmula de expresión relativa para los diferentes genes de referencia para SLX1.

NL49	SLX1/B-			\bar{X}	σ	E.S.	VU817	SLX1/B-			\bar{X}	σ	E.S.
	Act	SLX1/7SL	SLX1/B2M					Act	SLX1/7SL	SLX1/B2M			
SnTx 6H	1.00	1.00	1.00	1.00	0	0	SnTx 6H	1.06	1.01	1.97	1.35	0.54	0.31
MMC 6H	0.61	0.91	2.72	1.41	1.14	0.66	MMC 6H	0.40	0.98	1.36	0.91	0.48	0.28
SnTx 12H	0.30	0.69	0.33	0.44	0.21	0.12	SnTx 12H	0.45	1.22	0.83	0.83	0.38	0.22
MMC 12H	0.57	0.79	1.19	0.85	0.31	0.18	MMC 12H	0.47	0.96	0.84	0.76	0.26	0.15
SnTx 18H	0.25	1.95	0.60	0.93	0.90	0.52	SnTx 18H	0.46	1.22	0.44	0.70	0.44	0.26
MMC 18H	0.29	0.70	0.66	0.55	0.22	0.13	MMC 18H	0.43	0.29	1.79	0.84	0.83	0.48
SnTx 24H	0.54	0.93	0.84	0.77	0.20	0.12	SnTx 24H	0.43	0.60	0.97	0.67	0.27	0.16
MMC 24H	0.59	0.83	1.08	0.83	0.24	0.14	MMC 24H	0.53	0.71	1.40	0.88	0.44	0.26

Tabla S4. Fórmula de expresión relativa para los diferentes genes de referencia para SLX4.

NL49	SLX4/B-			\bar{X}	σ	E.S.	VU817	SLX4/B-			\bar{X}	σ	E.S.
	Act	SLX4/7SL	SLX4/B2M					Act	SLX4/7SL	SLX4/B2M			
SnTx 6H	1.00	1.00	1.00	1.00	0	0	SnTx 6H	0.69	0.66	1.28	0.88	0.35	0.20
MMC 6H	0.64	0.95	2.84	1.48	1.19	0.69	MMC 6H	0.46	1.12	1.55	1.04	0.55	0.32
SnTx 12H	0.59	1.35	0.65	0.86	0.43	0.25	SnTx 12H	0.76	2.05	1.40	1.40	0.64	0.37
MMC 12H	1.28	1.79	2.68	1.92	0.71	0.41	MMC 12H	0.80	1.64	1.44	1.29	0.44	0.25
SnTx 18H	9.61	0.68	2.97	4.42	4.64	2.68	SnTx 18H	1.67	4.43	1.59	2.56	1.61	0.93
MMC 18H	3.84	0.62	3.60	2.69	1.79	1.03	MMC 18H	1.36	0.92	5.65	2.64	2.61	1.51
SnTx 24H	2.80	0.41	2.52	1.91	1.31	0.75	SnTx 24H	0.99	1.35	2.20	1.51	0.62	0.36
MMC 24H	2.42	0.26	3.14	1.94	1.50	0.86	MMC 24H	0.86	1.16	2.27	1.43	0.74	0.43

Tabla S5. Fórmula de expresión relativa para los diferentes genes de referencia para FAN1.

NL49	FAN1/B-			\bar{X}	σ	E.S.	VU817	FAN1/B-			\bar{X}	σ	E.S.
	Act	FAN1/7SL	FAN1/B2M					Act	FAN1/7SL	FAN1/B2M			
SnTx 6H	1.00	1.00	1.00	1.00	0	0	SnTx 6H	0.43	0.41	0.80	0.55	0.22	0.13
MMC 6H	0.26	0.39	1.16	0.60	0.49	0.28	MMC 6H	0.35	0.86	1.19	0.80	0.42	0.24
SnTx 12H	1.19	2.75	1.31	1.75	0.86	0.20	SnTx 12H	0.99	2.66	1.82	1.82	0.84	0.48
MMC 12H	1.17	1.63	2.45	1.75	0.65	0.37	MMC 12H	0.63	1.29	1.13	1.01	0.34	0.20
SnTx 18H	1.06	8.34	2.58	3.99	3.84	2.22	SnTx 18H	2.63	6.97	2.51	4.04	2.54	1.47
MMC 18H	1.22	2.90	2.73	2.28	0.93	0.53	MMC 18H	0.37	0.25	1.52	0.71	0.70	0.41
SnTx 24H	1.41	2.42	2.17	2.00	0.52	0.30	SnTx 24H	0.82	1.12	1.82	1.25	0.51	0.30
MMC 24H	2.45	3.45	4.47	3.45	1.01	0.58	MMC 24H	0.73	0.98	1.91	1.21	0.62	0.36