



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR AL USO DEL INHIBIDOR  
DEL COMPLEJO MRN SOBRE CÉLULAS DE ANEMIA DE FANCONI”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA  
MOISÉS ÓSCAR FIESCO ROA

TUTOR  
M. EN C. ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ GÓMEZ



MÉXICO, D.F.

2015



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.

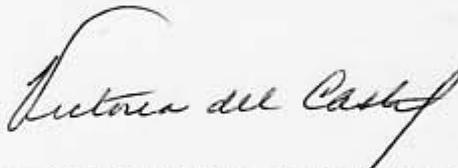
"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR AL USO DE INHIBIDOR DEL COMPLEJO MRN SOBRE CÉLULAS DE ANEMIA DE FANCONI"



DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS  
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



DR. LUIS MARTÍN GARRIDO GARCÍA  
JEFE DE DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA



M. EN C. ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ GÓMEZ  
TUTOR DE TESIS

## **Agradecimientos académicos**

Este proyecto se desarrollo en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría bajo la tutoría del M. En C. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez y la asesoría de la Dra. Sara Frías Vázquez, como parte del proyecto PAPIIT IA 201713 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM/Instituto Nacional de Pediatría y el proyecto 043-12 de Fondos Federales, Instituto Nacional de Pediatría, SSA.

## Agradecimientos personales

La gratitud es un sentimiento que nos invita a estimar el favor que se nos ha hecho o ha querido hacer, y a corresponder a él de alguna manera. Está vinculada al afecto puro y desinteresado, compartido con otra persona, que nace y se fortalece con el trato. Es un sentimiento de reconocimiento; no solo la más grande de las virtudes, sino la madre de todas las demás.

Múltiples estudios parecen demostrar la correlación entre la gratitud y el aumento de bienestar no solo para el individuo que agradece, sino para todas las personas involucradas.

¡Gracias a todos los que, de múltiples formas, me acompañan!

*“Gracias por ser parte de lo que más amo.  
Gracias por entender mis enfados.  
Gracias por demostrarme que se puede.  
Gracias por tomar lo que te doy.  
Gracias por estar en mi vida.”*

*Mam:* eres una mujer genial y poderosa, no dejes que la vida y sus inamovibles inclemencias te apachurren; lucha incansablemente y podrás tener maravillosas cosas hoy y siempre. Te amo.

Gracias por tu incondicional apoyo; por tu cariño y abrazo; por tus besos y apapachos.

*“Dar gracias a Dios por lo que se tiene, allí comienza el arte de vivir.”*  
Gracias Señor por la buena vibra y el apoyo en cada momento. Gracias por dejar que mis “Angelitos” me sigan acompañando.

*“La memoria del corazón elimina los malos recuerdos y magnifica los buenos, y gracias a ese artificio, logramos sobrellevar el pasado.”*

*Clau:* jamás podré terminar de agradecer lo que tu grandiosa amistad me ha brindado; sin embargo, eso es bueno, porque así siempre estaré a tu lado. Te quiero mucho y mucho.

*“El vínculo que te une a tu familia no es solo el de la sangre; es el del respeto, cariño y la alegría que sientes por su vida.”*

*Sou y Taly:* gracias por ayudarme a ser un “Rorro”; no hay nada mejor que sentirme amado por ustedes y recordar, en el día a día, que siempre seré afortunado por tener su apoyo e incondicional cariño. Las amo.

Gracias a mis *Chamarros*, quienes son el por qué de lo que hago y lucho. Han sido un ejemplo incomparable de alegría, lucha, cariño y bondad. Sin ellos esto jamás se habría logrado.

*"El que recibe nunca debe olvidar."*

El *INP* se convirtió en mi segunda casa, aunque a veces parecía incluso la primera; de día y de noche. Gracias por brindarme tu abrigo, conocimiento y apoyo.

*"El agradecimiento es la memoria del corazón."*

*Dra. Vicky:* muy agradecido estoy de su incansable cariño y enseñanza, sin duda soy enormemente afortunado al haber tenido la oportunidad de crecer a su lado y de aprender mil cosas; displasias óseas, ADS, abordajes, etcétera, pero sobre todo que debemos ser felices con lo que tenemos.

*"El ánfora guarda siempre el aroma del primer vino que guardó."*

*Sara:* ¡cuánto no te debo! A resumidas cuentas: un gran impulso en mi vida académica. Eres un ejemplo vivo y tenaz de alegría, lucha e inteligencia. Gracias por darme la oportunidad de estar cerca y de aprender junto a ustedes. Te quiero mucho.

*"Valiosa es la semilla del conocimiento que siembra el maestro en sus discípulos y enorme el agradecimiento que para ello debe haber."*

*Drs. Ari y Miguel:* sin palabras quedo si quiero agradecer la formación y el apoyo brindado; sé que su huella queda grabada en mí.

*"La gratitud en silencio no sirve a nadie."*

*Emiy:* de corazón espero que todo lo que hiciste por mí te sea enteramente retribuido. Gracias muchas.

*"Demos gracias a los hombres y a las mujeres que nos hacen felices y nos enseñan, ellos son los encantadores jardineros que hacen florecer a nuestros espíritus."*

*Dra. Lieberman:* gracias por sembrar en mí la más genial propuesta de atención, desinteresada y comprometida para con los pacientes, así como también miles de conocimientos.

*"Cada vez que subas un peldaño, agradece a los que te apoyaron; esto también es su logro."*

*Dr. Camilo:* agradezco sobremanera lo enseñando, incluyendo la paciencia, el apoyo y la confianza. Me llevo para siempre su huella genética.

*"Vive como si fueras a morir mañana, aprende como si fueras a vivir para siempre."*  
Muchas gracias mis amigos laboratorios de Biología Molecular, Citogenética y Cultivo de Tejidos, a todo el INP y sus extensiones. A cada uno de sus integrantes, perennes y pasajeros, les guardo un profundo cariño. Aprendí tanto de cada uno; de la Genética, pero sobretodo de la Vida.

*Nan, Miriam, Ara, Pepe, Cesa, Vic, Rehot, Leda, Luz, Bertha, MP, Chivis, Arm, Chío, Pills, Berna, Ben, Adri, Paty, Juan Carlos, Charly, Rob, Sandra, Tocayo, Bully, Vero, Mel, Chelo, Rebe, Mon, Aure...si algunos escapan a mi memoria, disculpen.*

Mis fabulosos Rs: *Alex, Chío, Samito, Eli, Pau, Majo, Acondro, Xim, Lili y Vian.* Aprendí mil y un cosas de ustedes y me considero el más afortunado porque además tengo la dicha de ser su amigo. Gracias por potenciar mis esperanzas, fuerza y libertad.

Lo mejor de vivir en este mundo es que cada día nos trae nuevas sorpresas, la sorpresa de hallar a un grandioso amigo como tú nunca se terminará de agradecer. Obvio sin ti esto nunca hubiera comenzado. Juntos desde el principio de los tiempos y para siempre.  
Te quiero *Alf.*

#### *Marsun et Adri:*

Nosotros somos lo mejor del mundo mundial, ¿por qué?, por mil cosas, aquí unos ejemplos: el pan en el cajón; el aula de la resi con nuestro súper repaso para el Consejo; la pizza de 4 quesos en mi depa; Gdl., Mérida y Cancún; los PUEM; los consultorios 1, 2 y 3...a veces también el 17; la cóclea, la cloaca y el MORM; la narcoboda de León; los mejores disfraces del día del niño; 3-21 echando el veneno y el estudio; el Genopardy del INP, porque ese obvio lo ganamos entre los 3; nuestros cientos de genes y pseudogenes; uff, creo que nunca acabaría.

Adoro que siempre están dispuestas a escuchar, a aconsejar y, obvio, a ayudar. Gracias por entender mi pasado y creer en mi futuro, pero sobre todo por amarme.

*“A mis amigos les adeudo la paciencia de tolerarme, entre otras cosas, las espinas más agudas, los arrebatos del humor, la locura, los temores y las dudas.”*

*Nenas Jules, Netzi y Eunice: son ustedes el pilar más generoso, frito y amigable que alguien puede tener. Agradezco la libertad de ser yo mismo, de saltar, de abrazar, de querer, de llorar, en fin, todo lo que un Nene siempre desea para la vida. Todo resumido en la frase: “hagas lo qué hagas...”.*

*Dave: gracias, todo esto se construyo con tu apoyo y cariño.*

*La Banda:*

*Como les explico que su amistad es “bomba 10 con potencial a más”. Obvio sin ustedes esto, mmm no sé, no hubiera sido taaaan bueno; más para la vida que para la función. Oct, Clau, Bini, Mate, Julián, Bets, Fabs, Bleu, Vito, Neca, Jess, Corderito, Gaba, Jules, Fa, Baruchín, Von, Flor, Nadia, Rox, JuanJo, Ro, Offo y una gran lista de amigos, que en el camino me acompañaron, muchas gracias.*

*Anke y Adán:*

*Los grandes amigos son difíciles de encontrar, complicados de dejar e imposibles de olvidar. Me llena de alegría contar con ustedes, “CRIT team”.*

## 1. INTRODUCCIÓN

a. Aspectos clínicos de los pacientes con anemia de Fanconi.....	1
i. Antecedentes históricos y epidemiología.....	1
ii. Características clínicas.....	1
iii. Diagnóstico.....	4
1. Metodologías diagnósticas.....	4
a. Análisis de aberraciones cromosómicas (AC)	
b. Ensayo de inmunoblot para evaluar la monoubiquitinación de la proteína FANC-D2.	
c. Ensayo de evaluación de arresto del ciclo celular.	
d. Determinación del grupo de complementación.	
2. Diagnóstico diferencial.....	7
iv. Generalidades de tratamiento y seguimiento.....	7
1. Vigilancia.....	7
a. Anomalías físicas.	
b. Seguimiento de alteraciones hematológicas y bioquímicas.	
2. Tratamiento.....	8
a. Andrógenos.	
b. Factores de crecimiento hematopoyético.	
c. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (HSCT).	
3. Seguimiento y prevención de tumores sólidos.....	9
b. Características moleculares de la anemia de Fanconi.....	10
i. Genes.....	10
ii. Correlaciones genotipo-fenotipo.....	11
c. Descripción de la vía FA/BRCA.....	11
d. Competencia entre la reparación por recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos para reparar rupturas de doble hebra.....	15
i. Complejo MRN.....	16

1. Mutaciones del complejo MRN: causa de enfermedad.....	16
2. Funciones del complejo MRN en la reparación de las DSBs.....	20
3. Selección de la vía de reparación: HRR versus NHEJ.....	21
4. La contribución de MRN en la elección de la vía de reparación.....	23
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>3. DISEÑO DEL ESTUDIO.....</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### a. Aspectos clínicos de los pacientes con anemia de Fanconi.

#### i. Antecedentes históricos y epidemiología.

El médico Guido Fanconi fue el primero en describir, en 1927, a tres pacientes con anemia, microcefalia, hiperpigmentación cutánea e hipoplasia testicular. Tiempo después se determinó que esta patología se asociaba con predisposición al desarrollo de cáncer (Lobitz & Velleuer, 2006).

La incidencia de la anemia de Fanconi (AF) está estimada en 1:360,000 nacimientos, con una media de supervivencia de 20 años actual [Auerbach, 2009] y una frecuencia de portadores de 1:300 [Swift 1971], pero recientes reportes sugieren una frecuencia de portadores mayor, 1:181 en EUA [Rosenberg et al., 2011]. En algunas poblaciones, como los judíos Ashkenazi, grupos de gitanos de España y sudafricanos, la frecuencia de portadores es más alta, pudiendo llegar a ser de hasta 1:100 [Kutler & Auerbach 2004, Callen et al., 2005, Morgan et al., 2005].

#### ii. Características clínicas.

La AF es un síndrome de inestabilidad genómica con heterogeneidad genética y es la causa hereditaria más frecuente de falla medular [Alter B & Shimamura, 2010]. Los genes relacionados con la enfermedad son hasta el momento 16 (*FANCA-Q*) y sus mutaciones se heredan de modo autosómico recesivo (AR), con excepción de *FANCB* que tienen una herencia ligada al X [Alter & Shimamura, 2010, Kutler DI, 2003, Rosenberg PS, 2003].

La AF presenta un amplio espectro de características clínicas, con una expresividad muy variable, las cuales pueden quedar agrupadas en 3 categorías principales: anomalías en el desarrollo, defectos hematopoyéticos y susceptibilidad a desarrollar neoplasias [Crossan & Patel, 2012].

**Anomalías del desarrollo.** Las malformaciones congénitas son diversas, se presentan en aproximadamente 75% de los afectados y presentan una frecuencia un poco más

elevada en hombres (H:M 1.2:1) [Shimamura & Alter 2010]. A continuación se presenta un listado de algunas de las malformaciones congénitas más frecuentes, sin embargo el espectro fenotípico es muy amplio.

- Peso y talla bajos (~40%).
- Alteraciones cutáneas (~40%), hipopigmentación generalizada o parcial y manchas café con leche.
- Esqueléticas:
  - Extremidades superiores, de forma uni o bilaterales (~35%).
    - Pulgar (~35%): ausente, hipoplásico, duplicado, con implantación anormal, bífido, trifalángico.
    - Eje radial (~7%): ausente o hipoplásico (con o sin alteración del pulgar).
    - Manos (~5%): alteración de la eminencia tenar, primer metacarpiano ausente, clinodactilia o polidactilia.
    - Cúbito (~1%): displásico o corto.
  - Miembros inferiores (5%).
    - Pie: sindactilia, primer orjejo anormal, pie equino varo.
    - Displasia del desarrollo de la cadera.
  - Cuello (1%): anomalía de Klippel-Feil, corto y ancho.
  - Columna (2%): defecto del cierre del tubo neural, escoliosis, hemivértebras, anomalías costales, agenesia de cóccix
- Craniofacial (20%): microcefalia y dismorfias faciales menores.
- Oculares (20%): microftalmia, catarata, astigmatismo, estrabismo, epicanto, hiper/hipotelorismo, ptosis.
- Renales (20%): riñón en herradura, ectópico o ausente, hipo/displásico, hidronefrosis, alteraciones ureterales.
- Genitales y relacionadas con la fertilidad.
  - Hombres (25%): hipospadias, criptorquidia o agenesia o hipoplasia testicular, hipo/azoospermia.
  - Mujeres (2%): malformaciones uterinas, mayor incidencia de complicaciones durante el parto.

- Discapacidad intelectual de grado variable, generalmente leve (10%).
- Oído (10%): hipoacusia (usualmente conductiva, secundaria a malformaciones de huesecillos del oído medio), pabellones auriculares dismorfológicos/displásicos.
- Cardiopulmonar (6%).
- Gastrointestinales (5%): fístula tráqueo-esofágica, páncreas anular, malrotación intestinal, malformaciones anales.
- De sistema nervioso central (3%): síndrome de interrupción del tallo hipofisario [Dupuis-Girod et al., 2001], agenesia de cuerpo calloso, hipo/atrofia cerebelosa, hidrocefalia, dilatación ventricular.

**Falla medular.** Generalmente los pacientes con AF desarrollan algún grado de disfunción medular, que va desde citopenias asintomáticas hasta leucemia o síndrome mielodisplásico (SMD). Por lo que cualquier alteración hematológica relacionada con el fenotipo de AF requiere evaluación diagnóstica. Las guías para el diagnóstico de AF sugieren que si los conteos celulares no se recuperan después de 2 meses, el análisis de aberraciones cromosómicas está indicado. Sin embargo la ausencia de alguna alteración hematológica no descarta el diagnóstico [Eiler et al., 2008].

Las complicaciones hematológicas aparecen típicamente en la primera década de la vida, aunque la edad de presentación y gravedad pueden ser muy variables [Landmann et al., 2004, Shimamura & Alter 2010]. La falla medular grave (definida como la necesidad de trasplante de médula ósea) tiene un riesgo de presentación a los 10 años de 5%/año, y para los 50 años un riesgo acumulado de cualquier evento hematológico (no necesariamente grave) de 90% [Rosenberg et al., 2003, Alter et al., 2010, Kutler et al., 2003].

**Susceptibilidad a cáncer:** aproximadamente el 9% de los pacientes con AF desarrollan leucemia (la más frecuente es la leucemia mieloide aguda (LMA)) y 7% SMD [Alter 2003]. El riesgo relativo para LMA incrementa aproximadamente 500 veces [Rosenberg et al., 2003, Rosenberg et al., 2008, Alter et al., 2010, Tamary et al., 2010],

con un riesgo acumulado de 13% a los 50 años, la mayoría de los casos se presentan entre los 15 y 35 años.

Los hallazgos de anomalías citogenéticas asociadas a SMD requieren vigilancia estrecha por el riesgo de desarrollo de leucemia [Alter et al., 2000]. Los pacientes con AF tienen más frecuentemente alteraciones cromosómicas asociadas al desarrollo de leucemia y/o SMD. Las aberraciones cromosómicas más comúnmente encontradas son: trisomía 1q, monosomía 7, trisomía parcial 3q, monosomía parcial 21q. Es frecuente que pacientes con AF presenten alteraciones cromosómicas oligoclonales en médula ósea sin otros cambios de malignidad. En estudios recientes se refieren que alteraciones en los cromosomas 3 y 7 que se encuentran asociadas con un riesgo incrementado de desarrollo de MSD o LMA [Mehta PA, et al 2010, Tonnie et al., 2003, Cioc et al., 2010].

El riesgo de desarrollo de tumores sólidos, particularmente de cabeza y cuello, piel, esófago y ginecoobstétricos está también incrementado [Kutler et al., 2003, Rosenberg et al., 2003, Rosenberg et al., 2008, Alter et al., 2010, Tamary et al., 2010], con un riesgo relativo de 40 y una incidencia acumulada del 30% a los 50 años. Los tumores de cabeza y cuello, esofágicos y vulvares en general son del tipo de células escamosas.

### **iii. Diagnóstico.**

#### **1. Metodologías diagnósticas.**

La AF debe ser sospechada en individuos con alguna de las siguientes características: anomalías físicas relacionadas con ella, falla medular progresiva, anemia aplásica, SMD, tumores sólidos relacionados y/o aumento en el daño celular a la exposición de agentes clastogénicos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que aproximadamente una tercera parte de los pacientes no presentarán ninguna malformación congénita visible, que hasta 10% de los pacientes pueden no presentar alteraciones hematológicas y que sólo 10% de los pacientes cursarán con algún tipo de neoplasia.

Existen diferentes metodologías para el diagnóstico de la AF, dentro de las que se encuentran las siguientes:

**a. Análisis de aberraciones cromosómicas (AC).**

Se basa en el análisis de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas con agentes inductores de enlaces covalentes cruzados (ICL), como diepoxibutano (DEB) [Auerbach 1993] o mitomicina C (MMC) [Cervenka et al., 1981], en cultivos celulares de linfocitos T de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina. Este ensayo debe realizarse comparando el número de aberraciones con un control negativo o positivo. La tasa de AC en células control puede ser más variable con MMC, por eso algunos centros prefieren DEB, pero ambos son útiles para el diagnóstico.

El análisis de AC con esta metodología puede incluir el número de AC/célula, el porcentaje de células, tipo y proporción de AC, así como el, recientemente descrito, índice de fragilidad cromosómica [Castella M, et al. 2011].

En respuesta al tratamiento con los agentes usados se observa un incremento en el número total y la proporción de AC en células de pacientes con AF, aunque esto no es exclusivo de AF, pues existen otros síndromes que pueden presentar inestabilidad cromosómica. Sin embargo, un dato ampliamente sugestivo de AF es el incremento/aparición de figuras de intercambio radial.

Se ha visto que el incremento en la sensibilidad a DEB/MMC no guarda relación con el fenotipo o genotipo.

Entre el 25-30% de los pacientes con AF presentan un mosaico celular, al menos en tejido hematopoyético, esto debe tenerse en consideración al momento de realizar el análisis de los resultados. El mosaico se define como la presencia de más de una línea celular en algún tejido o individuo. La presencia de la línea celular revertante en los pacientes con AF podría atribuirse a un evento de conversión génica, que restituye el fenotipo normal en la célula [Lo Ten Foe et al., 1997, Waisfisz et al., 1999, Gross et al., 2002]. Se pueden usar diferentes alternativas para establecer la presencia de mosaico. A continuación se enumeran algunas:

1. Usar otro tejido, por ejemplo piel, para evaluar la respuesta de los fibroblastos al tratamiento DEB/MMC.
2. El uso del índice de fragilidad cromosómica (IFC) que permite clasificar al paciente como AF-no mosaico, AF-mosaico e individuos sanos.
3. Como estándar de oro, determinar la mutación y la revertante en los diferentes tejidos del paciente.

**b. Ensayo de inmunoblot para evaluar la monoubiquitinación de la proteína FANC-D2.**

Las proteínas FANC-A, B, C, E, F, G, I, L y M forman un complejo que se requiere para la monoubiquitinación, río abajo, del dímero proteico FANC-D2/I. Esta modificación es esencial para la integridad funcional de la vía FA/BRCA. La monoubiquitinación del dímero FANC-D2/I se encuentra conservada en otros síndromes de falla medular o inestabilidad cromosómica [Shimamura et al., 2002], por lo cual posee una elevada especificidad, sin embargo, si el defecto en la vía se encuentra en las proteínas río abajo la prueba resultará negativa.

**c. Ensayo de evaluación de arresto del ciclo celular.**

Las células de los pacientes con AF poseen un fenotipo que condiciona un arresto del ciclo celular en fase G2. El tratamiento con MMC induce un mayor arresto en fase G2, el cual puede ser evaluado mediante ensayo de citometría de flujo; la AF es sospechada cuando una gran proporción de células se acumulan en fase G2 [Pulsipher et al., 1998].

**d. Determinación del grupo de complementación.**

Hasta la fecha se han categorizado 17 genes relacionados con el fenotipo de AF, a estos se les denomina grupos de complementación. El grupo de complementación puede ser identificado mediante la transfección viral que corrige el fenotipo de AF [Pulsipher et al., 1998] [Chandra et al., 2005] o mediante la determinación de la mutación.

## 2. Diagnóstico diferencial

Podemos clasificar los diagnósticos diferenciales de la misma manera que se agrupan las manifestaciones de los pacientes con AF: anomalías en el desarrollo, defectos hematopoyéticos y susceptibilidad a desarrollar neoplasias. En la tabla 1 se presentan algunos de los diagnóstico diferenciales de AF.

**Tabla 1.** Diagnósticos diferenciales de la AF.

Tipo de alteración	Diagnóstico diferencial
Anomalías en el desarrollo	VACTERL Síndrome de Holt-Oram Trombocitopenia con aplasia radial (TAR) Nijmegen Seckel NF1
Defectos hematopoyéticos	Disqueratosis congénita
Susceptibilidad a desarrollar neoplasias	Cáncer esporádico Seckel Nijmegen

[Nakanishi et al., 2002, Gennery et al., 2004, Andreassen et al., 2004, Faivre et al., 2005].

### iv. Generalidades de tratamiento y seguimiento.

El manejo clínico de los pacientes con AF requiere de un equipo multidisciplinario experto. Las recomendaciones completas para el diagnóstico se encuentran en las guías de diagnóstico y manejo de pacientes con AF de 2008 [Eiler et al., 2008]. A continuación se realiza un breve resumen de las recomendaciones básicas de abordaje.

#### 1. Vigilancia.

##### a. Anomalías físicas.

Al momento del diagnóstico, a fin de descartar alteraciones asociadas, realizar los siguientes estudios:

- Ultrasonografía renal.
- Evaluación de coeficiente intelectual (CI).
- Evaluación auditiva, oftalmológica, otorrinolaringológica, endocrinológica, gastroenterológica, quirúrgica, ginecológica y urológica.
- Valoración genética.
- Biometría hemática completa (BHC), pruebas de función tiroidea y hepática.

#### **b. Seguimiento de alteraciones hematológicas y bioquímicas.**

La evaluación hematológica recomendada, para los pacientes con recuentos celulares periféricos normales y sin anomalías clonales, es una BHC cada 3-4 meses y un análisis de citogenético e histopatológico de médula ósea (MO) anual. Para los pacientes con alguna anomalía clonal citogenética, pero con recuentos normales o levemente bajos se recomienda determinación de HLA en el individuo y familiares, a fin de considerar trasplante alogénico de MO.

En todos los pacientes sometidos a transfusiones es recomendable realizar pruebas de función hepática (PFH), pruebas de función respiratoria y perfil de hierro cada 6 meses.

## **2. Tratamiento.**

### **a. Andrógenos.**

Alrededor del 50% de los pacientes mejoran los conteos celulares tras la administración de andrógenos. La respuesta inicia con un aumento de los eritrocitos, de hemoglobina y con reticulocitosis, lo que ocurre generalmente en los primeros dos meses de tratamiento. La respuesta en la mejora de los conteos celulares de leucocitos y plaquetas es variable. Algunos pacientes pueden desarrollar resistencia a la terapia. El andrógeno recomendado es la oximetolona a una dosis de 2-5 mg/kg/día. La dosis puede reducirse a la mínima efectiva, basados en la BHC. Los efectos no deseados incluyen toxicidad hepática, colestasis, peliosis hepática (lesiones vasculares hepáticas con quistes llenos de sangre) y tumores hepáticos [Shimamura & Alter 2010], por lo que se recomienda un ultrasonido hepático cada 3 meses durante la administración.

### **b. Factores de crecimiento hematopoyético.**

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) mejora el conteo de neutrófilos en algunos pacientes. Antes del inicio de la terapia debe realizarse un aspirado de médula ósea y repetirse, como monitoreo, de manera frecuente durante la administración del factor [Shimamura & Alter 2010].

### **c. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (HSCT).**

Hasta la fecha es la única terapia efectiva para limitar las manifestaciones hematológicas de la AF (citopenias, SMD y leucemia). Idealmente, para una mejor respuesta, el trasplante de HSCT debe realizarse antes del inicio de MDS/LMA y con el menor número de transfusiones posibles [MacMillan & Wagner 2010].

Debido a que los pacientes con AF son altamente sensibles a la toxicidad producida por la quimioterapia y la radioterapia usadas como preparación para el HSCT, se recomienda usar dosis bajas de éstas. El uso de adyuvantes, como la fludarabina, ha disminuido la tasa de falla en el trasplante.

Algunos estudios refieren que en pacientes que han sido tratados satisfactoriamente con HSCT el riesgo de tumores sólidos, especialmente carcinomas de células escamosas de lengua, se encuentra incrementado hasta 4 veces [Rosenberg et al., 2005].

## **3. Seguimiento y prevención de tumores sólidos.**

La mayoría de los tumores sólidos se desarrollan después de la primera o segunda décadas de la vida. El tratamiento temprano y agresivo de los síntomas sugestivos de malignidad es importante y determinante en la supervivencia de los pacientes, siendo el tratamiento de elección la remoción quirúrgica. El manejo de los tumores es complicado, debido a que los pacientes con AF presentan una sensibilidad aumentada a la quimioterapia y a la radioterapia.

La vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH) es recomendada a hombres y mujeres con el fin de disminuir el riesgo de cáncer derivado de la infección por este virus. Esta protección ha sido probada para cáncer ginecológico, pero aún no para cáncer oral [Karimi M, et al. 2009].

El régimen de vigilancia debe incluir lo siguiente:

- Revisión anual ginecológica, con papanicolau desde el comienzo de la menarca o a los 16 años.
- Evaluaciones estomatológicas frecuentes, que incluyan nasolaringoscopia al comienzo de la primera década de la vida o después de un año del HSCT.
- Una endoscopia faringolaríngea anual es recomendada por algunos centros, aunque no por las guías.

## **b. Características moleculares de la anemia de Fanconi.**

### **i. Genes.**

Son 17 los grupos de complementación hasta la fecha relacionados con el fenotipo AF:

1. *FANCA* [Apostolou et al., 1996, Fanconi Anaemia/Breast Cancer Consortium 1996, Lo Ten Foe et al., 1996].
2. *FANCB* [Meetei et al., 2004].
3. *FANCC* [Strathdee et al., 1992].
4. *FANCD1 (BRCA2)*, asociado con cáncer de mama y ovario hereditario en heterocigotos [Howlett et al., 2002].
5. *FANCD2* [Timmers et al., 2001].
6. *FANCE* [de Winter et al., 2000].
7. *FANCF* [de Winter et al., 2000].
8. *FANCG (XRCC9)* [de Winter et al., 2000].
9. *FANCI* [Dorsman et al., 2007, Sims et al., 2007, Smogorzewska et al., 2007].
10. *FANCI (BRIP1 o BACH1)* [Levitus et al., 2005, Litman et al., 2005].
11. *FANCL* [Meetei et al., 2003].
12. *FANCM* [Meetei et al., 2005].
13. *FANCN (PALB2)* [Reid et al., 2007, Xia et al., 2007].
14. *FANCO (RAD51C)* [Vaz et al., 2010].
15. *FANCP (SLX4)* [Kim et al., 2011, Stoepker et al., 2011].
16. *FANCO (XPF)* [Bogliolo M, et al., 2013].
17. *BRCA1* [Sawyer et al. 2015]

El análisis molecular es complejo debido a la heterogeneidad de *loci* y alélica. Aún cuando el grupo de complementación haya sido establecido mediante técnicas de complementación, la determinación de la mutación responsable mediante secuenciación del gen es necesaria. Sólo en algunos casos el análisis molecular puede ser dirigido, por ejemplo en los judíos ashkenazi (c.456+A>C en *FANCC*).

## ii. Correlaciones genotipo-fenotipo.

***FANCC***. Algunas mutaciones como c.456+4A>T (la más frecuente para este grupo de complementación, y con alta prevalencia en los judíos ashkenazi) y p.L554P están asociadas con un inicio temprano de las manifestaciones hematológicas y una incidencia aumentada de defectos congénitos [Yamashita et al., 1996, Gillio et al., 1997].

***FANCD1/BRCA2***. Se han asociado con un inicio temprano de LMA [Wagner et al., 2004] y tumores sólidos [Hirsch et al., 2004]. La incidencia acumulada de algún tipo de cáncer es de 97% a los 6 años [Alter et al., 2007].

***FANCG***. Mutaciones en *FANCG* se han visto asociadas con citopenias más graves, así como un incidencia más alta de leucemia [Faivre et al., 2000].

## c. Descripción de la vía FA/BRCA.

Los enlaces covalentes cruzados o ICL (por sus siglas en inglés), son lesiones que impiden la progresión de la transcripción y la replicación, por estancamiento de la horquilla de replicación; por lo que resulta imprescindible removerlos en cualquier fase del ciclo celular mediante la coordinación de varias vías de reparación.

**Tabla 2.** Grupos de complementación de AF.

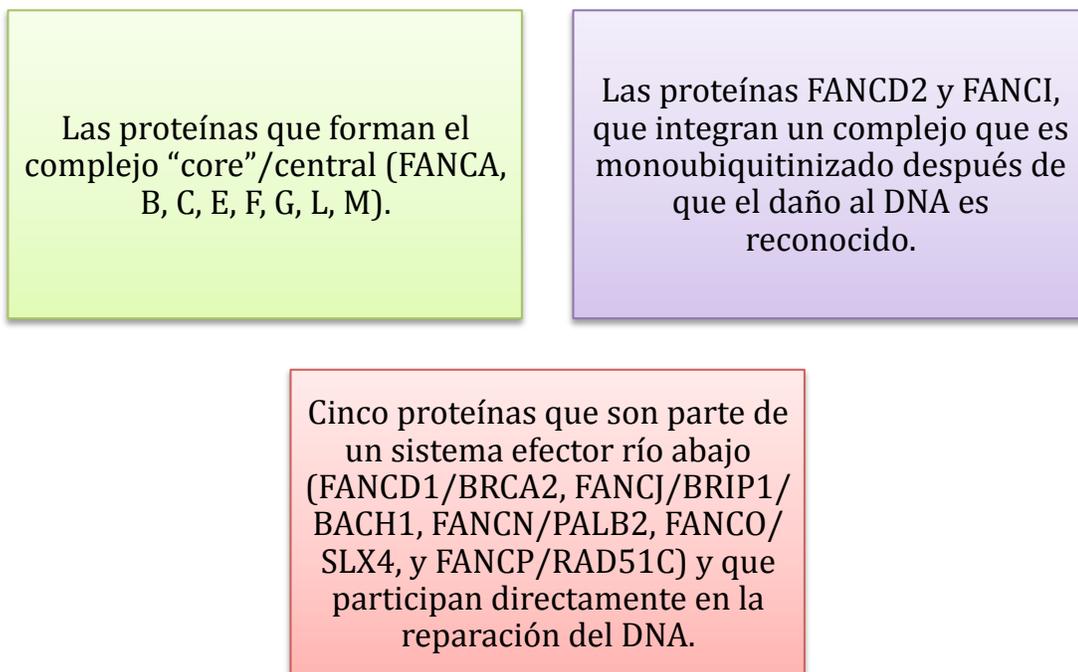
Grupo de complementación	Gen	Porcentaje de pacientes atribuible a la mutación	Método de diagnóstico molecular
FA-A	<i>FANCA</i>	60%-70%	Secuenciación <sup>1</sup> Análisis del/dup <sup>2</sup>
FA-B	<i>FANCB</i>	~2%	Secuenciación Análisis del/dup <sup>2</sup>
FA-C	<i>FANCC</i>	~14%	Análisis mutacional dirigido Secuenciación Análisis del/dup <sup>2</sup>
FA-D1	<i>BRCA2</i>	~3%	Secuenciación
FA-D2	<i>FANCD2</i>	~3%	Secuenciación
FA-E	<i>FANCE</i>	~3%	Secuenciación
FA-F	<i>FANCF</i>	~2%	Secuenciación
FA-G	<i>FANCG</i>	~10%	Secuenciación
FA-I	<i>FANCI</i>	~1%	Secuenciación
FA-J	<i>BRIP1</i>	~2%	Secuenciación
FA-L	<i>FANCL</i>	~0.2%	Secuenciación
FA-M <sup>3</sup>	<i>FANCM</i>	~0.2%	Secuenciación
FA-N	<i>PALB2</i>	~0.7%	Secuenciación Análisis del/dup <sup>2</sup>
FA-O <sup>4</sup>	<i>RAD51C</i>	~0.2%	Secuenciación
FA-P <sup>5</sup>	<i>SLX4</i>	~0.2%	Secuenciación
FA-Q	<i>XPF</i>	No documentado	Secuenciación
FA-R	<i>BRCA1</i>	Desconocido	Secuenciación

1. La secuenciación puede detectar deleciones o duplicaciones intragénicas pequeñas, mutaciones sin sentido o de sentido erróneo, así como mutaciones que alteren el splicing. Habitualmente mutaciones exónicas o deleciones y duplicaciones grandes escapan a esta técnica.
2. Incluyen PCR cuantitativa, MLPA, microarreglos.

3. FA-M: la asignación de este grupo de complementación FANCM permanece controversial, una sola familia ha sido identificada para mutaciones en este gen, aunque esta misma presentaba mutación en *FANCA*. Bajo condiciones experimentales mutaciones bialélicas en FANCM condicionan un fenotipo AF [Singh et al., 2009].
4. FA-O: la asignación de este grupo de complementación permanece controversial, existe solo una referencia identificando la mutación [Vaz et al., 2010].
5. FA-P: la asignación de este grupo de complementación es controversial, solo pocas familias con fenotipo AF se han identificado con disminución en la expresión del gen [Kim et al., 2011, Stoepker et al., 2011].

Existen proteínas, como las de la vía AF/BRCA, que son reclutadas a los ICL, activando una cascada de eventos que inician la vía de respuesta al daño del DNA y la subsecuente reparación de las lesiones.

Las proteínas involucradas en la vía FA/BRCA pueden agruparse en 3 grupos:



**Figura 1.** Proteínas de la vía FA/BRCA [Bogliolo M, et al., 2013; Kottmann MC, et al., 2013; Kee Y & D'Andrea AD 2012].

Un paso crucial en algunas vías de reparación es la remoción física de las bases dañadas por endonucleasas. La vía AF/BRCA ha sido implicada en el reclutamiento y la regulación de varias endonucleasas, como XPF-ERCC1, MUS81-EME1, SLX1 y FAN1.

La nucleasa FAN1 es reclutada a los sitios de daño al DNA de manera dependiente a la presencia del complejo I-D2 ubiquitinizado, mediante su dominio de unión a ubiquitina. El papel preciso de FAN1 no se conoce, pero se postula que podría participar en la reparación de los ICL, incluso en vías alternas a la FA/BRCA. Mutaciones en FAN1 se han relacionado a una enfermedad rara, denominada nefritis intestinal kariomegálica (KIN [karyomegalic interstitial nephritis]), que incluye falla renal progresiva histopatológicamente caracterizada por núcleos hipercromáticos y agrandados dentro del epitelio tubular renal. Interesantemente, estos pacientes a pesar de no presentan características físicas de FA, si poseen hipersensibilidad a los agentes alquilantes. Esta sensibilidad sugiere que la deficiencia de FAN1 puede condicionar una alteración en la reparación de los ICL [Allison SJ 2012]. Es posible pensar que FAN1 pudiera tener una función redundante con otras nucleasas de la vía FA/BRCA, así como que puede solucionar lesiones en el riñón independientemente de FA/BRCA.

Los productos del procesamiento de la lesión por las endonucleasas, en el caso de un ICL, son una ruptura de doble hebra (DSB) y un aducto. Debido a la presencia del aducto es necesario que una polimerasa de síntesis translesión continúe la síntesis del DNA, el cual será posteriormente eliminado mediante la reparación por escisión de nucleótidos. [Naim V 2009; Fagerlie SR 2001; Bagby GC 2006; Briot D 2008].

Como ya se mencionó un paso esencial en la activación de la vía FA/BRCA es la monoubiquitinización del complejo FANCD1-I/D2, esta ocurre en la lisina 561 de la proteína FANCD2 y en menor medida en el residuo de lisina 523 de la proteína

FANCI. Este paso es dependiente de las proteínas del “core” y otras accesorias, que incluyen FAAP20, FAAP24 y FAAP100. La función ubiquitín ligasa del complejo “core” depende de la proteína E3 ligasa FANCL. Una vez ligado el residuo de ubiquitina, el complejo FANCI/D2 se sitúa en la cromatina, a nivel de la lesión, y orquesta a las proteínas río abajo para la reparación. Recientemente se ha descrito que este complejo puede tener un papel directo sobre la regulación del ensamblaje de los nucleosomas en los sitios de daño y por ende remodelaciones en la [Gospodinov A & Herceg Z, 2013].

**d. Competencia entre la reparación por recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos para reparar rupturas de doble hebra.**

Las DSB pueden ser generadas por agentes físicos y químicos, como la radiación ionizante, quimioterapéuticos o agentes reactivos de oxígeno. También pueden originarse de errores durante la replicación y son observadas durante actividades enzimáticas normales, como la meiosis y la recombinación V(D)J. Si estas lesiones quedan sin reparar o se generan de forma masiva, conllevan a la aparición de alteraciones celulares graves, como alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, un incremento de la susceptibilidad al desarrollo de cáncer e incluso muerte celular.

La reparación de las DSB puede llevarse a cabo por tres vías de reparación que entran en competencia y se encuentran altamente reguladas. Estas son: 1) la reparación por recombinación homóloga (HRR), que utiliza siempre a la hebra homóloga de DNA para llevar a cabo la reparación y requiere de resección del DNA mediada por la actividad exonucleasa del complejo MRN [Bernstein KA & Rothstein R 2009, Hartlerode AJ & Scully R 2009]; 2) la unión de extremos no homólogos canónica (C-NHEJ), que consiste únicamente en unir y ligar extremos rotos y está mediada por las proteínas Ku y la cinasa DNA-PKcs [Delacôte et al., 2002]; y 3) la unión de extremos no homólogos alternativa (A-NHEJ) que también requiere de

resección en el DNA mediada por MRN pero además que existan regiones de microhomología. Las alteraciones en la A-NHEJ, son consideradas actualmente como la causa más importante para la formación de rearrreglos cromosómicos (translocaciones, deleciones o inversiones) [Weinstock 2007].

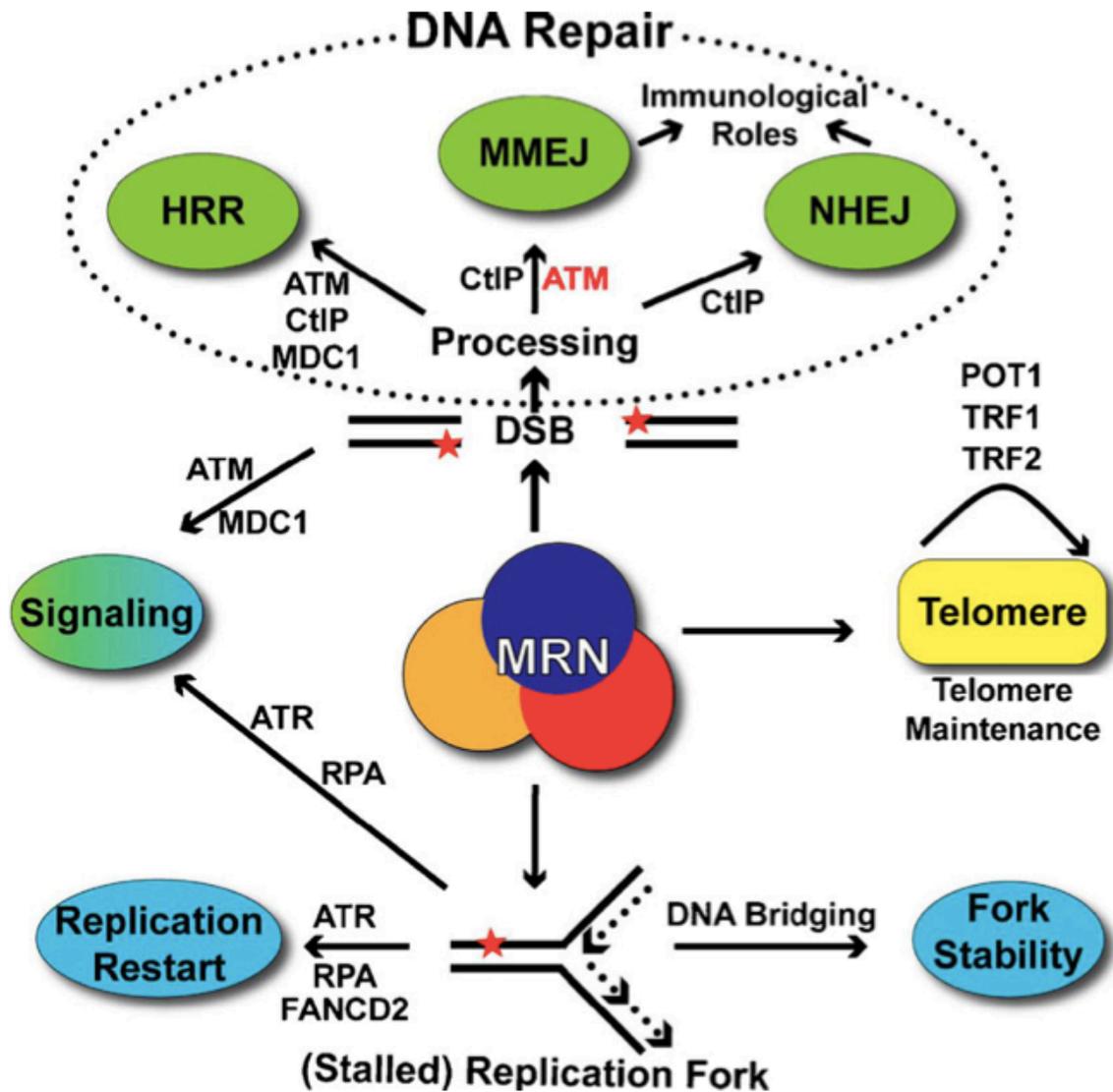
Aunque no es del todo entendido la regulación en la elección de la vía de reparación, se sabe que ésta varía dependiendo del tipo celular, la fase del ciclo celular y las especies [Bernstein KA & Rothstein R, 2009; Shrivastav M et al., 2008]. Después de que la vía FA/BRCA ha procesado los ICL, ella misma se encarga de bloquear a la NHEJ en los sitios en los que se han generado las DSB y canaliza su reparación hacia la HRR, disminuyendo así la frecuencia de errores durante la reparación (Pace et al., 2010). Ciertos estudios experimentales sugieren que la elección de la HRR como vía de reparación es dependiente de modificaciones en la DSB realizadas por la actividad exonucleasa de FANCD2 (Pace et al., 2010). Debido a esto la deficiencia de la vía FA/BRCA condiciona la sobre-activación de la vía de NHEJ, con la subsecuente propensión a error durante la reparación.

### **i. Complejo MRN.**

Al menos tres eventos son requeridos para la correcta reparación de una DSB: 1) la detección del daño; 2) el adecuado control del ciclo celular y programas transcripcionales de respuesta al daño; 3) los mecanismos que catalizan la reparación del daño [Taylor EM et al., 2010; Zha S et al., 2009].

El complejo MRN, el cual es un heterohexámero formado de la unión de 1 par moléculas de MRE11, RAD50 y NBS1, es pieza clave en la respuesta celular ante una DSB, fungiendo como censor, regulador del ciclo celular, amplificador de la señal de daño en colaboración con la cinasa ATM y efector de las vías de reparación, tanto HRR como NHEJ (canónica y alterna) [Taylor EM et al., 2010; Zha S et al., 2009].

El complejo MRN también a sido involucrado con el mantenimiento de los telómeros [Chamankhan M & Xiao W, 1999]. Y recientemente involucrado, junto con la proteína CtIP en el ensamblaje del huso mitótico dependiente de Ran [Rozier L et al., 2013].



**Figura 2.** Funciones del complejo MRN.

**MRE11:** es una proteína de 70-90kDa altamente conservada. En su forma nativa MRE11 forma dímeros estables que poseen múltiples actividades bioquímicas, que incluyen: (i) unión al DNA, y (ii) actividad exo y endonucleasa de DNA [Williams et al.,

2008].

**RAD50:** es una proteína de 150 kDa con homología a la familia de proteínas de mantenimiento estructural cromosómico, las cuales participan en el control de la estructura de la cromatina.

Interactúa con el dímero de MRE11, el cual facilita la sinapsis de los extremos del DSB, mientras que las moléculas de Rad50 mantienen inmovilizadas las dos moléculas de DNA [Williams et al., 2008; Hopfner KP et al., 2002].

**NBS1:** el tercer componente del complejo, es una proteína de 65-85 kDa. Su función reside en el reclutamiento, la interacción de proteínas de reparación y del punto de monitoreo del ciclo celular a los sitios de rupturas (ejemplo ATM), la translocación al núcleo [Lloyd J et al., 2009; Williams RS et al., 2009], la unión al DNA y la actividad nucleasa del complejo [Paull TT & Gellert M 1999; Falck J et al., 2005; You Z et al., 2005].

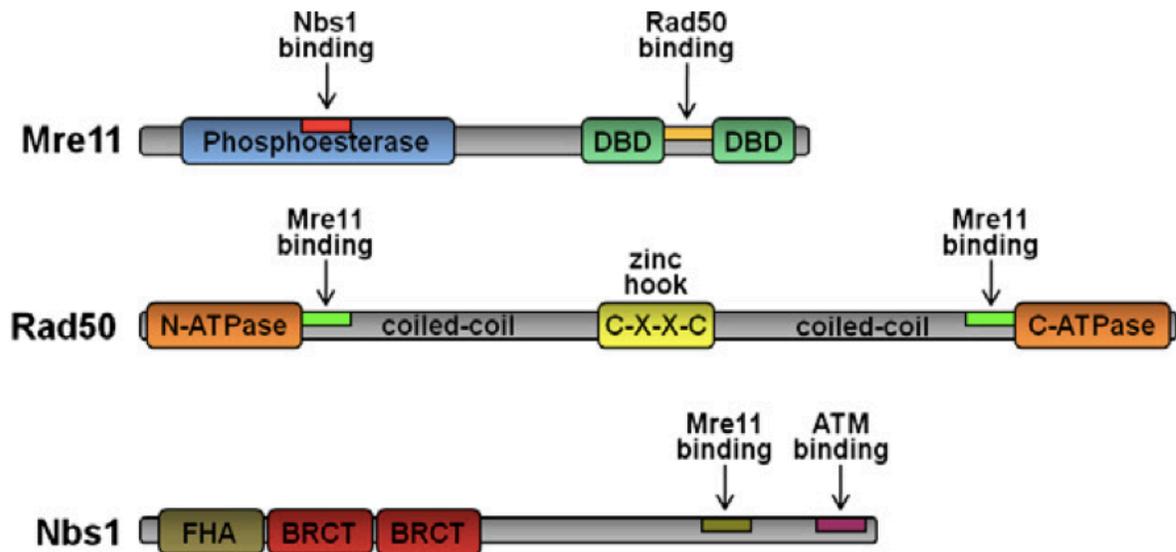
### **1. Mutaciones del complejo MRN: causa de enfermedad.**

En humanos las mutaciones hipomórficas del gen *NBS1* causan el síndrome de Nijmegen/síndrome de ruptura de Nijmegen (NBS) [Carney JP et al., 1998; Varon R et al., 1998]. Enfermedad de transmisión autosómica recesiva caracterizada por microcefalia, inmunodeficiencia (con alteraciones en inmunidad humoral y celular, decremento en la variabilidad de las inmunoglobulinas debido a un defecto en la recombinación de las cadenas VDJ [Reina-San-Martin B et al., 2005], la base de este defecto podría tener relación con la función del complejo MRN en la NHEJ), predisposición a cáncer, ej., linfoma y leucemia [Antoccia A et al., 2006] (alteraciones somáticas en MRN pueden contribuir a la aparición de carcinogénesis [Dzikiewicz-Krawczyk A 2008]), infertilidad y alteraciones en la maduración sexual.

Mutaciones hipomórficas en el gen *MRE11* conducen a la aparición de síndrome de ataxia-telangiectasia-like (A-TLD) [Stewart GS et al., 1999], en el cual los pacientes desarrollan un fenotipo semejante ATM (ataxia y neurodegeneración) [Taylor M 2004].

Un solo paciente ha sido reportado con mutación hipomórfica de *RAD50*, el cual exhibía un fenotipo similar al de los pacientes con NBS [Waltes R et al., 2009].

Las células derivadas de pacientes con NBS y A-TLD presentan un incremento en la radiosensibilidad y una activación defectuosa de los puntos de monitoreo [Stewart GS et al., 1999; Carney JP et al., 1998].



**Figura 3.** Componentes del complejo MRN: dominios de interacción de los 3 componentes, Mre11, Rad50 y Nbs1 [Lamarche BJ et al., 2010].

## **2. Funciones del complejo MRN en la reparación de las DSBs.**

El complejo MRN juegan papeles críticos en múltiples vías metabólicas, como reparación y replicación del DNA, control/activación de los puntos de monitoreo, mantenimiento telomérico y meiosis.

En relación a la reparación, actúa como un censor de las DSBs [Petrini JH & Stracker TH 2003]. A bajas dosis de radiación la presencia de un complejo MRN funcional, estimula el reclutamiento y la activación de ATM [Berkovich E et al., 2007; Lee JH & Paull TT 2005], relacionado probablemente con cambios en la estructura de la cromatina, ya que uno de los blancos de Atm es la histonas H2A.X, la cual es fosforilada en la Ser139 para formar gama-H2A.X, que recluta a Mdc1, MRN y a otras proteínas a los sitios de DSB [Stucki M & Jackson SP 2006]. Por lo tanto MRN se encuentra presente en dos fracciones cerca del DSB: una fracción independiente de H2A.X en el DSB y una fracción unida a H2A.X-Mdc1 en la cromatina [Bekker-Jensen S et al., 2006].

Análisis de inmunofluorescencia indican que tras la formación de una DSB el complejo MRN se ubica tanto de manera rápida en los sitios de ruptura como en los cuerpos PML [Mirzoeva OK & Petrini JH 2001; Nelms BE 1998]. Los beneficios de una rápida localización en los sitios de daño son que se minimiza el tiempo en que los extremos terminales de DNA permanecen vulnerables a degradación no específica y disminuye la posibilidad de que los extremos se separen uno de otro. Además del reclutamiento y activación de ATM, MRN participa en los primeros pasos del procesamiento de la DSB [Shiotani B & Zou L 2009; Jazayeri A 2006].

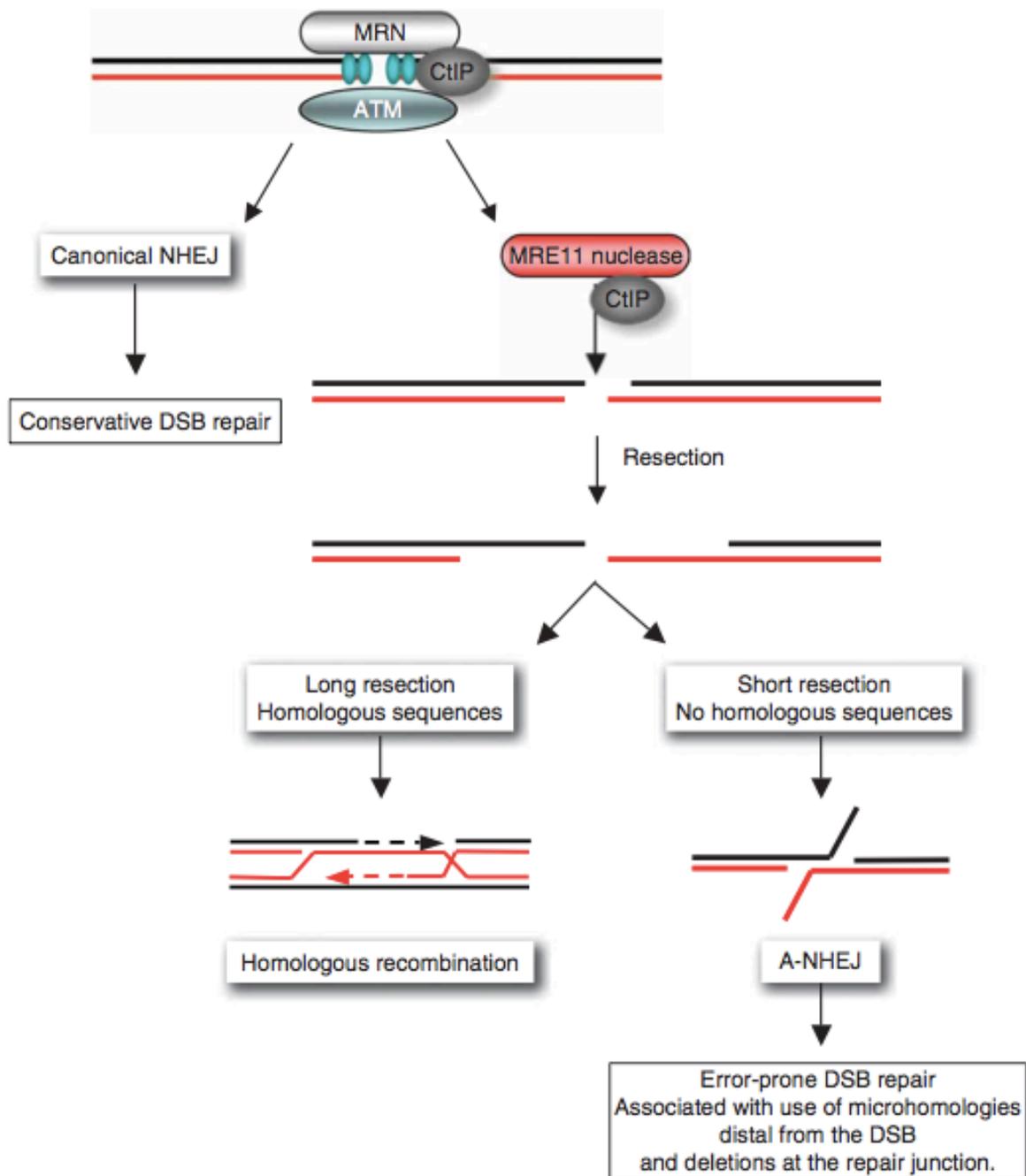
En respuesta a otros tipos de daño al DNA, el complejo MRN también promueve la activación de ATR de forma independiente a ATM, aunque el mecanismo exacto por lo cual esto ocurre no es claro [Zhong H 2005; Carson CT et al., 2009; Manthey KC et al., 2007; Olson E et al., 2007; Stiff T et al., 2005].

En resumen, la activación de ATM y ATR posterior a una DSB inicia una vía señalización que: (i) genera una regulación del ciclo celular (vía Chk1 y Chek2) [Reinhardt HC & Yaffe MB, 2009], (ii) promueve el remodelamiento de la cromatina, necesario para el acceso de la maquinaria de reparación al sitio de lesión [Berkovich E, 2007; Tsukuda T, 2005], y (iii) contribuye al reclutamiento y la retención de proteínas responsables de la reparación.

### **3. Selección de la vía de reparación: HRR versus NHEJ.**

La elección entre la HRR o NHEJ para la reparación de una DSB varía entre especies e incluso entre células de un mismo organismo. En levaduras y eucariontes simples, los cuales poseen un genoma corto y una relativa escasez de secuencias repetidas, la HRR realiza una gran contribución a la reparación de las DSBs. Sin embargo en mamíferos, donde las regiones intergénicas son grandes y las secuencias repetidas más abundantes, se ha sugerido que la NHEJ es más rápida y eficiente [Mao Z et al., 2008]. Esto guarda relación con el hecho de que pueden generarse reordenamientos complejos cuando se usan regiones equivocadas que comparten secuencias para la reparación por HRR [Aguilera A & Gomez-Gonzalez B 2008]. Aunque un organismo pueden tener una preferencia por alguna de las vías, en general la elección fluctúa y depende, entre otras cosas, de la fase del ciclo celular [Branzei D & Foiani M, 2008].

NHEJ es la única vía de reparación para las DSB's durante las fases G0 y G1 del ciclo celular. Durante las otras fases, la célula puede "optar" por la HRR o la NHEJ. Recientemente se ha evidenciado un relación dinámica entre ambas vías; teniendo la HRR un pico al final de la fase S. La elección de la vía podría depender de los factores que accedan primero a la ruptura, ya que existe un patrón de resección específico de los extremos para cada tipo de vía de reparación o de una fluctuación en la concentración de ciertos factores.



**Figura 4.** Vías de reparación de una DSB y su relación con la proteína MRE11.

En la presencia de múltiples DSBs, NHEJ puede resultar en rearrreglos cromosómicos como inversiones o translocaciones [Huertas P 2010].

Se sabe que las características del procesamiento de la DSB juega un papel determinante en la elección entre la HRR y NHEJ. Durante las fases S y G2 los extremos de la DSB son resecaos generando un saliente de cadena sencilla (aproximadamente 30 nucleótidos) [Jazayeri A 2006; Aylon Y et al., 2004; Ira G et al., 2004], esto sirve como sustrato para que las proteínas RPA y Rad51 conduzcan la reparación hacia la HRR [Huertas P 2010], reduciendo la posibilidad de que la ruptura se repare por NHEJ, en parte debido a que el complejo Ku70/80 tiene pobre afinidad por los extremos de cadena sencilla [Dyran WS & Yoo S 1998]. En contraste, durante las fases G0 y G1, cuando no hay un templete de DNA que facilite la HRR, el procesamiento de la DSB es regulado hacia la NHEJ [Zhang Y 2009].

#### **4. La contribución de MRN en la elección de la vía de reparación.**

El complejo MRN mediante su papel en el procesamiento de los extremos de una DSB juega un rol importante en los pasos que dirigen la entrada a la reparación de la lesión [Mimitou EP & Symington LS 2009; Huertas P 2010], siendo necesaria pero no suficiente su presencia, y requiere la colaboración de otros factores que faciliten la reparación, por ejemplo: Mre11 colabora con CtIP en el procesamiento de los extremos de la DSB para la HRR [Sartori AA et al., 2007]

En vertebrados se han correlacionado los niveles de la proteína CtIP (C-terminal binding protein interacting protein) así modificaciones postraduccionales, con la elección de la vía de reparación. CtIP es requerida para un subgrupo de funciones de MRN, incluyendo la resección de los extremos en una DSB [Sartori AA et al., 2007; Mimitou & Symington, 2011] y la interacción con BRCA1 dependiente de daño al DNA.

CtIP sufre modificaciones inducidas por los DSB, localizándose en los *foci* de reparación y uniéndose directamente al complejo MRN, lo que confiere al complejo la capacidad de catalizar la resección de los extremos [You Z & Bailis JM 2010]. Una

depleción de CtIP resulta en un reclutamiento atenuado de las proteínas RPA y ATR a sitios de daño inducido por radiación [Sartori AA et al., 2007], con una reducción en la frecuencia de eventos de HRR.

Los mecanismos que dirigen la reparación de las DSBs hacia una HRR o NHEJ durante determinadas fases del ciclo celular parecen tener que ver con las concentraciones y el estado de fosforilación de CtIP [You Z & Bailis JM 2010; Yu X & Baer R 2000], la fosforilación es mediada por las CDK (quinasas dependientes de ciclinas), esto provee una explicación para la regulación cíclica de la reparación de las DSB [Huertas P et al., 2008].

Hay estudios que indican que Ku puede reducir el procesamiento por vía HRR de las DSBs [Wasko BM et al., 2009; Fukushima T et al., 2001; Clikeman JA et al., 2001; Zhang Y et al., 2007], apoyado por el hecho de que mutaciones en Ku incrementan la frecuencia de DSBs procesadas por HRR [Pierce AJ et al., 2001], sin embargo no es claro como el mecanismo por el cual el complejo MRN compite por los extremos de las DSB. Estos datos apoyan el modelo en el que los complejos Ku y MRN compiten por los extremos a reparar. Para lo anterior se plantea la posibilidad de que existen mecanismos que ciclan y por lo tanto regulan la elección entre ambas vías, tal como se plantea con las concentraciones y el estado de fosforilación de CtIP.

Estudios sobre la importancia del complejo MRN en la NHEJ (tanto la vía canónica [C-NHEJ] como la alternativa [A-NHEJ]) han producido resultados contradictorios [Huang J & Dynan WS 2002; Di Virgilio M & Gautier J 2005]. En la C-NHEJ, los extremos de la ruptura son inicialmente unidos por el anillo que forman el dímero K70/K80, esto recluta a la subunidad catalítica de la proteína-quinasa dependiente de DNA (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)), la cual fosforila factores de reparación y proteínas del punto de monitoreo, de manera análoga a lo que hace ATM durante la HRR [Weterings E & Chen DJ 2008; Meek K et al., 2004]. Mientras el complejo K70/K80 y DNA-PKcs median la unión de los extremos del

DNA, la nucleasa artemisa modifica los extremos libres [Gu J et al., 2010; Yannone SM et al., 2008], generando los sitios donde el complejo XRCC4-DNA ligasa IV unirá las cadenas. La C-NHEJ, también conocida como la forma directa, es llevada a cabo con un procesamiento mínimo de los extremos previo a la ligación. Recientemente se ha descrito una vía independiente de XRCC4-DNA ligasa IV, la A-NHEJ, la cual parece ser más ampliamente utilizada como vía de reparación. Esta involucra una resección pequeña de los extremos en la DSB (<100 nucleótidos) hasta que se halle una secuencia de microhomología (1-4 nucleótidos), la cual es usada como guía para la unión de extremos, se ha sugerido que es MRE11 quien media esta resección y reconocimiento [Xie A et al., 2009; Harber JE 2008]. MRN puede tener tanto funciones enzimáticas como de andamiaje en los sitios de ruptura y que ambas contribuyan al procesamiento de la lesión [Williams RS et al., 2008].

Aunque algunos estudios han demostrado que la inhibición de MRE11, usando siRNAs/miRNAs o moléculas específicas (como la mirina), disminuye los eventos de reparación mediados por la A-NHEJ [Rass E et al., 2009; Xie A et al., 2009] su efecto no se ha evaluado en las células con AF.

También se ha observado que la depleción de CtIP en cultivos de fibroblastos transformados causa un decremento significativo de la eficacia de la unión de extremos en los DSBs [Rass E et al., 2009], lo cual es consistente con el hecho de que tiene un papel adyuvante al complejo MRN en el procesamiento de la ruptura. Todo lo anterior indica que, al contrario de todo lo que se sabe con respecto al papel de MRN en la HRR, la(s) función(es) de este en la NHEJ están recién empezando a dilucidarse.

La reparación mediada por NHEJ en ausencia de una vía FA/BRCA funcional podría condicionar la aparición de las anomalías cromosómicas observadas en las líneas celulares y en las células de los pacientes con AF. Modelos de animales y de líneas celulares humanas se han desarrollado para poner a prueba esta hipótesis,

pero hasta ahora los resultados no son concluyentes. Por ejemplo en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* cuando la lig4, ligasa esencial para la vía NHEJ, está mutada en un modelo knockout para alguna proteína de la vía AF/BRCA, la sensibilidad a los agentes generadores de ICL's es corregida, teniendo niveles cercanos a los controles sin mutaciones. Estos datos sugieren que la NHEJ puede tener un efecto deletéreo cuando la vía AF/BRCA es deficiente. Resultados similares se han reportado para los mutantes knockout de Ku70.

Se ha propuesto que cuando las proteínas de la vía AF/BRCA no son funcionales, RAD51 no se deposita sobre la horquilla de replicación, y el ADN naciente se degrada de una manera dependiente de MRE11. El resultado parece ser un aumento de la inestabilidad cromosómica, pudiendo esto contribuir al aumento de la tumorigénesis se observa en pacientes con anemia de Fanconi.

La implicación traslacional de esto es que pudiera considerarse como un potencial blanco terapéutico, basado en la teoría de que la enfermedad no es causada directamente sólo por el daño, sino por una reparación aberrante.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

¿Las células de AF mostrarán un cambio en sus patrones de reparación al inhibir al complejo MRN?

## **3. DISEÑO DEL ESTUDIO.**

Estudio experimental, del tipo pseudoexperimental.

## **4. OBJETIVOS.**

### **Objetivo general:**

Evaluar el comportamiento celular al uso de la mirina (inhibidor específico del complejo MRN) en células con fenotipo AF-A.

### **Objetivos particulares:**

1. Evaluar el tipo y frecuencia de aberraciones cromosómicas producidas por el bloqueo químico del complejo MRN en células con fenotipo AF (VU817) y normales (NL53/NL49).
2. Evaluar si el bloqueo químico del complejo MRN afecta el patrón de distribución del ciclo celular en células con fenotipo AF (VU817) y normales (NL53/NL49).

## **5. HIPÓTESIS.**

Si el complejo MRN media alguna vía alterna de reparación en las células AF, entonces su bloqueo químico modificará los patrones de reparación del DNA en células AF expuestas a MMC.

## 6. JUSTIFICACIÓN.

La AF ha ganado relevancia como modelo para investigar los mecanismos por medio de los cuales una célula puede enfrentar el daño generado por los ICLs en el DNA. Se sabe que las células AF comparadas con las células normales son altamente sensibles a los agentes alquilantes bifuncionales, como la MMC. Sin embargo, a ciertas dosis de estos agentes no todas las células con daño mueren, e incluso se pueden observar células que se han dividido aún con gran cantidad de AC y figuras de intercambio radial entre cromosomas, los cuales son indicios de reparación del daño, pero del tipo reparación propensa a error.

Estos intentos podrían estar mediados por vías de señalización y de reparación del DNA que actúan cuando la vía FA/BRCA es deficiente. Proponer y/o descubrir cuáles son estas vías puede ser de gran utilidad no sólo para el entendimiento de la AF, sino que también puede ser útil en el estudio de varios tipos de cáncer, pues cuando en células tumorales la vía FA/BRCA es deficiente, estas se vuelven dependientes de vías alternas de reparación y mantenimiento de la integridad genómica, así pues encontrar qué vías y de qué modo se encuentran activas podría significar el hallazgo de potenciales blancos terapéuticos.

Con base en lo reportado en la literatura se sabe que el complejo MRN juega un papel fundamental en la activación de la HRR y la A-NHEJ. Esta última es una vía propensa a error, por lo tanto es posible que su regulación pueda tener un papel importante en la aparición de rearrreglos cromosómicos, como los presentes en células de AF.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **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.
- 2) La línea celular NL53 derivada de un donador sano.

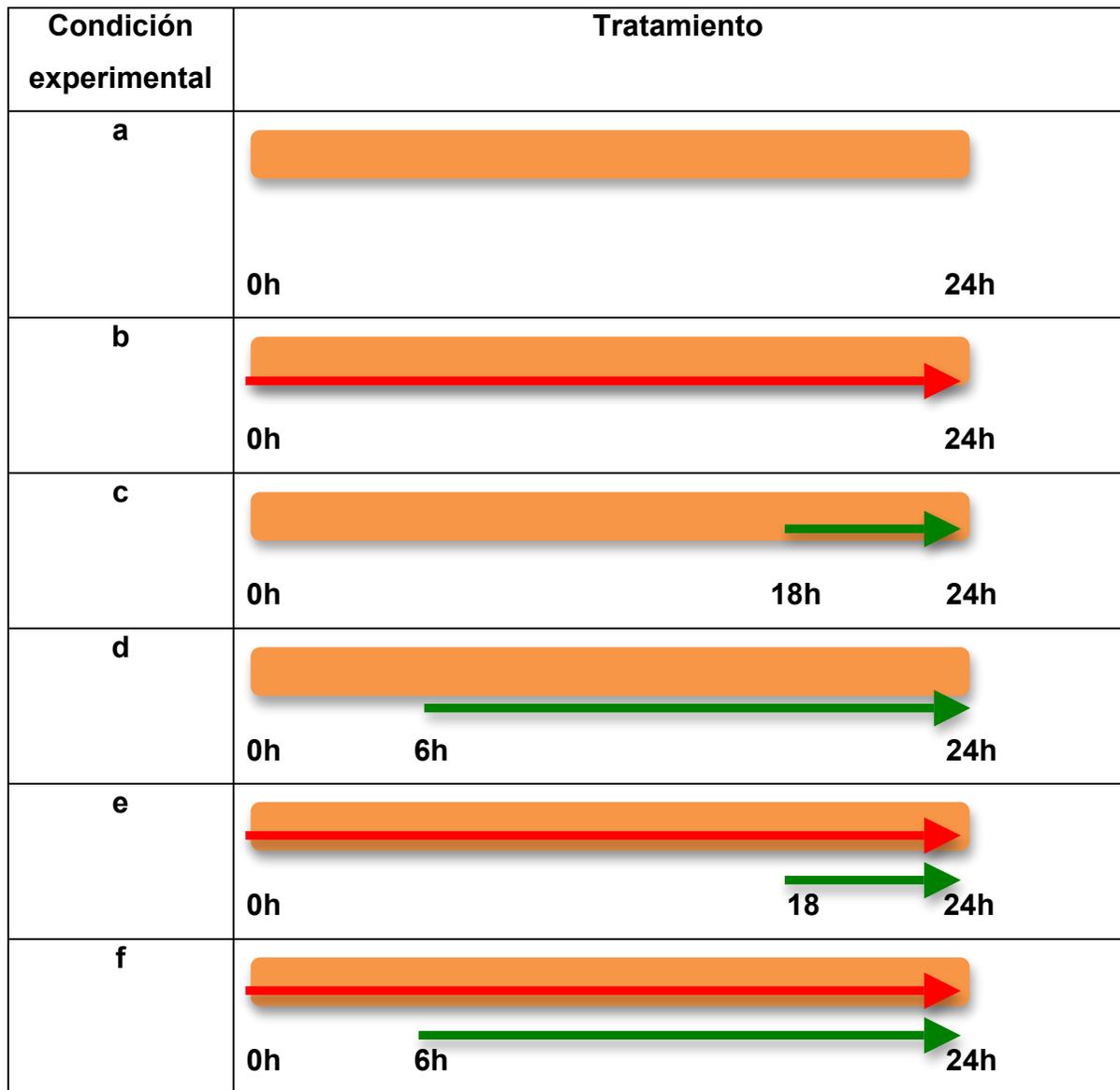
### **Cultivo celular y tratamientos.**

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, 1% de piruvato de sodio, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de gentamicina (todos de Gibco, Carlsbad, CA, USA). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37° C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Antes de realizar cualquier ensayo se evaluó la viabilidad celular con tinción de azul tripano, la viabilidad debió ser igual o mayor al 95% para continuar con el experimento.

Para los cultivos experimentales se sembraron 300,000 células/ml y se trataron con 10 ng/mL de MMC (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) durante 24 horas, así como 10 µM/mL de Mirina, inhibidor de la proteína Mre11 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) durante las últimas 6 o 18 horas de cultivo.

El experimento consistió en 6 condiciones experimentales (Figura 5):

- a. Células sin tratamiento.
- b. Células tratadas solo durante 24 horas de MMC.
- c. Células tratadas durante 6 horas con mirina.
- d. Células tratadas durante 18 horas con mirina.
- e. Células tratadas durante 24 horas con MMC y durante 6 horas con mirina.
- f. Células tratadas durante 24 horas con MMC y durante 18 horas con Mirina



**Figura 5.** Esquema del diseño experimental, las flechas rojas indican el tratamiento con MMC y las verdes el tratamiento con mirina.

**Obtención de metafases y análisis de aberraciones cromosómicas.**

A las 24 horas de cultivo se adicionó colchicina (concentración final 0.1 µg/mL), se incubó a las células con solución hipotónica durante media hora y se fijaron con solución de Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1). Posteriormente se realizaron

laminillas y se tiñeron con colorantes de Wright y Giemsa para el análisis en microscopia de campo claro. Se cuantificó la frecuencia de aberraciones cromosómicas (rupturas cromatídicas, rupturas cromosómicas y las figuras reunidas de intercambio radial) en 25 metafases por condición experimental. Se cuantificaron además la frecuencia de células aberrantes y células multiaberrantes.

#### **Citometría de flujo.**

A las 24 horas de cultivo las muestras se lavaron con 1 ml de PBS, se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm y se fijaron con etanol al 70% helado. Posteriormente se dio un lavado con PBS y se agregó a cada muestra 1 ml de solución teñidora de Yoduro de propidio (IP) (1µl de tritón 100X + 10 µl de solución de IP + 1µl de RNAsa + 988 µl de PBS). Las muestras se leyeron en un citómetro FACSCan adquiriendo un total de 20,000 eventos. Los datos fueron analizados usando el software FlowJo 7.6.1.

#### **Análisis estadístico.**

Se realizará análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías y se considerará significativo un valor de  $p < 0.05$ . Así mismo se realizará un análisis de postprueba de Tukey para comparaciones múltiples.

## 8. RESULTADOS.

En los antecedentes directos de nuestro proyecto se observa que las células AF expuestas a MMC tienen su máximo punto de acumulación en fase S a las 18 horas después de haberse iniciado el cultivo experimental y es en este mismo momento en que comienza la acumulación de las células AF en la fase G2 del ciclo celular.

Ambas líneas celulares fueron tratadas con MMC durante 24 horas para inducir daño en el DNA, y con mirina durante las últimas 6 o 18 horas de cultivo para inhibir a la proteína MRE11. Con este diseño experimental se esperaba que: a) la adición de mirina durante las últimas 6 horas de cultivo inhibiera al complejo MRE11 primordialmente durante la fase G2 del ciclo celular, y b) la adición de mirina durante las últimas 18 horas de cultivo inhibiera al complejo MRE11 antes de que las células transitaran por las fases S y G2 del ciclo celular.

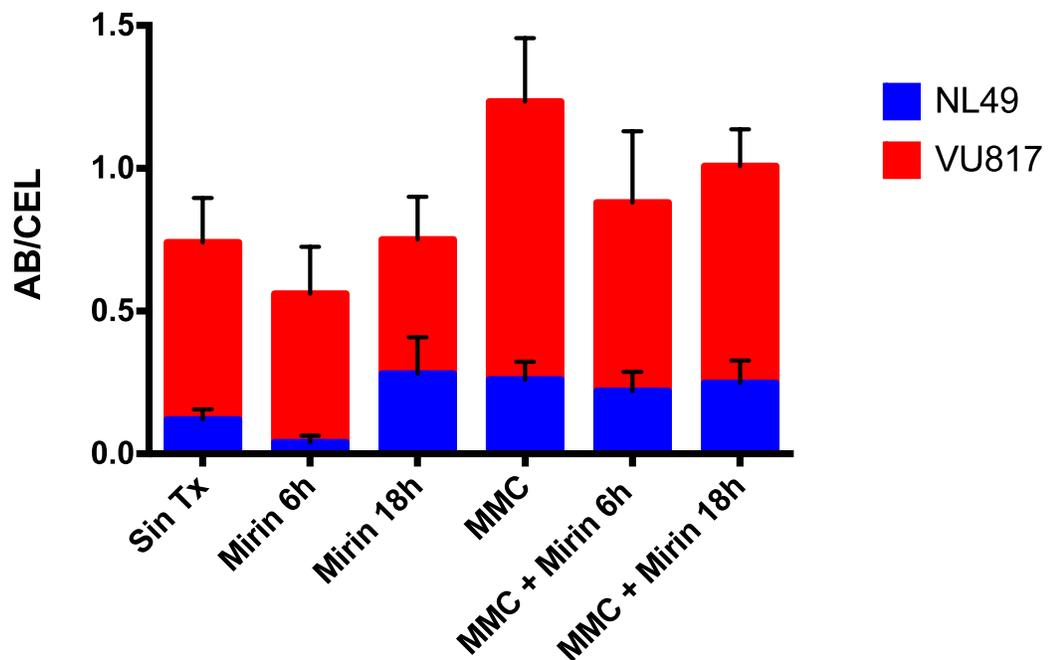
Bajo estas condiciones experimentales se analizaron diferentes parámetros.

### ***Frecuencia de aberraciones por célula.***

Tal y cómo se esperaba, la frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula (ab/cel) es significativamente mayor en las células AF en comparación con las células normales, tanto de modo espontáneo como después del tratamiento con MMC (figura 6).

En las células normales el tratamiento con mirina durante 6 horas no generó diferencias comparada con su control (figura 6). También se observa que el tratamiento con mirina incrementa la frecuencia de ab/cel después de 18 horas de exposición de un modo similar a como lo hace la MMC; sin embargo, esta diferencia no resultó significativa comparada con el control sin tratamiento. La frecuencia de ab/cel cuando se adicionó MMC al tratamiento de mirina durante 6 ni 18 horas no es diferente a lo observado con MMC sola o mirina sola durante 18 horas (figura 6).

En las células AF la exposición a mirina durante 6 o 18 horas no tuvo un efecto en la frecuencia de ab/cel espontáneas. Aunque parece haber una tendencia a la disminución de ab/cel en las células AF expuestas a MMC que fueron tratadas con mirina, esta no resultó estadísticamente significativa ni durante 6 ni 18 horas (figura 6).



**Figura 6.** Frecuencia de aberraciones cromosómicas (ab/cel) por célula.

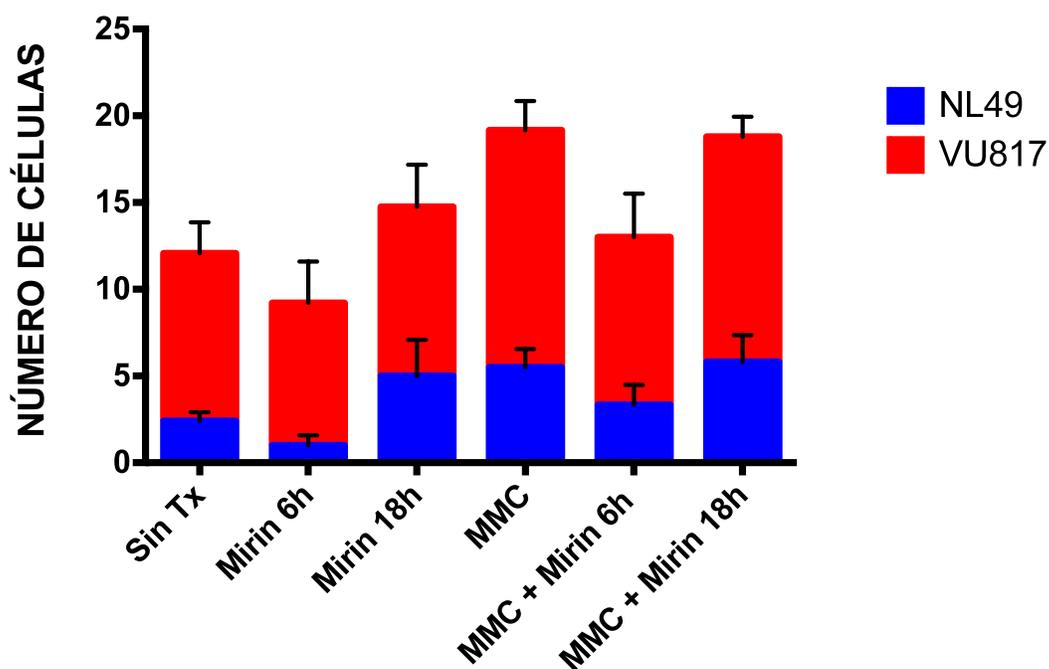
### ***Frecuencia de células aberrantes***

La frecuencia de células aberrantes es significativamente mayor en las células AF en comparación con las células de la línea normal, tanto de forma espontánea como inducida con MMC (figura 7).

En la línea celular normal el tratamiento con mirina durante 6 horas muestra una tendencia a disminuir la frecuencia de células aberrantes tanto de forma espontánea como inducida con MMC, pero sin resultar una diferencia significativa (figura 7). También se observa que la exposición a mirina incrementa la frecuencia de células

aberrantes después de 18 horas de exposición de un modo similar a como lo hace la MMC, sin embargo, esta diferencia no resultó significativa y la frecuencia de células aberrantes no se modificó cuando se adicionó MMC al tratamiento de mirina (figura 7).

En las células AF la exposición a mirina durante 6 o 18 horas no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la frecuencia de células aberrantes; sin embargo pareciera haber una tendencia a la disminución de la frecuencia de células aberrantes en las células tanto de forma espontánea como inducida con MMC que fueron tratadas con mirina durante 6 horas, mientras que el tratamiento con mirina por 18 horas de forma espontánea pareciera aumentar al número de células aberrantes y en combinación con MMC no generar cambios con referencia a su control de MMC (figura 7).



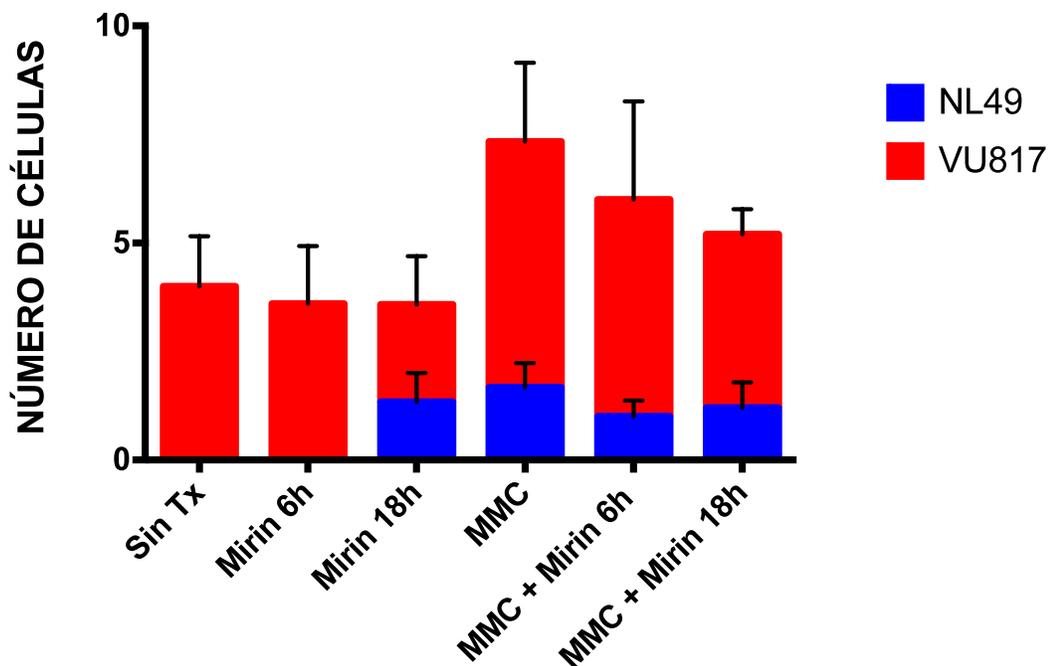
**Figura 7.** Frecuencia de células aberrantes observadas en la línea celular normal y la línea celular AF bajo diferentes esquemas de tratamiento.

### ***Frecuencia de células multiaberrantes***

Como se esperaba las células de la línea normal no presentaron células multiaberrantes de forma espontánea y de forma inducida el número de éstas fue considerablemente mayor en células de la línea AF (figura 8).

En la línea celular normal el tratamiento con mirina durante 6 horas no produce células multiaberrantes y el tratamiento con mirina sola durante 18 horas de exposición y el tratamiento combinado de MMC y mirina durante 6 y 18 horas de tratamiento muestran el mismo efecto en la aparición de células multiaberrantes, con un número de células multiaberrantes por debajo de la línea celular AF (figura 8).

En las células AF la exposición a mirina durante 6 o 18 horas no generó diferencias en el número de células multiaberrantes espontáneas (figura 8). La adición de mirina al tratamiento con MMC tiende a disminuir el número de células multiaberrantes en 6 y 18 horas, más importante en el caso del tratamiento durante 18 horas (figura 8).



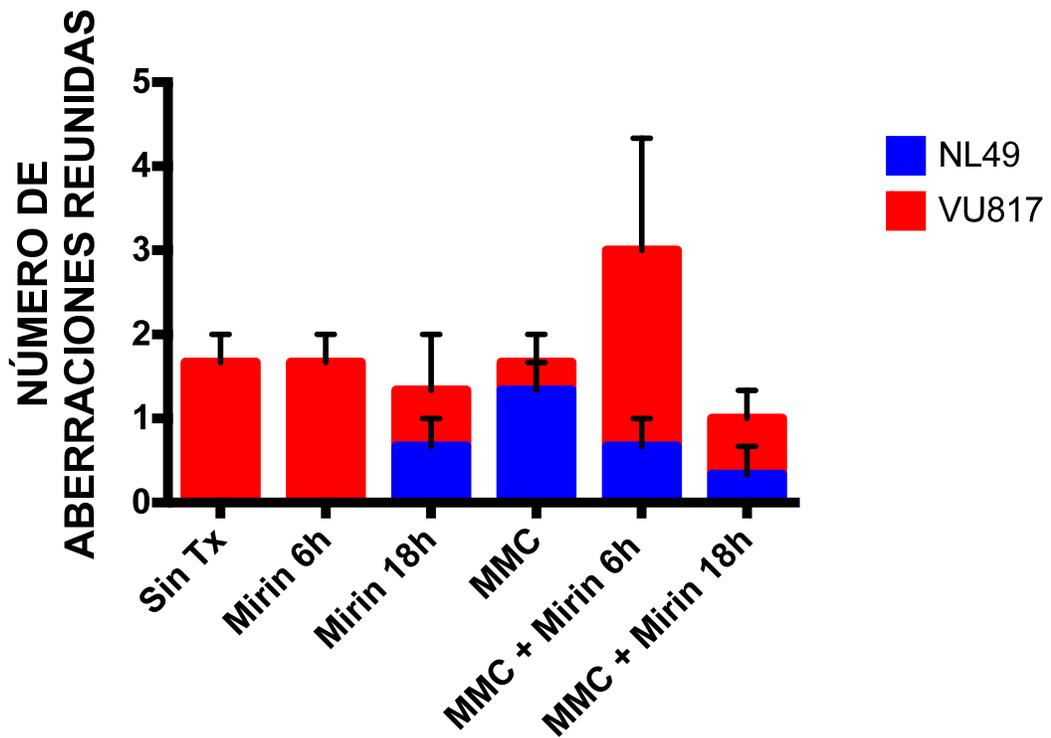
**Figura 8.** Comparación de la frecuencia de células multiaberrantes observadas en la línea celular normal y la línea celular AF bajo diferentes esquemas de tratamiento.

### ***Frecuencia de rupturas reunidas***

De forma similar a las células multiaberrantes, la línea celular normal no presentó de forma espontánea metafases con rupturas reunidas (figura 9).

En la línea celular normal el tratamiento con mirina durante 6 horas no produce rupturas reunidas (figura 9). La exposición a mirina durante 18 horas produce la aparición de metafases con rupturas reunidas, en un modo similar a como lo hace la MMC y el tratamiento combinado con MMC y mirina durante 6 y 18 horas genera una tendencia a la disminución de estas alteraciones, sin resultar significativa (figura 9).

En las células AF la mirina durante 6 o 18 horas no generó diferencias en las rupturas reunidas generadas de forma espontánea ni inducida con MMC (figura 9).



**Figura 9.** Comparación de la frecuencia de aberraciones reunidas observadas en la línea celular normal y la línea celular AF bajo diferentes esquemas de tratamiento.

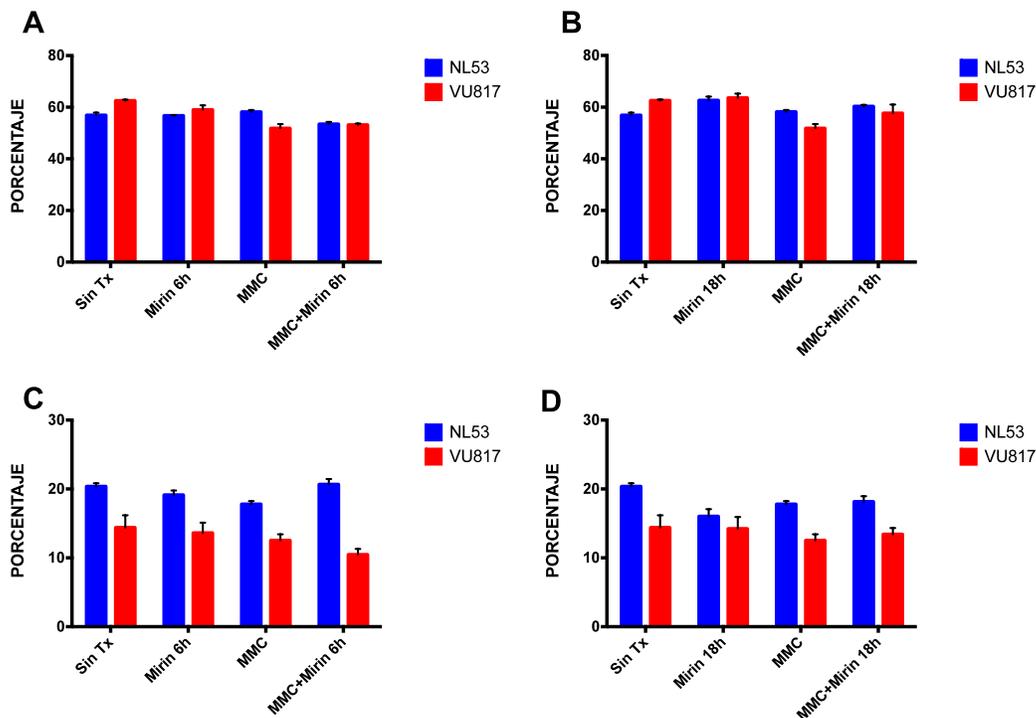
### ***Análisis de distribución en el ciclo celular***

Tal y como se esperaba, la distribución del porcentaje de células de acuerdo a la fase del ciclo celular de forma espontánea y con el tratamiento con MMC fue similar a lo reportado, por ejemplo con un aumento en la cantidad de células acumuladas en fase G2 posterior al tratamiento con MMC (figuras 10 y 11).

Para la línea celular normal, el tratamiento con mirina por 6 horas de exposición no produce diferencias en el porcentaje de células en fase G1, sin embargo cuando las células se encuentran además tratadas con MMC se produce una tendencia a la disminución del porcentaje de las células que se encuentran en esta fase (figura 10). El porcentaje de las células en fase S con el tratamiento de mirina por 6 horas de exposición muestra una tendencia a la disminución comparadas con su control, mientras que al estar tratadas con MMC y mirina este porcentaje aumenta (figura 10). En el caso de las células en fase G2 el tratamiento combinado de mirina y MMC durante 6 horas de exposición produce una tendencia al aumento en la proporción de células en esta fase (figura 11). Con relación al porcentaje de células en fase subG1 el tratamiento con mirina durante 6 horas de exposición solo o con MMC produce una tendencia a la disminución del número de células (figura 11).

Para la línea AF se observa una tendencia a la disminución en el porcentaje de células en fase G1 con el tratamiento con mirina por 6 horas de exposición, mientras que las células que fueron también tratadas con MMC en combinación con mirina por el mismo tiempo no muestran diferencias (figura 11). Con relación a la fase S el tratamiento solo con mirina no genera diferencias comparado con aquellas células no tratadas, mientras que el combinado de MMC y mirina por 6 horas de exposición presenta una tendencia a la disminución (figura 10). En el caso de las células en fase G2 la adición de mirina durante las últimas 6 horas de exposición a MMC produce una tendencia a la disminución del porcentaje de células en esta fase (figura 11).

Con relación al porcentaje de células en fase subG1 el tratamiento con mirina produce un porcentaje semejante de células en esta fase comparado con la MMC, siendo en ambos casos superior comparado con su control (figura 11).

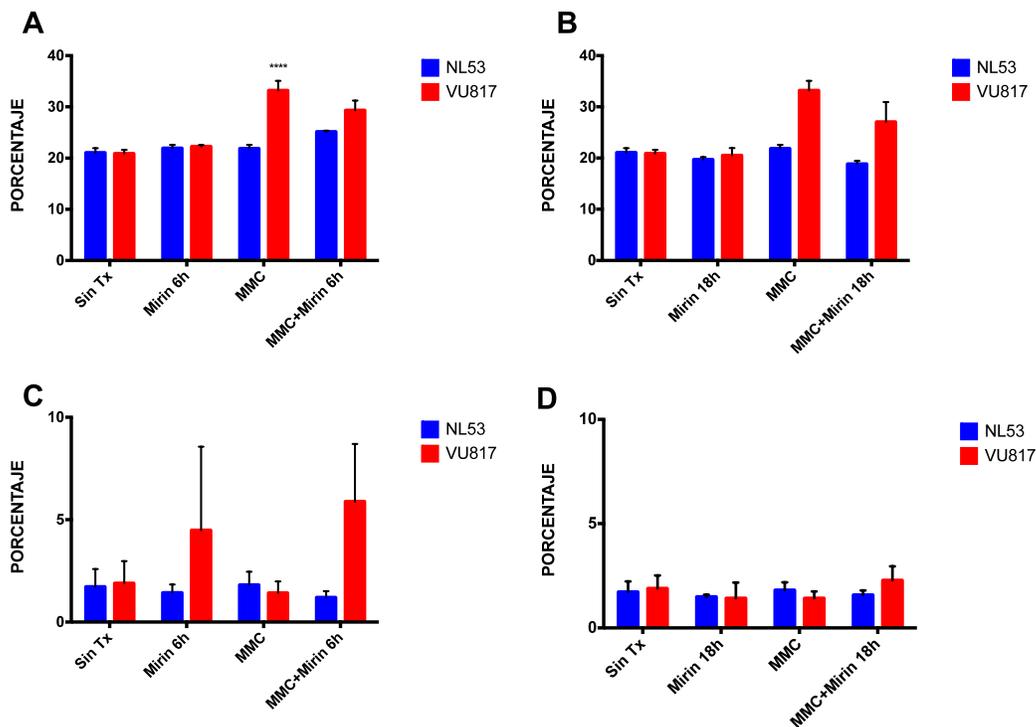


**Figura 10.** Distribución en las fases G1 y S. A) fase G1 con tratamiento de mirina por 6 horas. B) fase G1 con tratamiento de mirina por 18 horas. C) fase S con tratamiento de mirina por 6 horas. D) fase S con tratamiento de mirina por 18 horas.

Para la línea celular normal el tratamiento con mirina por 18 horas de exposición produce un aumento en el porcentaje de células en fase subG1 cuando este no se acompaña de MMC (figura 10). El porcentaje de las células en fase S con el tratamiento de mirina por 18 horas de exposición muestra una disminución comparado con su control, mientras que al estar tratadas con MMC y mirina este no se genera cambio (figura 10). En el caso de las células en fase G2 la adición de mirina durante las últimas 6 horas de cultivo al tratamiento con MMC produce una tendencia a la disminución del porcentaje de células en esta fase (figura 11).

Con relación al porcentaje de células en fase subG1 el tratamiento con mirina durante 18 horas de exposición solo o con MMC no produce diferencias (figura 11).

Para la línea AF se observa una tendencia al aumento del número de células en fase subG1 al adicionar mirina por 18 horas de exposición al tratamiento con MMC, mientras que la mirina sola no produce ningún cambio (figura 10). Con relación a la fase S el tratamiento con mirina durante 18 horas de exposición solo o con MMC no produce diferencias (figura 10). En el caso de las células en fase G2 la adición de mirina durante las últimas 18 horas de cultivo produce una hay una tendencia a la disminución del porcentaje de células en esta fase (figura 11). Con relación al porcentaje de células en fase subG1 el tratamiento con mirina durante 18 horas de exposición sola o con MMC no produce diferencias (figura 11).



**Figura 11.** Distribución en las fases G2 y subG1. A) fase G2 con tratamiento de mirina por 6 horas. B) fase G2 con tratamiento de mirina por 18 horas. C) fase subG1

con tratamiento de mirina por 6 horas. D) fase subG1 con tratamiento de mirina por 18 horas.

## **9. DISCUSIÓN.**

La AF es una enfermedad multisistémica con inestabilidad cromosómica que presenta un amplio espectro de características clínicas con expresividad muy variable. Las principales manifestaciones de la enfermedad se pueden agrupar en 3 categorías: malformaciones congénitas, defectos hematopoyéticos y susceptibilidad a desarrollar neoplasias [Crossan & Patel, 2012].

Esta patología es causada por mutaciones germinales en genes cuyos productos proteicos regulan la reparación del DNA. Hasta la fecha se han identificado 17 genes cuyas mutaciones son la causa de la AF [Bogliolo M, et al., 2013] y todos colaboran en la reparación de ICLs mediada por la vía FA/BRCA.

Las proteínas de la vía FA/BRCA conjunta mecanismos críticos de reparación del DNA: NER, TLS, NHEJ y HRR; por lo tanto, una mutación en estos genes produce alteraciones en cualquiera de estas vías, generando el fenotipo celular de la AF. Los pacientes y las líneas celulares con AF muestran hipersensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales, como el DEB y la MMC, presentando un incremento importante en el número de AC, tanto de forma espontánea como inducida, esta característica celular es la base del diagnóstico de la enfermedad.

Además de lo anterior, la vía FA/BRCA está involucrada en la determinación del tipo de reparación celular ante una lesión en el DNA; se ha descrito que no sólo promueve la HRR, sino que también regula negativamente a la NHEJ (tanto la vía canónica como la alterna) [Pace et al. 2010] y se sugiere que puede estar relacionada con la elección de la vía de reparación. Esto es un proceso altamente

complejo y aún no bien entendido, que está regulado por otras moléculas como el complejo MRN, que posee funciones de sensor, señalizador, regulador y efector en los primeros pasos de la respuesta de reparación de las DSBs [Taylor EM et al., 2010; Zha S et al., 2009].

El objetivo de este trabajo fue bloquear el funcionamiento de la proteína MRE11, y de este modo inactivar la función del complejo MRN en células normales y con AF. Para llevar a cabo este bloqueo se utilizó un compuesto conocido como mirina. Se sabe que la mirina es un bloqueador específico del complejo MRN y se ha observado que tras su administración ocurre una disminución en la concentración de la proteína MRE11, así como una co-depleción de las otras proteínas que forman parte del complejo MRN (RAD50 y NBS1), bloqueando así su actividad [Costanzo et al., 2001; Dupré et al., 2008].

Múltiples vías, como la detección del daño al DNA, la regulación del ciclo celular, la amplificación de la señal de daño en colaboración con la cinasa ATM y la estimulación de las vías de reparación, tanto HRR como NHEJ, resultan bloqueadas luego de la inhibición de la proteína MRE11 [Taylor EM et al., 2010; Zha S et al., 2009].

Hasta el momento no está bien determinado cómo la inhibición de MRE11 puede afectar las vías de reparación del DNA, pero se postula que la inhibición de MRE11 afecta un paso en común, previo a la elección de la vía de reparación, conduciendo a alteración de todas las vías; una posibilidad es la función que MRN, en conjunto con otras proteínas, tiene sobre el remodelamiento de la cromatina.

En nuestros experimentos ambas líneas celulares fueron tratadas con MMC durante 24 horas para inducir daño en el DNA y con mirina durante las últimas 6 y 18 horas de cultivo para inhibir a la proteína MRE11. Con ello se buscaba inhibir al complejo

MRN primordialmente durante la fase G2 del ciclo celular (6 horas de exposición) y durante el tránsito a través de la fase S (18 horas de tratamiento).

Dupré et al., encontraron un porcentaje de sobrevivencia disminuido a más o menos del 60% a partir de una dosis de mirina de 50  $\mu$ M, sin mostrar una disminución significativa con dosis de 10, por ello se considero que estas dosis fueran las utilizadas en los experimentos.

Tal y como se esperaba, la frecuencia de ab/cel y la frecuencia de células aberrantes fueron significativamente mayores en las células AF en comparación con las células normales, tanto de modo espontáneo como después del tratamiento con MMC.

El tratamiento con mirina durante 6 horas de exposición tiende a disminuir la frecuencia de ab/cel y la frecuencia de células aberrantes, con tratamiento y sin tratamiento de MMC; mientras que la administración de mirina durante 18 horas no muestra tendencia a la disminución de ac/cel, sin embargo ninguno de estos parámetros resultó estadísticamente significativo. Las tendencias observadas pudieran estar en relación a que la mirina administrada durante 18 horas al cultivo celular es metabolizada y/o a que las células tienen más tiempo para la síntesis de nuevas moléculas de MRE11, sustituyendo a las que han sido bloqueadas con la mirina y por lo tanto las tendencias son más notables en la administración de mirina solo por 6 horas.

Así mismo, la distribución del porcentaje de células de acuerdo a la fase del ciclo celular de forma espontánea y con el tratamiento con MMC fue similar a lo reportado [Heinrich et al. 1998], con un aumento en la cantidad de células AF acumuladas en la fase G2 posterior al tratamiento con MMC. La administración de 10  $\mu$ M/mL de mirina durante 6 horas de exposición no mostró cambios en los porcentajes de células de acuerdo a la fase del ciclo celular de forma espontánea y con el tratamiento con MMC, semejante a los reportado por Dupré et al., quienes sólo encontraron cambios

en las concentraciones de 50uM y 100uM, lo que sugiere que dosis más bajas de ésta no producen el mismo efecto. Sin embargo, sí se observan efectos en las fases G2 y subG1. El tratamiento combinado de MMC con mirina produce una disminución en el número de células en G2 tanto con 6 como 18 horas de exposición. Mientras que el número de células en fase subG1 aumenta con 6 horas de exposición, lo que puede sugerir una muerte celular relacionada con el uso de mirina, aún a bajas dosis.

Dadas estas observaciones se podría pensar que la mirina administrada por 6 horas podría promover la NHEJ; dado que disminuye la frecuencia de células con aberraciones y las aberraciones por célula, mientras que aumenta el número de figuras radiales. Lo cual correlaciona con el hecho de que disminuye la frecuencia de células en G2. Si consideramos que una figura radial ya no es un cromosoma roto, podríamos pensar que eso promueve la salida de células de la fase G2.

Sin embargo, la mirina por 6 horas también aumentó el número de células en subG1, hecho que se interpreta como un aumento en la muerte celular, condicionando la disminución de las células con aberraciones y la disminución del número de células en G2. En este sentido, la inhibición del complejo MRN, al actuar como un regulador maestro, inactivaría a la HHR y a la NHEJ, conduciendo a la muerte celular., sin embargo, en nuestros estudios no pudimos determinar la fase del ciclo celular en la cual está ocurriendo la muerte de estas células en respuesta a la mirina.

Es importante mencionar que ya sea la dosis de 10uM de mirina o que el tiempo de tratamiento sean insuficientes para evaluar y caracterizar todos los cambios, es posible que sea necesario usar dosis diferentes o bien un tiempo de exposición diferente. Según los datos obtenidos entre más tiempo pasa después de la administración de MMC, las células van mostrando más aberraciones cromosómicas.

Otro aspecto a considerar es que la mirina pudiera tener otros blancos de inhibición y, por lo tanto, alterar la función de otras moléculas que no han sido consideradas, ya

que a pesar de ser un excelente inhibidor de la proteína MRE11, la mirina no es completamente específica [Garner KM, et al., 2009; Dupré A, et al., 2008]. Así mismo, es importante mencionar que la proteína MRE11 no solo forma parte del complejo MRN, si no que, de forma independiente (como homodímero) puede desempeñar otras funciones y por lo tanto la inhibición de MRE11 con la mirina podría alterar otras de sus funciones, como su actividad exonucleasa y de unión al DNA) [Williams et al., 2008].

Por otro lado es necesario considerar que el complejo MRN no sólo ha sido involucrado con la reparación del DNA, sino también con el mantenimiento de los telómeros [Chamankhan M & Xiao W, 1999] y el ensamblaje del huso mitótico dependiente de Ran [Rozier L et al., 2013], por lo que la alteración en la función del complejo MRN, provocada por la mirina, no queda circunscrita a los complejos localizados en los sitios de daño al DNA, y pudiera tener un efecto sobre los complejos MRN relacionados con la segregación de los cromosomas o los que se localizan en la región telomérica.

## **10. CONCLUSIONES.**

Con nuestros experimentos es posible observar hallazgos interesantes en relación al papel que juega la mirina con su actividad de bloqueo del complejo MRN en la respuesta celular normal y AF ante el tratamiento como MMC.

En primer lugar, a nivel citogenético se observó que la mirina administrada sólo durante 6 horas **disminuye** el número de AC y de células aberrantes, aumentando el número de figuras reunidas, aunque no de forma estadísticamente significativa.

Por otro lado, el tratamiento con mirina por 6 horas disminuyó el número de células en la fase G2 del ciclo celular, mientras que la fracción subG1 (apoptótica) aumentó, ambas situaciones con una diferencia estadísticamente significativa.

Por lo anterior consideramos que se requieren más experimentos, con diferentes dosis o tiempos de tratamiento, así como analizar si existen otras modificaciones producidas por el tratamiento con mirina para definir a mayor detalle el papel que el complejo MRN tiene en las probables rutas alternas de reparación de ICLs que poseen las células con AF.

## REFERENCIAS

- Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res.* 2009;668(1-2):4-10.
- Bogliolo M, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):800-6.
- Corneo B, et al. Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature.* 2007;449(7161):483-6.
- Crossan GP, Patel KJ. The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. *J Pathol.* 2012 Jan;226(2):326-37.
- Deans AJ, West SC. FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol Cell.* 2009 Dec 25;36(6):943-53.
- Delacôte F, Han M, Stamato TD, Jasin M, Lopez BS. An xrcc4 defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(15):3454-63.
- Deriano L, Stracker TH, Baker A, Petrini JH, Roth DB. Roles for NBS1 in alternative nonhomologous end-joining of V(D)J recombination intermediates. *Mol Cell.* 2009;34(1):13-25.
- Kitao H & Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol* 2011;93:417–424.
- Kutler DI et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood.* 2003;101(4):1249-56.
- Lee JH, Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science.* 2004;304(5667):93-6.
- Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):893-8.
- Pace P, Mosedale G, Hodskinson MR, Rosado IV, Sivasubramaniam M, Patel KJ. Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. *Science.* 2010;329(5988):219-23.

- Rass E, Grabarz A, Plo I, Gautier J, Bertrand P, Lopez BS. Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Aug;16(8):819-24.
- Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood.* 2003 Feb 1;101(3):822-6.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature.* 2007;450(7169):509-14.
- Seyschab H, et al. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood.* 1995;85(8):2233-7.
- Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev.* 2010;24(3):101-22.
- Shimamura A, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood.* 2002;100(13):4649-54.
- Weinstock DM, Brunet E, Jasin M. Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat Cell Biol.* 2007;9(8):978-81.
- Williams GJ, Lees-Miller SP, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst).* 2010;9(12):1299-306.
- Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):800-6.
- Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature.* 2013;493(7432):356-63.
- Kee Y, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *J Clin Invest.* 2012;122(11):3799-806.
- Williams S, et al. Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair, *Cell* 2008;135(3):97–109.
- Hopfner, K.P. et al. (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418, 562–566.
- Lloyd, J. et al. (2009) A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage. *Cell* 139, 100–111.
- Williams, R.S. et al. (2009) Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. *Cell* 139, 87–99.
- Paull, T.T. and Gellert, M. (1999) Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* 13, 1276–1288.
- Falck, J., Coates, J. and Jackson, S.P. (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605–611. [36]
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T. and Russell, P. (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol. Cell Biol.* 25, 5363–5379.
- Stracker, T.H., Morales, M., Couto, S.S., Hussein, H. and Petrini, J.H.J. (2007) The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex. *Nature* 447, 218–221.

- Carney, J.P. et al. (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.
- Varon, R. et al. (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93, 467–476.
- Reina-San-Martin, B., Nussenzweig, M.C., Nussenzweig, A. and Difilippantonio, S. (2005) Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1590–1595.
- Antoccia, A., Kobayashi, J., Tauchi, H., Matsuura, S. and Komatsu, K. (2006) Nijmegen breakage syndrome and functions of the responsible protein, NBS1. *Genome Dyn.* 1, 191–205.
- Dzikiewicz-Krawczyk, A. (2008) The importance of making ends meet: mutations in genes and altered expression of proteins of the MRN complex and cancer. *Mutat. Res.* 659, 262–273.
- Stewart, G.S. et al. (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99, 577–587.
- Taylor, A.M., Groom, A. and Byrd, P.J. (2004) Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* 3, 1219–1225.
- Waltes, R. et al. (2009) Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 605–616.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2009) Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 819–824.
- Xie, A., Kwok, A. and Scully, R. (2009) Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 814–818.
- Mimitou, E.P. and Symington, L.S. (2009) DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* 8, 983–995.
- Petrini, J.H. and Stracker, T.H. (2003) The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 13, 458–462.
- Carson, C.T., Schwartz, R.A., Stracker, T.H., Lilley, C.E., Lee, D.V. and Weitzman, M.D. (2003) The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J.* 22, 6610–6620.
- Girard, P.M., Riballo, E., Begg, A.C., Waugh, A. and Jeggo, P.A. (2002) Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene* 21, 4191–4199.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L. and Shiloh, Y. (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* 22, 6610–6620.
- Maser, R.S., Monsen, K.J., Nelms, B.E. and Petrini, J.H. (1997) HMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell Biol.* 17, 6087–6096.
- Mirzoeva, O.K. and Petrini, J.H. (2001) DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol. Cell Biol.* 21, 281–288.
- Nelms, B.E., Maser, R.S., MacKay, J.F., Lagally, M.G. and Petrini, J.H. (1998) In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 281, 1503–1506.

280, 590–592.

- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J. and Jackson, S.P. (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 8, 37–45.
- Zhong, H., Bryson, A., Eckersdorff, M. and Ferguson, D.O. (2005) Rad50 depletion impacts upon ATR-dependent DNA damage responses. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2685–2693.
- Shiotani, B. and Zou, L. (2009) Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to- ATR switch at DNA breaks. *Mol. Cell* 33, 547–558.
- Carson, C.T. et al. (2009) Mislocalization of the MRN complex prevents ATR signaling during adenovirus infection. *EMBO J.* 28, 652–662.
- Manthey, K.C., Opiyo, S., Glanzer, J.G., Dimitrova, D., Elliott, J. and Oakley, G.G. (2007) NBS1 mediates ATR-dependent RPA hyperphosphorylation following replication-fork stall and collapse. *J. Cell Sci.* 120, 4221–4229.
- Olson, E., Nievera, C.J., Lee, A.Y.-L., Chen, L. and Wu, X. (2007) The Mre11–Rad50–Nbs1 complex acts both upstream and downstream of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR) to regulate the S- phase checkpoint following UV treatment. *J. Biol. Chem.* 282, 22939–22952.
- Stiff, T., Reis, C., Alderton, G.K., Woodbine, L., O’Driscoll, M. and Jeggo, P.A. (2005) Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *EMBO J.* 24, 199–208.
- Reinhardt, H.C. and Yaffe, M.B. (2009) Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 245–255.
- Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A. and Osley, M.A. (2005) Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438, 379–383.
- Berkovich, E., Monnat Jr., R.J. and Kastan, M.B. (2007) Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat. Cell Biol.* 9, 683–690.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. and Gorbunova, V. (2008) Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)* 7, 1765–1771.
- Aguilera, A. and Gomez-Gonzalez, B. (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* 9, 204–207.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 297–308.
- Hartlerode, A.J. and Scully, R. (2009) Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem. J.* 423, 157–168.
- Bernstein, K.A. and Rothstein, R. (2009) At loose ends: resecting a double- strand break. *Cell* 137, 807–810.
- Huertas, P. (2010) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 11–16.
- Aylon, Y., Liefshitz, B. and Kupiec, M. (2004) The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J.* 23,

4868–4875.

- Ira, G. et al. (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431, 1011–1017.
- Dynan, W.S. and Yoo, S. (1998) Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 26, 1551–1559.
- Zhang, Y., Shim, E.Y., Davis, M. and Lee, S.E. (2009) Regulation of repair choice. Cdk1 suppresses recruitment of end joining factors at DNA breaks. *DNA Repair (Amst)* 8, 1235–1241.
- Sartori, A.A. et al. (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509–514.
- You, Z. and Bailis, J.M. (2010) DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol.* 20, 402–409.
- Yu, X. and Baer, R. (2000) Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* 275, 18541–18549.
- Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A. and Jackson, S.P. (2008) CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689–692.
- Wasko, B.M., Holland, C.L., Resnick, M.A. and Lewis, L.K. (2009) Inhibition of DNA double-strand break repair by the Ku heterodimer in *mrj* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 8, 162–169.
- Fukushima, T. et al. Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 2001;276, 44413–44418.
- Clikeman, J.A., Khalsa, G.J., Barton, S.L. and Nickoloff, J.A. (2001) Homologous recombinational repair of double-strand breaks in yeast is enhanced by MAT heterozygosity through yKU-dependent and -independent mechanisms. *Genetics* 157, 579–589.
- Zhang, Y. et al. Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007;14, 639–646.
- Pierce, A.J., Hu, P., Han, M., Ellis, N. and Jasin, M. (2001) Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* 15, 3237–3242.
- Huang, J. and Dynan, W.S. (2002) Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res.* 30, 667–674.
- Di Virgilio, M. and Gautier, J. (2005) Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of Mre11. *J. Cell Biol.* 171, 765–771.
- Weterings, E. and Chen, D.J. (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* 18, 114–124.
- Meek, K., Gupta, S., Ramsden, D.A. and Lees-Miller, S.P. (2004) The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. *Immunol. Rev.* 200, 132–141.
- Gu, J. et al. (2010) DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease

- activity of Artemis. *DNA Repair (Amst)* 9, 429–437.
- Yannone, S.M., Khan, I.S., Zhou, R.Z., Zhou, T., Valerie, K. and Povirk, L.F. (2008) Coordinate 5' and 3' endonucleolytic trimming of terminally blocked blunt DNA double strand break ends by Artemis nuclease and DNA- dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res.* 36, 3354–3365.
  - Brandon J. Lamarche, Nicole I. Orazio a,b, Matthew D. Weitzman. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Letters* 2010;584:3682–3695
  - Dupuis-Girod S, Gluckman E, Souberbielle JC & Raja Brauner R. Growth hormone deficiency caused by pituitary stalk interruption in Fanconi's anemia *J Pediatr* 2001;138:129-33.
  - Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP. 2011. How High Are Carrier Frequencies of Rare Recessive Syndromes? Contemporary Estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet Part A* 155:1877–1883.
  - Anastas Gospodinov, Zdenko Herceg. Chromatin structure in double strand break repair. *DNA Repair* 2013;12:800–810
  - Krogh BO, Llorente B, Lam A, Symington LS. Mutations in Mre11 phosphoesterase motif I that impair *Saccharomyces cerevisiae* Mre11-Rad50-Xrs2 complex stability in addition to nuclease activity. *Genetics*. 2005 Dec;171(4):1561-70.
  - Williams RS1, Williams JS, Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol.* 2007 Aug;85(4):509-20.
  - Garner KM, Pletnev AA, Eastman A. Corrected structure of mirin, a small-molecule inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol.* 2009 Mar;5(3):129-30.
  - Dupré A, Boyer-Chatenet L, Sattler RM, Modi AP, Lee JH, Nicolette ML, et al. A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol.* 2008
  - Castella M, et al. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet* 2011;48:242-250.
  - Anastas Gospodinov, Zdenko Herceg, Chromatin structure in double strand break repair. *DNA Repair* 12 (2013) 800–810
  - *Blood.* 1998 Jan 1;91(1):275-87.
  - DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function.
  - Heinrich MC1, Hoatlin ME, Zigler AJ, Silvey KV, Bakke AC, Keeble WW, Zhi Y, Reifsteck CA, Grompe M, Brown MG, Magenis RE, Olson SB, Bagby GC.
  - Sawyer SL, Tian L, Kähkönen M, Schwartzenruber J, Kircher M, Majewski J, Dymant DA, Innes AM, Boycott KM, Moreau LA, Moilanen JS, Greenberg RA. Biallelic Mutations in BRCA1 Cause a New Fanconi Anemia Subtype. *Cancer Discov.* 2015 Feb;5(2):135-42.
  - Swift M, Zimmerman D, McDonough ER. Squamous cell carcinomas in Fanconi's anemia. *JAMA.* 1971 Apr 12;216(2):325-6.

